

Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR DE VITAMINA A SOBRE O CORAÇÃO DE RATAS ADULTAS

“Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica, área de concentração Metabolismo e Nutrição.

Orientador: Prof Adj *Sergio A. R. de Paiva*

Co-orientador: Prof Adj *Leonardo A. M. Zornoff*

Botucatu – São Paulo
2007

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

Azevedo-Gaiolla, Paula Schmidt.

Influência da restrição alimentar de vitamina A sobre o coração de ratas adultas / Paula Schmidt Azevedo Gaiolla. – Botucatu : [s.n.], 2007.

**Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2007.**

Orientador: Prof Adj Sergio Alberto Rupp de Paiva
Assunto CAPES: 40504000

1. Coração - Doenças - Aspectos nutricionais - Estudos experimentais 2.
Vitamina A - Efeitos fisiológicos

CDD 616.1290654

Palavras chave: Estresse oxidativo; Metabolismo energético; Remodelação;
Restrição alimentar; Vitamina A

DEDICATÓRIA

Ao RAFAEL, que faz com que meus dias sejam como sempre sonhei e a quem agradeço todo carinho e incentivo.

Ao GUILHERME e SOFIA, tão amados e ansiosamente aguardados.

Aos meus pais ÂNGELA e MARIO, palavras são insuficientes para expressar minha gratidão. Obrigada por terem me ensinado a seguir este caminho e a nunca desistir.

Aos meus irmãos FABIO e OTAVIO, por toda amizade, carinho e apoio.

A minha avó TICO e meu avô PAULO (in memoriam), pela presença e incentivo constantes.

Ao tio JORGE R. LOPES, por ter me ajudado a entender que obstáculos foram feitos para serem vencidos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por toda proteção, bênçãos e oportunidades.

Aos professores da disciplina de clínica médica:

LUIZ SHIGUIERO MATSUBARA

SERGIO A. RUPP DE PAIVA

MARINA POLITI OKOSHI

LEONARDO A. M. ZORNOFF

É uma honra poder fazer parte desta equipe.

Vocês são fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

Obrigada pela confiança e por todas as oportunidades.

Aos médicos e amigos

ROBERTO MINORU TANI INOUE

MARCOS FERREIRA MINICUCCI

DANIELLA DE REZENDE DUARTE

ELINE DE ALMEIDA SORIANO

Nosso trabalho em conjunto foi essencial para a realização desta tese.

Obrigada pela amizade e apoio.

Aos que colaboraram com a realização deste trabalho:

MARIO BATISTA BRUNO, que com muita competência e responsabilidade viabilizou toda a criação dos animais deste estudo.

CAMILA CORREA

CORINA CORREA

CRISTIANE FREIRE

DIJON S. CAMPOS

ELENIZE JAMAS PEREIRA

FABIO SEIVA

GIOVANNA ÉBAID

JOSÉ CARLOS GEORGETE

ROGÉRIO APARECIDO MONTEIRO

ROSÂNGELA NOVO

SANDRA ÂNGELA FABIO

SUELI APARECEIDA CLARA

VITOR MARCOS DE SOUZA

Meus mais sinceros agradecimentos

Agradeço aos Professores,

Prof. Adj. LUIZ SHIGUERO MATSUBARA e Profa. Adj. BEATRIZ BOJIKIAN MATSUBARA pela realização do estudo do coração isolado e estudo ecocardiográfico e pela disponibilidade em todos os meus momentos de dúvidas.

Profa. Adj. ETHEL NOVELLI pela realização do estudo do estresse oxidativo e metabolismo energético e pelo grande auxílio durante a prova de qualificação.

Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pelo importante auxílio durante a prova de qualificação, essencial para a melhoria da qualidade desta tese.

Prof. Emérito ÁLVARO OSCAR CAMPANA, Prof. Titular ANTONIO CARLOS CICOGNA, Profa. Adj. CÉLIA NOGUEIRA, Prof. Adj. CARLOS ROBERTO PADOVANI pelos ensinamentos durante as disciplinas de pós-graduação que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Clínica Médica
MARIO AUGUSTO DALLAQUA, pela disponibilidade e competência na
formatação desta tese.

ALEXANDRE LUIS LOUREIRO

BRUNO CESAR GOMES DA SILVA

BRUNO JOSÉ FAJIOLI

ELISANGELA APARECIDA DA SILVA

LAURA ANDRADE CÂMARA

RENATO BORGES PEREIRA

E AOS FUNCIONÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO E DA *BIBLIOTECA*

NATHANAEL PINHEIRO SALLES

JANETE APARECIDA HERCULANO NUNES SILVA

ANDREA PAULA LONGO DEVIDÉ

LÍLIAN CRISTINA NADAL BIANCHI NUNES

REGINA CÉLIA SPADIN

SELMA MARIA DE JESUS

ANA MARIA MENGUE

Que nos atendem sempre com muita gentileza e dedicação

Meus mais sinceros agradecimentos

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Adj. SERGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA, a quem devo toda a minha admiração.

Meus mais sinceros agradecimentos pela dedicação, paciência, competência e disponibilidade em orientar esta tese e pela amizade e ensinamentos diários.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Adj. LEONARDO A. M. ZORNOFF, pela participação dedicada na co-autoria desta tese, por todos os ensinamentos, apoio e amizade.

Ao Dr. MARCOS MINICUCCI, pela amizade sincera e pelo auxílio em todas as etapas da realização desta tese.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Hipótese	7
3. Objetivos	9
4. Material e Métodos	11
5. Resultados	26
6. Discussão	62
7. Conclusões	73
8. Resumo	75
9. Abstract	78
10.Referências Bibliográficas	81

LEGENDA DAS TABELAS E FIGURAS

Legenda das Tabelas

Tabela 1. Perfil das matrizes que geraram os animais do estudo	31
Tabela 2. Perfil dos animais estudados: ratas criadas até a idade adulta	31
Tabela 3. Quantificação da vitamina A no soro e tecidos, por cromatografia líquida de alta eficiência	31
Tabela 4. Estudo morfofuncional <i>in vivo</i> por meio de ecocardiografia	32
Tabela 5. Estudo funcional <i>in vitro</i> por meio do coração isolado	32
Tabela 6. Estudo morfométrico por meio da pesagem dos tecidos	33
Tabela 7. Estudo histopatológico por microscopia óptica: área seccional dos miócitos e porcentagem de colágeno	33
Tabela 8. Estudo do estresse oxidativo cardíaco: lipoperoxidação, sistemas antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos	34
Tabela 9. Estudo do estresse oxidativo hepático: lipoperoxidação, sistemas antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos	34
Tabela 10. Estudo do metabolismo energético cardíaco	34

Legenda das Figuras

Figura 1.	Mediana e intervalo interquartil dos pesos das ratas controle e RvitA, com 21 dias de vida, no momento do desmame	35
Figura 2.	Média e desvio padrão das ingestões de dieta por animal, ajustado pelo peso corporal, por dia	36
Figura 3.	Média e desvio padrão do peso das ratas adultas no momento da eutanásia	37
Figura 4.	Mediana e intervalo interquartil da idade das ratas adultas no momento da eutanásia	38
Figura 5.	Média e desvio padrão da dosagem da vitamina A total hepática das fêmeas recém-nascidas, por cromatografia líquida de alta eficiência	39
Figura 6.	Média e desvio padrão da dosagem do retinol sérico das ratas adultas, por cromatografia líquida de alta eficiência	40
Figura 7.	Média e desvio padrão da dosagem da vitamina A total hepática das ratas adultas, por cromatografia líquida de alta eficiência	41
Figura 8.	Média e desvio padrão da dosagem da vitamina A total cardíaca das ratas adultas, por cromatografia líquida de alta eficiência	42
Figura 9.	Média e desvio padrão da medida do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo realizada por ecocardiografia	43
Figura 10.	Média e desvio padrão da medida do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo realizada por ecocardiografia	44
Figura 11.	Média e desvio padrão da razão entre as medidas do diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta, realizadas por ecocardiografia	45
Figura 12.	Média e desvio padrão da razão entre as medidas da espessura da parede posterior e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, realizadas por ecocardiografia	46
Figura 13.	Média e desvio padrão da avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo por meio da porcentagem de encurtamento realizada por ecocardiografia	47
Figura 14.	Média e desvio padrão da avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo por meio da fração de ejeção realizada por ecocardiografia	48
Figura 15.	Média e desvio padrão da massa do ventrículo esquerdo realizada por ecocardiografia	49
Figura 16.	Média e desvio padrão da primeira derivada positiva de pressão obtida por meio do estudo do coração isolado	50
Figura 17.	Média e desvio padrão do peso do ventrículo esquerdo	51

Figura 18. Média e desvio padrão da área seccional dos miócitos obtida por microscopia óptica, em lâminas coradas com hematoxilina e eosina	52
Figura 19. Média e desvio padrão da porcentagem de colágeno obtida por microscopia óptica de lâminas coradas com picrosirius vermelho .	53
Figura 20. Mediana e intervalo interquartil da medida do estresse oxidativo por meio da quantificação da formação de hidroperóxidos de lipídeos no tecido cardíaco	54
Figura 21. Mediana e intervalo interquartil da avaliação do estresse oxidativo obtida pela razão entre a formação de hidroperóxidos de lipídeos e a capacidade antioxidante total, no tecido cardíaco .	55
Figura 22. Média e desvio padrão da avaliação do estresse oxidativo obtida por meio da quantificação da formação de hidroperóxidos de lipídeos no fígado	56
Figura 23. Média e desvio padrão da avaliação do estresse oxidativo obtida pela razão entre a formação de hidroperóxidos de lipídeos e a capacidade antioxidante total, no tecido cardíaco	57
Figura 24. Média e desvio padrão da avaliação do estresse oxidativo obtida pela dosagem da enzima superóxido dismutase, no tecido hepático	58
Figura 25. Média e desvio padrão da avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem da enzima beta hidróxiacil coenzima-A desidrogenase	59
Figura 26. Média e desvio padrão da avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem da enzima lactato desidrogenase .	60
Figura 27. Média e desvio padrão da avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem da enzima citrato sintase	61

1. INTRODUÇÃO

Vitamina A é o termo nutricional usado para denominar compostos lipídicos solúveis, que são estruturalmente relacionados com retinol-álcool lipídico ⁽¹⁾. Há três principais compostos considerados vitamina A: retinol (álcool), retinal (aldeído) e ácido retinóico (ácido carboxílico). Existem ainda, os metabólitos do ácido retinóico e os ésteres retinílicos. Estes ésteres são a forma de estoque da vitamina A e também são encontrados nos quilomicrons. Os compostos com atividade biológica são o retinal, o ácido retinóico e os metabólitos polares do ácido retinóico ⁽²⁾. O retinal atua na retina por meio da transdução da luz para sinais neurais, necessário à visão. Praticamente todas as outras ações da vitamina A se devem ao ácido retinóico e seus metabólitos.

A vitamina A exerce papel fundamental em múltiplos processos que envolvem síntese protéica, diferenciação celular e desenvolvimento tecidual, como cicatrização, epitelização, reprodução, embriogênese e imunidade. A diversidade da ação desta vitamina se deve, em grande parte, ao ácido retinóico que é considerado como hormônio de ação pleiotrópica. Assim, ao se ligar a receptores nucleares da superfamília esteróide/retinóide/tireóide/vitamina D, o ácido retinóico modula a transcrição de genes envolvidos em diversos processos fisiológicos. Estes receptores estão presentes em todos os tecidos, incluindo o coração ^(2,3).

Sabe-se que a vitamina A exerce papel fundamental na diferenciação e desenvolvimento celular durante a fase embrionária cardíaca. Neste período são descritas malformações cardíacas como anormalidades do arco aórtico, ducto arterioso patente, defeitos do septo interventricular e afinamento das paredes ventriculares em ratos filhos de mães deficientes de vitamina A ⁽⁴⁾. Além disso, Dyson et al, mostraram que embriões de camundongos mutantes com deleção do receptor do ácido retinóico apresentaram baixa fração de ejeção cardíaca, com aumento da miosina de cadeia leve (MLC2), defeitos no septo e bloqueios atrioventriculares ⁽⁵⁾.

Após o nascimento, a vitamina A continua sendo importante para a manutenção da estrutura e função do coração e sua suplementação parece ser benéfica como atenuante da remodelação cardíaca. Smith & Dickman, em artigo de revisão, listam genes que são modulados pela vitamina A no sistema

cardiovascular. Em resposta a esta ativação genética ocorre síntese de proteínas contráteis, de fatores de transcrição, de estruturas da matriz extracelular, de proteínas da comunicação intercelular e de hormônios ⁽⁴⁾.

Alguns estudos mostram que existe participação da vitamina A sobre os processos fisiopatológicos cardíacos como a remodelação ^(6,7,8). A remodelação é desencadeada por alguma agressão ao coração, caracteriza-se por alterações celulares, intersticiais e bioquímicas que modificam forma, geometria e massa cardíaca ⁽⁹⁾. Estes danos estruturais cardíacos podem causar disfunção diastólica e/ou sistólica do coração.

A administração de ácido retinóico foi capaz de atenuar algumas vias envolvidas na remodelação cardíaca, com diminuição da hipertrofia em miócitos submetidos a estímulos humorais como endotelina e angiotensina II ^(6,7,8). Em modelos experimentais de agressão *in vivo*, por infarto agudo do miocárdio e hipertensão arterial, o fornecimento de ácido retinóico ao animal atenuou a remodelação cardíaca ^(10,11,12). No rato normal, o fornecimento de dose fisiológica de ácido retinóico promoveu hipertrofia cardíaca com melhora da função ⁽¹³⁾.

Sendo assim, o coração pode ser considerado um dos órgãos-alvos que sofrem ação da vitamina A. No entanto, pouco se sabe sobre a influência da deficiência de vitamina A no coração após o nascimento.

Oliveros et al. mostraram que ratos Wistar, que receberam dieta isenta de vitamina A, apresentaram maior estresse oxidativo cardíaco ⁽¹⁴⁾. Em tecidos não cardíacos como músculo esquelético e rins, a deficiência marginal de vitamina A induzida por dietas pobres deste nutriente, alteram estruturas musculares e matriz extracelular ^(15,16). A deficiência marginal de vitamina A reduziu a expressão da miosina de cadeia pesada α e de fatores reguladores da miogênese relacionados com desenvolvimento muscular e contratilidade da musculatura esquelética de ratos ⁽¹⁵⁾. A deficiência marginal de vitamina A também diminuiu a atividade de metaloproteases 2 e 9 na membrana basal renal levando ao aumento do colágeno tipo IV, que pode predispor ao mau funcionamento e a doenças renais ⁽¹⁶⁾.

Assim, os estudos experimentais citados evidenciam que deficiência marginal de vitamina A é fator agressor ao coração aumentando o estresse

oxidativo. No entanto, não se sabe se existe repercussão na estrutura e função cardíaca, ou seja se é capaz de desencadear remodelação ⁽¹⁴⁾. Existe a possibilidade das alterações bioquímicas em metaloproteases e proteínas contráteis encontradas em tecidos não cardíacos, também ocorrerem no coração, mas ainda não existem dados a este respeito.

A deficiência de vitamina A é caracterizada por depleção de seus estoques hepáticos associada à redução dos níveis de retinol sérico (inferiores a 0,35 $\mu\text{mol/L}$). Esta deficiência manifesta-se por alterações em órgãos e tecidos com alto grau de diferenciação e desenvolvimento tecidual. Assim, cegueira noturna, xeroftalmia, infertilidade, imunossupressão e malformações no período embrionário, são as manifestações clássicas desta ⁽¹⁾. Existe, por sua vez, deficiência menos grave, que é denominada deficiência marginal ou subclínica. Nesta situação, os estoques hepáticos também estão depletados, mas a retinolemia encontra-se entre 0,35 e 0,7 $\mu\text{mol/L}$ ⁽¹⁾. Os sintomas e sinais clássicos da deficiência de vitamina A não são evidentes, mas nos últimos 25 anos, a deficiência marginal de vitamina A tem sido apontada como importante causa de infecções e mortalidade infantil ^(17,18).

A deficiência de vitamina A é considerada problema de saúde pública em mais de 60 países. A prevalência é alta em regiões como a Ásia, África e América Latina ⁽¹⁸⁾. No Brasil, a deficiência de vitamina A foi registrada em grupos populacionais de vários Estados brasileiros (Amazonas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina), em várias capitais de Estados, em grandes cidades como Ribeirão Preto e Campinas e em cidades menores ^(19,20). Os principais grupos populacionais atingidos pela deficiência de vitamina A são as crianças e as gestantes. Além delas, a deficiência pode ser detectada na população adulta ^(19,21).

Em publicação do Subcomitê de Nutrição das Nações Unidas (*Third Report on the World Nutrition Situation* (1997) é mencionado que a deficiência de vitamina A tem como causa habitual a baixa ingestão deste nutriente em relação aos requerimentos, e que a causa subjacente do consumo inadequado e das necessidades elevadas está relacionada à pobreza ⁽¹⁸⁾. O *Fourth Report on the World Nutrition Situation* ressalta o fato da deficiência de vitamina A estar ligada

a natureza dos alimentos e às práticas alimentares ⁽²²⁾. Outros fatores como diminuição da ingestão de lípidos e infestação intestinal parasitária contribuem para menor absorção desta vitamina ⁽²⁰⁾. No Brasil, os inquéritos de consumo alimentar mostram que 60% da população ingere menos de 50% das necessidades de vitamina A ⁽²⁰⁾.

O fígado é o órgão responsável por estocar (50% a 80%) ou disponibilizar a vitamina A de acordo com as necessidades do organismo. Este processo se deve ao “feedback” realizado pelo ácido retinóico. Desta forma se houver redução do ácido retinóico, existe inibição da enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT) e aumento da conversão do éster retinílico em retinol ⁽¹⁾. A vitamina A é transportada no plasma ligada a proteínas transportadoras, nas formas de retinol, ligado ao “retinol binding protein” (RBP) e a transtiretina (TTR), de ácido retinóico, ligado a albumina e de ésteres retinílicos, ligados a lipoproteínas ⁽²³⁾. Em situações de carência extrema, em que os estoques hepáticos estão depletados, o nível sérico de retinol diminui, reduzindo a formação de ácido retinóico, favorecendo o aparecimento das manifestações clínicas clássicas ⁽¹⁾. A forma de transporte de vitamina A para os tecidos pelos quilomicrons, apresenta grande variação, por dependerem da ingestão alimentar do composto e não da concentração de ácido retinóico ou dos estoques hepáticos ⁽²⁴⁾.

A vitamina A proveniente da dieta, sob a forma de éster retinílico, é absorvida pelos enterócitos, sofre ação da enzima retinol hidrolase convertendo-se em retinol, que é novamente re-esterificado pela LRAT em éster retinílico, que será um dos componentes dos quilomicrons. Estes são secretados na linfa, atingem a circulação sanguínea e os tecidos. Em situações de redução da ingestão de vitamina A, o transporte deste composto, realizado pelos quilomicrons estará reduzido ^(1,24).

Ross & Li observaram, em estudo experimental, que animais submetidos à restrição alimentar de vitamina A, e com retinolemia adequada, apresentaram níveis pulmonares de vitamina A reduzidos. As autoras sugerem a hipótese que a redução da vitamina A no pulmão ocorreu, provavelmente, pela diminuição do transporte pelos quilomicrons ⁽²⁴⁾. Assim, existe a possibilidade da

redução da ingestão de vitamina A promover diminuição tecidual deste composto, mesmo antes de ocorrerem baixos níveis de retinol sérico e hepático.

No entanto, permanece por ser estabelecido, se estes níveis teciduais de vitamina A inadequados podem acometer outros órgãos, como o coração, e se representam riscos de lesão e disfunção tecidual.

Portanto, a vitamina A em quantidades fisiológicas e sua suplementação interferem com a estrutura e função cardíacas. A ingestão inadequada deste nutriente atinge mais da metade da população brasileira, o que pode levar a baixos níveis teciduais desta vitamina, mesmo na ausência de deficiência da mesma. Estudos sugerem que a restrição de vitamina A pode levar ao aumento do estresse oxidativo, podendo assim, prejudicar a manutenção da integridade cardíaca e desencadear ou acentuar o processo de remodelação.

2. HIPÓTESE

Formulamos a hipótese que a restrição alimentar de vitamina A, na ausência de retinolemia sérica reduzida induz remodelação cardíaca.

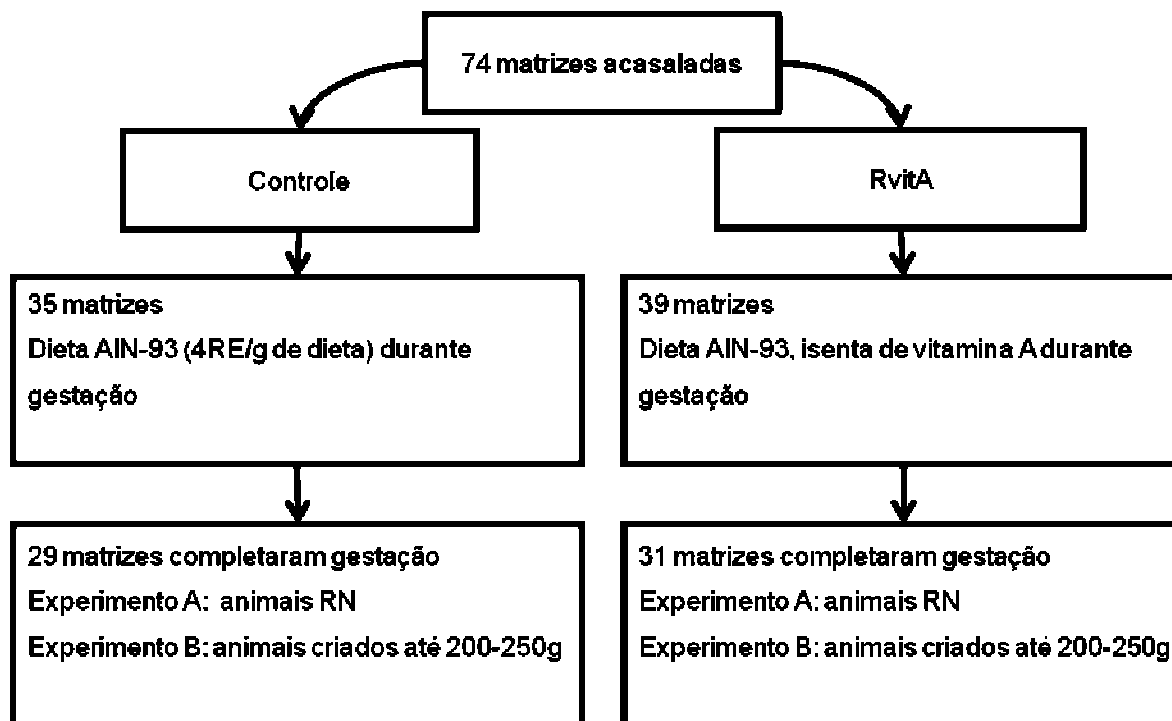
3. OBJETIVO

Avaliar a influência da restrição alimentar de vitamina A sobre remodelação cardíaca em ratos, por meio de variáveis bioquímicas, celulares, intersticiais e morfofuncionais e verificar o papel do estresse oxidativo como um dos mecanismos deste processo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

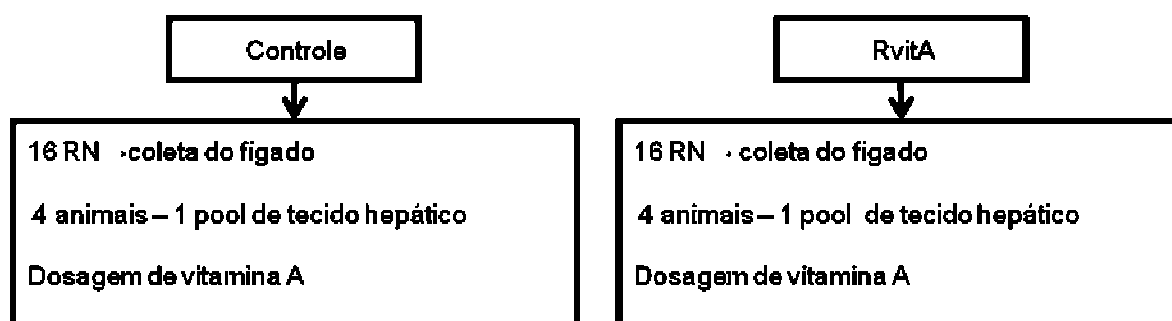
4.1 Delineamento Experimental

O projeto da pesquisa foi conduzido após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (Protocolo 511)



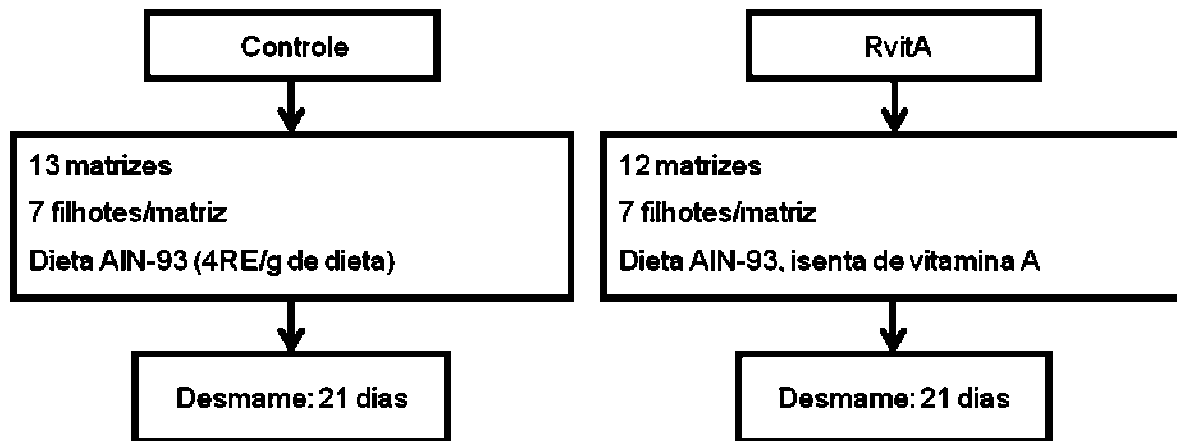
RvitA: animais com restrição alimentar de vitamina A; RE/g: equivalente de retinol por grama; RN: recém-nascidos; AIN-93: dieta purificada, quimicamente definida (American Institute of Nutrition - 93)

Experimento A: Dosagem da vitamina A no fígado dos RN

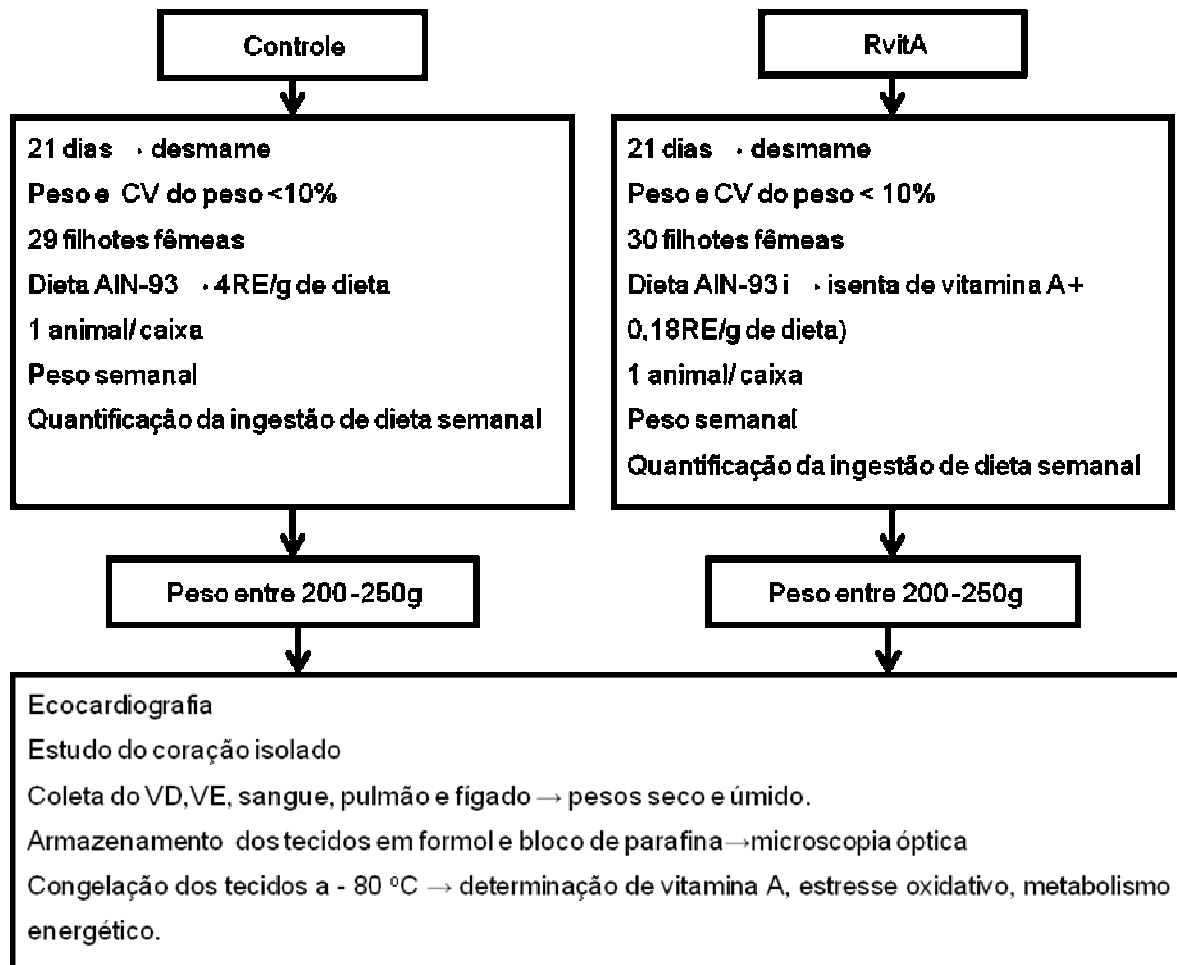


Experimento B

B.1: Lactação



B.2: Pós-desmame



VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo

4.2 Animais e restrição alimentar de vitamina A

Foram estudadas ratas, Wistar, filhas de mães previamente hígdas. Aos noventa dias de idade foram acasaladas 4 fêmeas por macho. O acasalamento foi confirmado pela presença de espermatozóides em lâmina de secreção vaginal das mães e a presença de óvulos maduros. Após a confirmação do acasalamento, as ratas foram aleatoriamente alocadas em dois grupos: controle considerada adequada para estes animais e grupo com restrição de vitamina A (RvitA), que recebeu dieta isenta de vitamina A.

As dietas utilizadas para as fases de gestação, lactação e crescimento dos filhotes foram baseadas segundo as recomendações da American Institute of Nutrition - 93 (AIN-93) ⁽²⁵⁾. O grupo controle recebeu a dieta AIN-93 contendo quantidade suficiente de vitamina A (4RE/g de dieta) e o grupo RvitA recebeu dieta AIN-93 isenta de vitamina A. Semanalmente, foi quantificada a ingestão de dieta de cada matriz por período de 24 horas.

Ao nascimento, foram verificados número de gestações completas e número de filhotes que cada mãe gerou. Foram eutanasiados 16 recém-nascidos de cada grupo para dosagem da vitamina A hepática, com finalidade de verificar se houve deficiência vitamínica intra-útero (experimento A). Alguns filhotes foram excluídos, para que cada matriz criasse 7 animais, com livre acesso à água e à dieta. Este procedimento foi realizado para garantir o acesso semelhante dos filhotes ao leite materno.

Os animais foram condicionados no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu; expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas e à temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Ao completarem 21 dias de vida, os filhotes foram desmamados. Logo após o desmame as mães foram pesadas e submetidas à eutanásia. Os filhotes do sexo feminino foram considerados para este estudo. Estas fêmeas foram pesadas no momento do desmame e calculado o coeficiente de variação ($\text{CV} = \text{desvio padrão}/\text{média}$) do peso. Foram consideradas para o estudo as fêmeas cujo peso estivesse dentro do CV de 10%. Esta medida de peso foi tomada como indicador de homogeneidade do

grupo. Os animais que apresentaram valores de peso corporal fora dos intervalos estabelecidos foram excluídos.

Vinte e nove fêmeas cujas mães receberam dieta adequada em vitamina A compuseram o grupo controle e continuaram recebendo a mesma dieta após o desmame. Trinta fêmeas cujas mães receberam dieta isenta de vitamina A formaram o grupo RvitA, e passaram a receber AIN-93 isenta de vitamina A, acrescida de 0,18RE/g de dieta (experimento B).

Cada filhote foi colocado em caixa individual, com livre acesso à água e à dieta. Medidas como ingestão alimentar por período de 24 horas e peso corporal foram aferidos semanalmente. Para a verificação da ingestão alimentar foram sorteadas 12 fêmeas do grupo controle e 14 do grupo RvitA. A dieta foi pesada, em gramas, e oferecida aos animais. Após 24 horas, o que restou foi novamente pesado. A diferença entre a dieta oferecida e o restante em 24 horas, foi dividida pelo peso corporal dos animais em kg. Este procedimento foi realizado semanalmente e neste trabalho foi utilizada a média das ingestões de cada animal.

O modelo acima foi adaptado de Gardner & Ross ⁽¹⁷⁾. Recentemente Ross & Li utilizaram modelo semelhante ao realizado em nosso estudo constando da redução de ingestão de vitamina, com retinolemia mantida e diminuição de vitamina A no tecido pulmonar ⁽²⁴⁾.

Os dois grupos foram acompanhados até os animais atingirem peso entre 200 e 250 g, quando foram estudados por meio de ecocardiografia, estudo funcional pelo coração isolado, dosagens bioquímicas e microscopia óptica.

4.3 Estudo Funcional

Estudo “in vivo”

O estudo foi realizado por meio de doppler-ecocardiografia transtorácica convencional com equipamento Phillips (TDI 5500) dotado de transdutor eletrônico setorial multifrequência (7,5 a 12 MHz), seguindo-se a padronização descrita na literatura ⁽²⁶⁾.

Doze fêmeas controle e 15 Rv1A foram anestesiadas com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) por via intramuscular, seguido de tricotomia da região anterior do tórax. Após estes procedimentos os animais foram posicionados em decúbito dorsal para realização do ecocardiograma. Foram analisadas imagens monodimensionais obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, obtida com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo-M passando pelas válvulas da valva aórtica. As medidas, em milímetros, do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), espessura da parede posterior (PP), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetro da aorta (AO) foram realizadas, por meio do cursor do próprio equipamento, durante o exame. Três a cinco ciclos consecutivos foram utilizados para a realização das medidas, obtendo-se a média aritmética em seguida. As imagens dos registros das câmaras ventriculares, modo M, foram arquivadas para eventuais consultas posteriores.

Os fluxos diastólico transmitral e sistólico transvalvar aórtico foram obtidos com o transdutor colocado nas posições apicais quatro e cinco câmaras, respectivamente, permitindo as medidas da onda E (E)(cm/s), onda A (A) (cm/s), velocidade máxima do fluxo sanguíneo na via de saída do ventrículo esquerdo (VAO) (cm/s). A frequência cardíaca (FC) foi estimada pelo tempo entre dois batimentos consecutivos. O tempo entre, o final da ejeção e o início do enchimento diastólico ventricular, corresponde ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI) (ms). Essa variável foi normalizada pela frequência cardíaca, conforme fórmula abaixo. As medidas referentes aos fluxos também foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, obedecendo a mesma sistemática descrita acima.

As outras variáveis derivadas de formulações, a partir das medidas realizadas estão descritas abaixo:

- PP/DDVE
- AE/AO
- MVE = $\{ \{ [DDVE + (2 \times PP)]^3 - (DDVE)^3 \} \times 1,04 \} / 1000$ (g), sendo MVE a massa do ventrículo esquerdo.
- FE = $(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3$, sendo FE a fração de ejeção do ventrículo esquerdo.
- %E = $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$ (%), sendo %E a porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo
- TR_{Ic} = TRI/\sqrt{RR} (ms), sendo TR_{Ic} o tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido e RR o tempo em milissegundos entre dois batimentos consecutivos.

O estudo “in vivo” possibilitou avaliar a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo além de permitir acesso aos indicadores de remodelação cardíaca como massa miocárdica e dimensão das câmaras ⁽²⁶⁾.

Estudo “in vitro”

Após o estudo ecocardiográfico, 9 animais controle e 11 animais RvItA, que foram submetidos ao ecocardiograma, receberam pentobarbital sódico (50 mg/kg) e heparina (1000 UI) por via intraperitoneal e ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto, as carótidas foram ligadas e a aorta cateterizada com cânula de metal número 15, iniciando-se a perfusão miocárdica retrógrada, com solução nutriente de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição, em mmol/l: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 2,5 CaCl₂; 1,15 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11 glicose. A solução acima foi acrescida de insulina 10 UI/l e manitol, na concentração de 8 mmol, para assegurar maior preservação miocárdica ⁽²⁷⁾. Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sakhs Elektronik-Germany), com pressão de perfusão constante de 75 mmHg. A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de CO₂, mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 500-600 mmHg, à

temperatura de 37 °C e pH entre 7,3 e 7,4. O átrio esquerdo foi aberto e o ápice do ventrículo esquerdo puncionado com agulha, para drenar a cavidade ventricular, evitando-se acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de látex, atado ao tubo de polietileno PE 90, foi colocado na cavidade ventricular. A outra extremidade do tubo de polietileno foi conectada a uma torneira de 3 vias, sendo uma das vias acoplada a um transdutor de pressão (Stathan P23 XL) e a outra, a uma seringa de 1 ml, que permite a variação do volume do balão intracavitário. A musculatura atrial direita, compreendendo o nódulo sinoatrial foi extirpada e um eletrodo de marcapasso artificial colocado no miocárdio do ventrículo direito para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca de 250. Por meio da preparação descrita, foram obtidas curvas de Starling com infusão de líquido no balão, elevando a pressão diastólica do ventrículo esquerdo de 0 a 25 milímetros de mercúrio, com incrementos graduais de 5 milímetros, registrando-se a pressão sistólica correspondente a cada variação de volume. Nesta preparação, em que o coração opera em condições isovolumétricas, a pressão desenvolvida (pressão sistólica menos a pressão diastólica) foi utilizada como indicadora da capacidade contrátil. Foram registradas, também, a primeira derivada positiva de pressão e a derivada negativa de pressão. Esses índices servem, respectivamente, como parâmetros de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo ⁽²⁸⁾.

A partir do volume do balão para pressão diastólica de 0 mmHg, foram acrescentadas 20 µL, de líquido no balão e registradas as pressões sistólicas e diastólicas. Com estes dados foram obtidas as curvas da relação pressão- volume sistólicas e diastólicas. Foram calculados, ainda, estresse σ / deformação (ϵ) sistólicos e diastólicos por meio das fórmulas:

$$\sigma = [1,36 \times P_{iVE} \times VVE^{2/3}] / [(VVE + 0,943 \times PeVE)^{2/3} - VVE^{2/3}];$$

$$\epsilon = \{ [VVE^{1/3} + (VVE + 0,943 \times PeVE)^{1/3}] / V_0^{1/3} + (V_0 + 0,943 \times PeVE)^{1/3} - 1 \} \times 100$$

(P_{iVE} : pico de pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo; VVE: volume do ventrículo esquerdo; $PeVE$: peso em gramas do ventrículo esquerdo; V_0 : volume do ventrículo esquerdo na pressão diastólica de 0mmHg)

Estes cálculos permitem a avaliação do miocárdio de forma unidimensional, permitindo a comparação entre ventrículos de tamanhos e pesos diferentes. As relações entre pressões e volumes fornecem dados sobre a função da câmara

cardíaca como um todo, tanto em sua função sistólica, quanto em sua função diastólica. O estresse / deformação sistólico evidencia a relação entre tensão sistólica e estiramento. Assim na sístole, pode ser parâmetro de contratilidade do músculo e na diástole, de complacência do músculo. Portanto, o estresse/deformação são variáveis indicativas de função sistólica e diastólica⁽²⁸⁾.

4.4 Coleta de Material Biológico

Os 16 animais recém-nascidos (experimento A) do sexo feminino, de cada grupo foram eutanasiados, no primeiro dia de nascimento, por decaptação. Destes animais foram coletados o fígado. Cada 4 animais forneceram tecido hepático para 1 pool de fígado, devido à necessidade de obtenção de 200 mg de tecido para dosagem da vitamina A. Cada pool foi congelado a - 80°C.

Dos animais adultos submetidos ao estudo do coração isolado foram coletados sangue, antes da retirada do coração, fígado e pulmão. Os corações destes animais, após o estudo, foram dissecados, separando-se o ventrículo esquerdo (VE) do ventrículo direito (VD), para armazenamento e não foram utilizados para aferição de peso dos tecidos ou teor de água, já que foram perfundidos de forma artificial por solução nutritiva. Os 20 animais controle e 19 animais RvitA não submetidos ao estudo do coração isolado, foram eutanasiados por meio da administração de pentobarbital sódico (50 mg/kg) intraperitoneal. Destes animais foram coletados sangue, pulmão, fígado e coração.

O sangue de todos os animais foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro que foi congelado a - 80°C.

Os fígados e pulmões de todos os animais e VE, VD e átrio esquerdo dos 20 animais controle e 19 animais RvitA, não submetidos ao estudo do coração isolado, foram rapidamente lavados em soro fisiológico para retirada do sangue. Estes tecidos foram divididos em fragmentos utilizados para peso tecidual, teor de água, armazenamento em formol e congelação a -80°C.

Foram realizadas as pesagens do VE, VD e átrios totais, após a dissecação dos corações dos animais não submetidos ao estudo do coração isolado. Em seguida o VE foi seccionado a 4 mm da ponta, em um fragmento de 3 mm de

espessura, colocado em formol. A base do VE e a ponta, seccionada em 2 fragmentos, foram congeladas a -80°C , em 3 frascos individuais. O VD foi seccionado em 2 fragmentos, um deles armazenado em formol e outro utilizado para a medida do teor de água. Os átrios foram utilizados apenas para a medida do teor de água.

Os pulmões e fígados foram seccionados em 3 fragmentos: para medida do teor de água, armazenamento em formol e congelação a -80°C .

O teor de água (T_a) destes tecidos foi calculado por meio de medida do peso do fragmento do tecido, após a dissecação, chamado de peso úmido (P_u) e da medida do peso, do mesmo fragmento, após 24 horas em estufa a 37°C , chamado de peso seco (P_s). Assim, $T_a = (P_u - P_s)/P_u$.

O formol utilizado para o armazenamento foi o tamponado (formol 100%, água deionizada, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico). Os tecidos ficaram nesta solução por 24 horas, depois foram lavados em água corrente por mais 24 horas e posteriormente colocados em álcool 70%. Em seguida foram parafinizados em blocos, dos quais posteriormente foram realizadas as lâminas para estudo histopatológico.

Os tecidos congelados em freezer a -80°C , foram processados para as dosagens bioquímicas de vitamina A, do estresse oxidativo e do metabolismo energético como descrito abaixo.

4.5 Estudo Bioquímico e Histopatológico

4.5.1 Determinação da Vitamina A em Soro e Tecidos

A vitamina A foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) das amostras armazenadas a -80°C . No soro, dosou-se o retinol. No fígado e coração, dosou-se o retinol obtido após a saponificação de toda vitamina A existente no tecido, incluindo os estoques de ésteres retinílicos. Portanto, chamamos de retinol sérico, a vitamina A encontrada no soro e vitamina A total, a encontrada nos tecidos hepáticos e cardíacos.

As amostras para a dosagem de retinol no soro foram preparadas a partir de aliquotas de 200 μ l de soro de 8 animais controle e 5 animais Rvita. O retinol foi extraído pelo método descrito por Tang et al. em 1993 ⁽²⁹⁾: 200 μ l de soro foram tratados com 2 ml de solução clorofórmio: metanol (2:1, v/v). Cento e cinquenta μ L de padrão interno (acetato de retinila) e 500 μ L de soro fisiológico (8,5 g NaCl/l água) foram adicionados em seguida. Os tubos contendo solução soro-clorofórmio-metanol-soro fisiológico foram agitados por 1 minuto em agitador "vortex". Após, realizou-se centrifugação em 3500 rpm, a temperatura de 4°C, por 10 minutos. A película de clorofórmio (camada de baixo) formada foi transferida para tubo de vidro de 13 x 100 mm e ficou reservada. Ao restante da amostra, isto é, à película aquosa, foram adicionados 3 mL de hexano. Os tubos contendo hexano - soro fisiológico foram agitados durante 1 minuto e centrifugados em 3500 rpm a 4°C por 10 minutos; a película de hexano (parte superior) foi transferida para o mesmo tubo de vidro de 13 x 100 mm, contendo a película de clorofórmio. As duas películas extraídas foram combinadas e submetidas à evaporação por meio de gás nitrogênio estando os tubos, durante esse procedimento, em banho-maria a 40°C. O resíduo foi ressuspensão em 150 μ L de etanol, agitado e "sonicado" por 30 segundos; 50 μ L da amostra obtida foram injetadas no cromatógrafo.

As amostras do fígado e coração foram preparadas a para se obter peso de aproximadamente 200 mg. Foram utilizados tecidos hepáticos de 16 animais recém-nascidos de cada grupo, armazenados em 4 pools cada um contendo o fígado de 4 animais e de 8 animais adultos controle e 5 animais adulto Rvita. Os tecidos cardíacos utilizados foram provenientes de 5 animais de cada grupo. A vitamina A total foi extraída utilizando o método modificado de Yeum et al. ⁽³⁰⁾. Os fragmentos da ponta do ventrículo esquerdo foram cortados em pequenos pedaços e em seguida adicionaram-se 100 μ L de pirogalol a 12% (em etanol), 300 μ L de hidróxido de potássio a 30% (em água) e 1,0 mL de etanol. A mistura foi agitada durante 10 segundos em baixa velocidade em agitador "vortex". Logo após, as amostras foram incubadas a 37°C durante duas horas, sob agitação contínua, estando os tubos cobertos com parafilme. Passado esse tempo, resfriou-se a mistura a temperatura ambiente e foi adicionado 1,0

mL de água. Imediatamente após, as amostras foram agitadas por 10 segundos. Na seqüência, adicionou-se 100 µL de padrão interno (equinenona) e 3,0 mL de éter-hexano (2:1, com 1% de etanol); a mistura foi agitada por 40 segundos e, posteriormente, centrifugada (3000 rpm) por 5 minutos. Logo após este período, transferiu-se a película de éter-hexano para outro tubo de vidro e novamente foram adicionados 2,0 mL de éter-hexano. Após centrifugação, obteve-se, a mesma película de éter-hexano. Adicionaram-se 2,0 mL de água ao extrato de éter-hexano, agitou-se e centrifugou-se (3000 rpm) o material por 5 minutos. Transferiu-se a película de éter-hexano obtida para o mesmo tubo de vidro contendo a primeira película. Os tubos contendo a película éter-hexano foram colocados em banho-maria 40°C e os solventes evaporados por meio de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em 100 µL de etanol; o tubo foi agitado e sonificado por 30 segundos; 50 µL de amostra foram injetados no cromatógrafo.

As condições operacionais para o método estão descritas a seguir. A coluna utilizada foi a de carbono 18 (C₁₈) Pecosphere-3. O comprimento da onda do detector foi fixado em 325 nm para determinação do retinol. Este método usou duas soluções, cada uma infundida por uma bomba de infusão, com a finalidade de se estabelecer gradiente entre: solvente A - tetrahidrofurano (THF): acetonitrilo: água (20:50:30, v/v/v), com acetato de amônio 1% na água; solvente B - tetrahidrofurano (THF) : acetonitrilo : água (44:50:6, v/v/v, com acetato de amônio 1% na água). O fluxo total foi de 1 mL / min. durante todo o procedimento analítico, à temperatura de 25°C. Inicialmente, após a injeção da amostra, do tempo zero até dois minutos, foi bombeada a fase móvel, na seguinte proporção: 85% do solvente A e 15% do solvente B. No fim do segundo minuto, aumentou-se a infusão da bomba "B"; mantendo o aumento linear do solvente B por sete minutos; neste tempo, a concentração do solvente B passou a 83%. No tempo 16 minutos, realizou-se outro aumento linear do solvente B por três minutos; neste tempo, a concentração do solvente B chegou a 100%. Após, realizou-se aumento linear de 1 minuto do solvente A para o retorno às concentrações de 85% do solvente A e 15% do solvente B. A corrida terminou no tempo de 20 minutos. Aguardou-se, então, mais sete minutos, que é tempo suficiente para estabilizar novamente a coluna, possibilitando novas

determinações. O retinol foi adequadamente separado por este método. Quantificaram-se os cromatogramas pela comparação entre as relações de área da substância/área do padrão interno (acetato de retinila, na dosagem de retinol sérico e equinenona na dosagem de vitamina A total do fígado e coração), obtidas na análise do soro ou do tecido do animal e da amostra da solução padrão. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar ($E = DO/g^{1\%}_{1cm}$).

4.5.2 Estresse Oxidativo Cardíaco e Hepático

As amostras do ventrículo esquerdo e fígado foram descongeladas e homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para análise do estresse oxidativo e de enzimas marcadoras das vias metabólicas. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma (St. Louis, MO, USA).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) foi determinada através da oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio e cumene hidroperóxido⁽³¹⁾. A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada através da alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e fenazina metassulfato em pH fisiológico. Leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca a 560nm⁽³²⁾. A atividade enzimática da catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 15 μ L de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm⁽³³⁾.

As substâncias antioxidantes totais (SAT) ou capacidade antioxidante total foram determinadas através da capacidade de antioxidantes inibirem a oxidação de ácido 2,2'- azinobis (3-etilbenzetiazilcolina-sulfônico) (ABTS, Sigma)

⁽³⁴⁾ e a concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) foi determinada através da oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido. Leituras foram realizadas a 560nm ⁽³⁵⁾

4.5.3 Metabolismo Energético

O metabolismo energético cardíaco foi determinado através das atividades das enzimas lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27), β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase (OHADH, E.C. 1.1.1.35) e da citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) ⁽³⁶⁾. A atividade da LDH foi determinada pela oxidação do NADH a 340nm, tendo o piruvato como substrato. A atividade da OHADH foi determinada no coração em meio contendo acetoacetil coenzima A 0,05 mM e NADH 0,1 mM. A atividade da CS foi determinada em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo acetil CoA 0,1 mM, dithiobis-2-nitrobenzoato 0,1 mM (DTNB-Sigma) e oxaloacetato 0,5 mM. Nesse estudo também foi determinada a concentração de proteínas totais. As ligações peptídicas das proteínas reagem com íon cúprico em meio alcalino resultando em um complexo de cor violeta com máxima absorvância a 540nm, cuja intensidade é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra. Como padrão foi utilizada uma solução de albumina bovina ^(37,38).

4.5.4 Estudo histopatológico

As lâminas foram processadas. Seccionando-se o bloco de parafina em cortes de 5 micrometros de espessura. Foram fixadas com hematoxilina-eosina e com coloração específica para colágeno que é o picrossirius vermelho (Sirius red F3BA em saturação aquosa de ácido pícrico). A área seccional dos miócitos foi determinada pela média das medidas, das áreas de aproximadamente 100 miócitos, por lâmina, corada com hematoxilina-eosina. As medidas foram realizadas utilizando o microscópio Leica (lente com aumento de 40 vezes), ligado à câmera conectada a um computador com um software de análise das imagens.

(Image-Pro Plus 3,0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Os miócitos escolhidos tinham o núcleo central, em corte transversal, e foram medidos através do contorno gerado pelo cursor na tela do computador⁽¹³⁾.

A porcentagem de colágeno intersticial foi determinada nas lâminas coradas com picrossirius vermelho, no mesmo microscópio, com lente de aumento 20 vezes e mesmo software já citado. Esta coloração permite a diferenciação de estruturas que contenham colágeno, coradas em vermelho e às que não apresentam colágeno, coradas em amarelo. O software utilizado realiza a marcação destas cores. Assim, pôde-se estabelecer a porcentagem de colágeno em relação à área total do campo. Depois foi realizada a média de todos os campos^(39,40).

4.5.5 Estatística

Os dados com distribuição normal foram apresentados em média e desvio padrão e comparados pelo teste t de student. Os resultados com distribuição não paramétrica foram apresentados em mediana e intervalo interquartilico e foram comparados pelo teste Mann-Whittney.

5. RESULTADOS

Os resultados referentes aos perfis das matrizes estão apresentados na Tabela 1. A porcentagem de matrizes que completaram a gestação ($C = 82,8\%$ e $RvitA = 79,5\%$, $p = 0,94$), o número de neonatos por ninhada ($C = 10$ (3-12) e $RvitA = 10$ (6-11), $p = 0,56$), e a quantidade de dieta ingerida pelas matrizes ($C = 18,6 \pm 2,7g$ e $RvitA = 18,5 \pm 3,4g$, $p = 0,95$) foram semelhantes. Imediatamente após o período de 21 dias de lactação, quando realizado o desmame dos filhotes, as matrizes apresentavam pesos semelhantes ($C = 232 \pm 27,5g$ e $RvitA = 229 \pm 21,9g$, $p = 0,72$).

Os dados referentes ao perfil dos filhotes estão apresentados na Tabela 2. O peso ao desmame ($C = 46g$ (41-48) e $RvitA = 43g$ (41-48), $p = 0,79$) (Figura 1) foi semelhante entre os grupos. No momento do desmame, o coeficiente de variação dos pesos dos animais controle = $8,9\%$ e $RvitA = 8,5\%$ foi calculado e considerado adequado quando inferior a 10% . As fêmeas, cujo peso ao desmame aumentou o CV para mais de 10% foram excluídas. Assim, excluiu-se 7 animais $RvitA$ e 5 animais controle. A média da ingestão de dieta, em gramas, ajustada para o peso corporal, em kg, por dia ($C = 10,6 \pm 1,10g/kg/d$ e $RvitA = 10,3 \pm 1,70g/kg/d$, $p = 0,51$) (Figura 2), o peso corporal no momento da eutanásia ($C = 212 \pm 10,9g$ e $RvitA = 209 \pm 12,5g$, $p = 0,37$) (Figura 3) a idade da eutanásia ($C = 70d$ (63-77) e $RvitA = 71d$ (63-77), $p = 0,95$) (Figura 4), foram semelhantes entre os grupos.

As dosagens vitamínicas estão apresentadas na Tabela 3. A vitamina A total hepática, dos recém-nascidos ($C = 28,4 \pm 7,1 \mu mol/kg$ e $RvitA = 22,1 \pm 12,8 \pm 7,1 \mu mol/kg$, $p = 0,38$) (Figura 5) e a dosagem de retinol sérico dos animais adultos ($C = 4,1 \pm 2,26 \mu mol/L$ e $RvitA = 2,24 \pm 2,9 \mu mol/L$, $p=0,19$) (Figura 6) foram semelhantes entre os grupos. Observou-se que quantidade de vitamina A total hepática dos adultos do grupo $RvitA$ foi menor que a do grupo controle ($C = 1007 \pm 249 \mu mol/kg$ e $RvitA = 125 \pm 50 \mu mol/kg$, $p < 0,001$) (Figura 7), Assim como a vitamina A total cardíaca dos animais adultos ($C = 0,95 \pm 0,44 \mu mol/kg$ e $RvitA = 0,24 \pm 0,16 \mu mol/kg$, $p = 0,01$) (Figura 8), foi menor no grupo que recebeu dieta restrita em vitamina A.

Os dados do estudo morfofuncional, por meio da ecocardiografia, estão apresentados na Tabela 4. No grupo $RvitA$, observou-se maior diâmetro

diastólico do ventrículo esquerdo ($C = 5,82 \pm 0,43$ mm e $RvitA = 6,21 \pm 0,37$ mm, $p = 0,042$) (Figura 9), maior diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ($C = 1,9 \pm 0,51$ mm e $RvitA = 2,4 \pm 0,32$ mm, $p = 0,008$) (Figura 10) e maior razão átrio esquerdo/aorta ($C = 0,97 \pm 0,12$ e $RvitA = 1,1 \pm 0,17$, $p = 0,021$) (Figura 11) que no grupo controle, evidenciando dilatação das cavidades esquerdas. Houve tendência a menor razão entre espessura da parede e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ($C = 0,22 \pm 0,03$ e $RvitA = 0,20 \pm 0,02$, $p = 0,06$) (Figura 12), no grupo com restrição alimentar de vitamina A. Com relação à função cardíaca observou-se menor valor da porcentagem de encurtamento ($C = 66,2 \pm 7,50$ % e $RvitA = 60,2 \pm 4,72$ %, $p = 0,019$) (Figura 13) e da fração de ejeção ($C = 0,96 \pm 0,03$ e $RvitA = 0,93 \pm 0,02$, $p = 0,049$) (Figura 14) no grupo RvitA em comparação com o controle. Não houve diferença entre os valores da massa ventricular esquerda ($C = 0,42 \pm 0,08$ g e $RvitA = 0,43 \pm 0,09$ g, $p = 0,764$) (Figura 15), e razão E/A ($C = 1,46 \pm 0,34$ e $RvitA = 1,4 \pm 0,27$, $p = 0,726$), diâmetro do átrio esquerdo ($C = 3,1$ mm (2,9-3,2) e $RvitA = 3,3$ mm (2,8-3,4), $p = 0,29$), parede posterior do ventrículo esquerdo ($C = 1,30 \pm 0,15$ mm e $RvitA = 1,25 \pm 0,14$ mm, $p = 0,352$), velocidade do sangue na aorta ($C = 79,3 \pm 17,2$ cm/s e $RvitA = 81,8 \pm 10,7$ cm/s, $p = 0,631$), frequência cardíaca ($C = 335 \pm 58$ bpm e $RvitA = 321 \pm 44$ bpm, $p = 0,47$), e tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido ($C = 21,6$ ms (16-29) e $RvitA = 22$ ms (20-25) $p = 0,87$).

Na Tabela 5 estão apresentados os dados referentes à avaliação funcional *in vitro* do ventrículo esquerdo (coração isolado). Observou-se que a primeira derivada positiva máxima da pressão ventricular, indicadora de função sistólica, foi menor no grupo com ingestão reduzida de vitamina A ($C = 5513 \pm 1394$ mmHg/s e $RvitA = 4229 \pm 873$ mmHg/s, $p = 0,027$) (Figura 16), em concordância com os dados ecocardiográficos. Outros dados de função sistólica como pressão sistólica máxima, razão pressão sistólica/volume diastólico final e estresse/deformação sistólico foram semelhantes entre os grupos, assim como os parâmetros de função diastólica: derivada negativa de pressão ventricular, razão entre pressão diastólica e volume diastólico final e estresse/deformação diastólico.

Os dados morfométricos obtidos por pesagem dos tecidos se encontram na tabela 6. Os pesos do ventrículo esquerdo (C = 0,53 g (0,51-0,55) e RvitA = 0,51 g (0,48-0,54), p = 0,35)(Figura 17), peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal (C = 2,51 g/mg (2,42-2,67) e RvitA = 2,49 g/mg (2,40-2,60), p= 0,704) e o peso do ventrículo direito (C = 0,18 g (0,15-0,19) e RvitA = 0,16 g (0,13-0,19) p=0,626) foram semelhantes entre os grupos. O teor de água do ventrículo direito, fígado, pulmões e átrio esquerdo foram semelhantes, excluindo a existência de edema tecidual.

As medidas da área seccional dos miócitos (C = $237 \pm 18,8 \mu\text{m}^2$ e RvitA = $230 \pm 13,3 \mu\text{m}^2$, p = 0,314) (Figura 18) e a da porcentagem de colágeno (C = $2,78 \pm 1,10 \%$ e RvitA = $3,5 \pm 1,57$, p = 0,343) (Figura 19) estão apresentadas na Tabela 7 e foram semelhantes entre os grupos.

O estresse oxidativo foi maior nos corações dos animais que receberam dieta restrita em vitamina A (Tabela 8). Este fato pode ser observado por maior formação de hidroperóxidos de lipídeos (C = 164 nmol/g (161-169) e RvitA = 211 nmol/g (189-246), p = 0,032) (Figura 20). O sistema antioxidante afetado foi não enzimático, o que pode ser observado por maior razão entre hidroperóxidos e capacidade antioxidante total (C = 4,4 nmol/g (4,3-4,6) e RvitA = 6,70 nmol/g (5,60-8,80), p = 0,032) (Figura 21). Os sistemas enzimáticos antioxidantes como a glutathione peroxidase (C = $35,6 \pm 5,01$ nmol/mg e RvitA = $40,5 \pm 21,6$ nmol/mg, p = 0,63), catalase (C = $167 \pm 35,0 \mu\text{mol/g}$ e RvitA = $161 \pm 27,0 \mu\text{mol/g}$, p = 0,79) e superóxido dismutase (C = $1,40 \pm 0,03$ nmol/mg e RvitA = $1,38 \pm 0,02$ nmol/mg, p = 0,61) não sofreram alterações.

No fígado (Tabela 9) não houve aumento de hidroperóxidos (C = 357 ± 51 nmol/g e RvitA = 358 ± 20 nmol/g, p = 0,95) (Figura 22) ou da relação entre hidroperóxidos e capacidade antioxidante total (C = $17,0 \pm 4,60$ nmol/g e RvitA = 16,9 (1,70 nmol/g, p = 0,97) (Figura 23). Apenas a superóxido dismutase estava diminuída no fígado dos animais que receberam dieta pobre em vitamina A (C = 2,6 (0,1 nmol/mg e RvitA = 2,4 (0,1 nmol/mg, p = 0,02) (Figura 24). Sendo assim, o consumo da superóxido dismutase, provavelmente evitou os danos celulares do estresse oxidativo.

A avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem das enzimas β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase (Figura 25), lactato desidrogenase (Figura 26) e citrato sintase (Figura 27), e foram semelhantes entre os grupos e encontram-se na Tabela 10.

Tabela 1. Perfil das matrizes que geraram os animais do estudo

	NC	NR	C	RvitA	p
GC %	35	39	82,8%	79,5%	0,940***
PL (g)	13	12	232,4 (27,5 •	228,8 ± 21,9	0,726 #
D (g)	9	10	18,6 ± 2,7	18,5 ± 3,4	0,950

GC: gestações completas; PL: peso após a lactação; D: média da ingestão de dieta em 24 horas; NC: número de animais controle; NR: número de animais RvitA; •: média e desvio padrão; #: teste estatístico: t de Student; ***: teste estatístico qui-quadrado.

Tabela 2. Perfil dos animais estudados: ratas criadas até a idade adulta

	NC	NR	C	RvitA	p
P21 (g)	29	30	46(41,5 – 48) **	43,5(41 – 48)	0,730 &
D (g/kg/d)	12	14	106 ± 11,0 •	102 ± 17,0	0,950 #
IE (d)	29	30	70 (63-77)	71 (63-77)	0,950
PE (g)	29	30	212 ± 10,9	209 ± 12,5	0,370

P21: Peso ao desmame em gramas (21dias); D: média das ingestões de dieta, em g, ajustada pelo peso corporal em kg, por dia; IE: idade da eutanásia em dias; PE: peso da eutanásia; NC: número de animais controles, NR: número de animais RvitA; •: média e desvio padrão; #: teste estatístico t de Student; **: mediana e intervalo interquartil; &: teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 3. Quantificação da vitamina A no soro e tecidos, por cromatografia líquida de alta eficiência

	NC	NR	C	RvitA	p
RH-RN (µmol/L)	4	4	28,4 ± 7,01 90•	22,13 ± 12,8	0,378 #
RS (µmol/L)	8	5	4,12 ± 2,26	2,24 ± 2,9	0,187
RH (µmol/kg)	8	5	1007 ± 249	125 ± 50	<0,001*
Rc (µmol/kg)	5	5	0,95 ± 0,44	0,24 ± 0,16	0,010*

RH-RN: retinol hepático dos animais recém-nascidos; RS: retinol sérico dos animais adultos; RH: retinol hepático dos animais adultos; RC: retinol cardíaco dos animais adultos; NC: número de animais controles; NR: número de animais RvitA.; •: média e desvio padrão; #: teste estatístico: t de Student; *: p < 0,05.

Tabela 4. Estudo morfofuncional *in vivo* por meio de ecocardiografia

	C N=12	RvitA N=15	p
FC (bpm)	335 ± 58	321 ± 44 *	0,470 [#]
DDVE (mm)	5,8 ± 0,43	6,2 ± 0,37	0,042*
DSVE (mm)	1,9 ± 0,51	2,4 ± 0,32	0,008*
PP (mm)	1,30 ± 0,15	1,25 ± 0,14	0,352
PP/DDVE	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,060
AE (mm)	3,1(2,9-3,2)	3,3 (2,8-3,4)**	0,291 ^{&}
AO (mm)	3,25 ± 0,37	3,01 ± 0,48	0,118
AE/AO	0,97 ± 0,12	1,10 ± 0,17	0,021*
MVE (g)	0,42 ± 0,08	0,43 ± 0,09	0,764
% E	66,2 ± 7,50	60,2 ± 4,72	0,019*
FE	0,96 ± 0,03	0,93 ± 0,02	0,049*
VAo (cm/s)	79,3 ± 17,2	81,8 ± 10,7	0,631
E/A	1,46 ± 0,34	1,41 ± 0,27	0,726
TRlc (ms)	21,6(16,0-29,0)	22,0 (20,5-25,5)	0,870

FC: frequência cardíaca em batimentos por minuto; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; PP: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta; MVE: massa do ventrículo esquerdo; %E: porcentagem de encurtamento; FE: fração de ejeção; VAo: velocidade do sangue na aorta; E/A razão onda E onda A; TRlc: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido.; *:média e desvio padrão; # :teste estatístico t de Student; **: mediana e intervalo interquartil; &: teste estatístico Mann-Whitney; *: p < 0,05.

Tabela 5. Estudo funcional *in vitro* por meio do coração isolado

	C N=9	RvitA N=11	p
PS max(mmHg)	181 ± 24,9	175 ± 20,6 *	0,561 [#]
+dp/dt max(mmHg/s)	5513 ± 1394	4229 ± 873	0,027*
-dp/dt max(mmHg/s)	2800 ± 324	2708 ± 359	0,553
PS/Vdf (mmHg/ml)	223 ± 201	359 ± 327	0,300
σ/ε sis (g/cm ² %)	5,79 ± 1,41	5,27 ± 0,72	0,330
PD/Vdf (mmHg/ml)	11,7 (9,2-13,9)	13,7(10,6-19,9)**	0,420 ^{&}
σ/ε dia (g/cm ² %)	0,15 ± 0,06	0,15 (0,04)	0,940

PS max: pressão sistólica máxima; +dp/dt max: derivada positiva máxima da pressão; -dp/dt max: derivada negativa máxima da pressão; PS/Vdf: pressão sistólica/volume diastólico final; σ/ε sis: estresse/deformação sistólico; σ/ε dia: estresse/deformação diastólico; *: média e desvio padrão; # : teste estatístico t de Student; **: mediana e intervalo interquartil; &: teste estatístico Mann-Whitney; *: p < 0,05.

Tabela 6. Estudo morfométrico por meio da pesagem dos tecidos

	C N=20	RvitA N=19	p
PVE (g)	0,53 (0,51-0,55)	0,51 (0,48-0,54)**	0,347 ^{&}
PVE/PC (g/mg)	2,51 ± (2,42-2,67)	2,49 ± (2,40-2,60)	0,704
PVD (g)	0,18 (0,15 – 0,19)	0,16 (0,13 – 0,19)	0,626
Ta VD (%)	74,3 (73,0-75,0)	75,7 (73,6-76,7)	0,211
Ta F (%)	68,6 ± 20,0	68,0 ± 16,1 [•]	0,331 [#]
Ta P (%)	65,2 ± 9,50	64,2 ± 8,60	0,729
Ta A (%)	77,4 (76,1-78,1)	79,8 (75,7-81,9)	0,074

PVE: peso do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; PVD: peso do ventrículo direito, Ta VD: teor de água do ventrículo direito; Ta F: teor de água fígado do fígado; Ta P: teor de água do pulmão.; [•]: média e desvio padrão; [#]: teste estatístico t de Student; ^{**}: mediana e intervalo interquartil; [&]: teste estatístico: Mann-Whitney.

Tabela 7. Estudo histopatológico por microscopia óptica: área seccional dos miócitos e porcentagem de colágeno

	C N=5	RvitA N=5	p
ASM (μm ²)	237 ± 18,8	230 ± 13,3 [•]	0,314 [#]
C (%)	2,78 ± 1,10	3,5 ± 1,57	0,343

ASM: área seccional dos miócitos; C: porcentagem de colágeno; [•]: média e desvio padrão; [#]: teste estatístico: t de Student.

Tabela 8. Estudo do estresse oxidativo cardíaco: lipoperoxidação, sistemas antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos

	C N=5	RvitA N=5	p
HP (nmol/g)	164 (161-169)	211 (189-246)**	0,032*&
TAS (%)	36,8 (36,3-37,7)	31,4 (28,1-34)	0,056
HP/TAS (nmol/g)	4,40 (4,30-4,60)	6,70 (5,60-8,80)	0,032*
Catalase (µmol/g)	167 ± 35,0	161 ± 27,0 *	0,794#
GSH-Px (nmol/mg)	35,6 ± 5,01	40,5 ± 21,6	0,630
SOD (nmol/mg)	1,40 ± 0,03	1,38 ± 0,02	0,610
PS (%)	14,4 (13,9-15,5)	14,8 (14,7-16,9)	0,220

HP: hidroperóxidos de lipídeos; TAS: "total antioxidants substances"; GSH-Px: glutathiona peroxidase; SOD: superóxido dismutase. ; •: média e desvio padrão; # : teste estatístico: t de Student; **: mediana e intervalo interquartil; &: teste estatístico:Mann-Whittney; *: p < 0,05.

Tabela 9. Estudo do estresse oxidativo hepático: lipoperoxidação, sistemas antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos

	C	RvitA	p
HP (nmol/g)	357 ± 50,9	358 ± 19,6 *	0,953#
TAS (%)	21,4 ± 2,18	21,2 ± 1,03	0,861
HP/TAS (nmol/g)	17,0 ± 4,6	16,9 ± 1,7	0,971
GSH-Px (nmol/mg)	105 (100,6-117,3)	107 (104,6-112,7)**	0,670&
SOD (nmol/mg)	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,019*

HP: hidroperóxido ; TAS: "total antioxidant substances"- substâncias antioxidantes totais; GSH-Px: glutathiona peroxidase; SOD: superóxido dismutase ; •:média e desvio padrão; # :teste estatístico t de Student; **: mediana e intervalo interquartil; &: teste estatístico Mann-Whittney; * p < 0,05.

Tabela 10. Estudo do metabolismo energético cardíaco

	C N=5	RvitA N=5	p
βOH (nmol/mg)	44,8 ± 6,3	31,6 ± 6,2 *	0,130#
LDH(nmol/mg)	137,5 ± 15,5	131,5 ± 24,9	0,660
CS(nmol/mg)	22,0 ± 1,29	23,3 ± 0,94	0,396

βOH:beta hidróxiacil coenzima-A desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase; CS: citrato sintase; •:média e desvio padrão; # :teste estatístico t de Student.

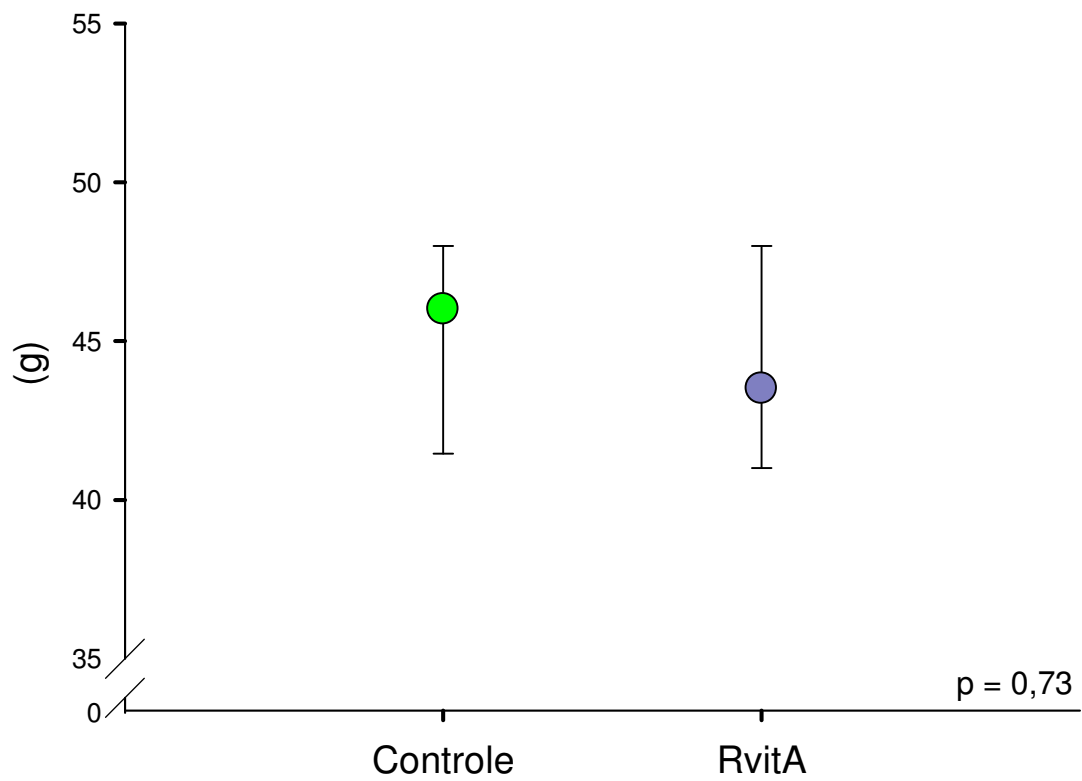


Figura 1. Mediana e intervalo interquartil dos pesos das ratas controle e RvitA, com 21 dias de vida, no momento do desmame.

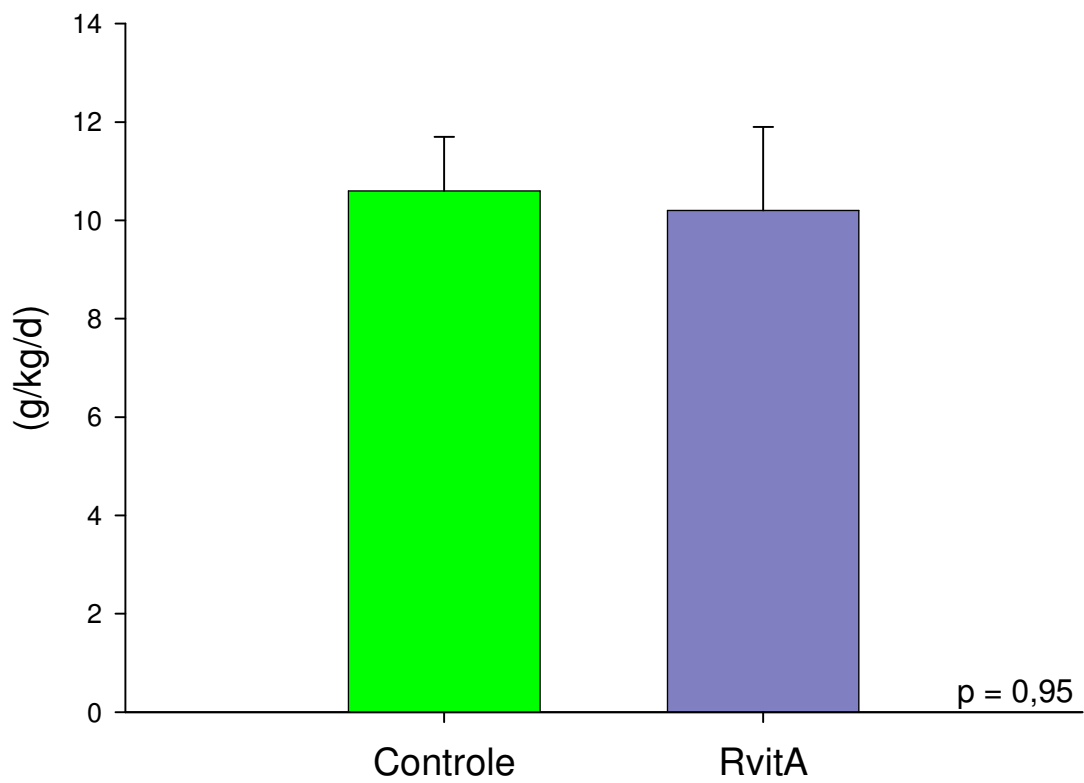


Figura 2. Média e desvio padrão das ingestões de dieta por animal, ajustado pelo peso corporal, por dia.

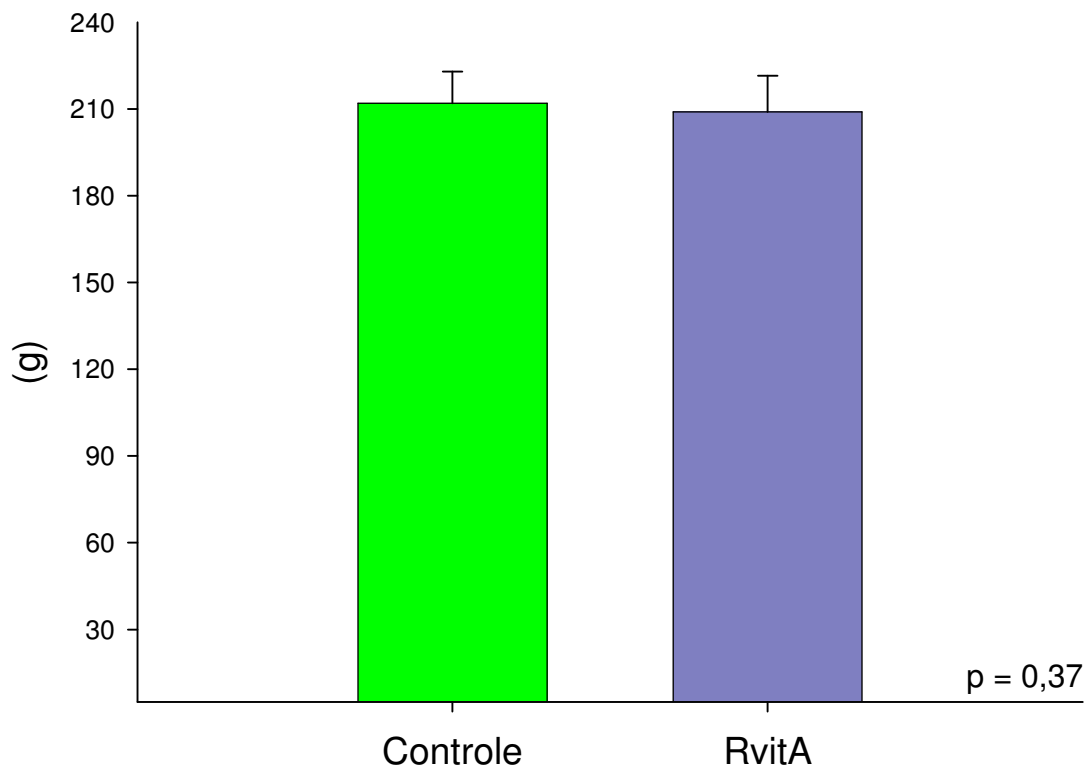


Figura 3. Média e desvio padrão do peso das ratas adultas no momento da eutanásia.

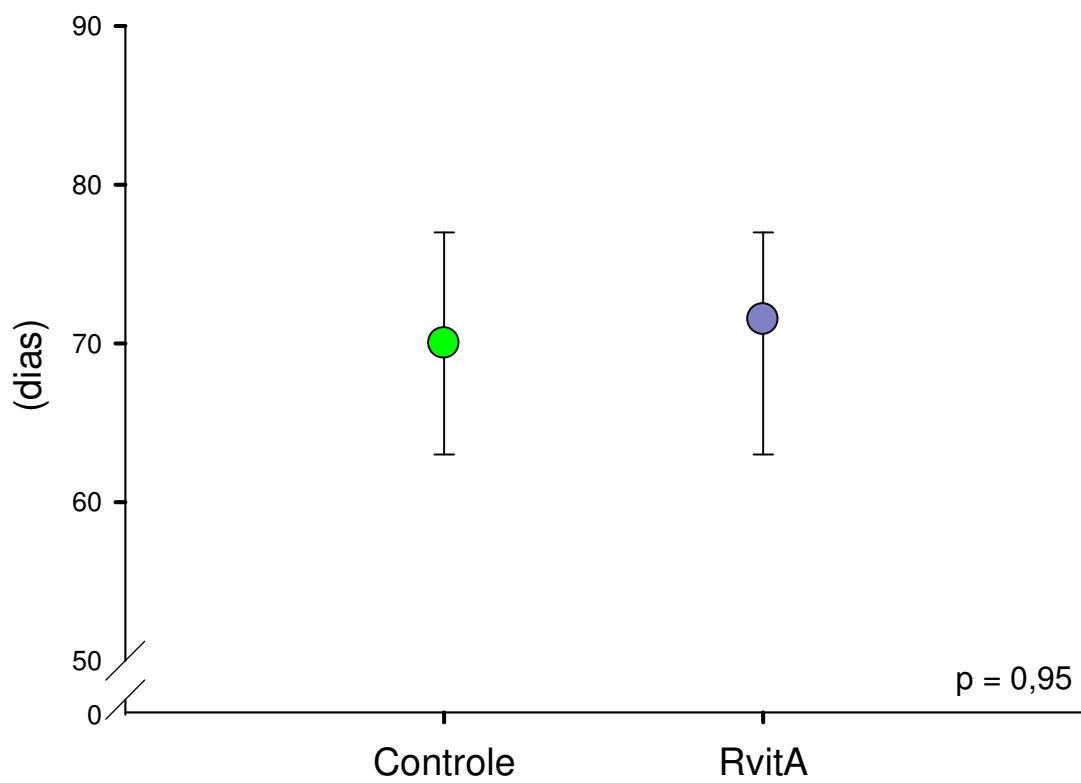


Figura 4. Mediana e intervalo interquartil da idade das ratas adultas no momento da eutanásia.

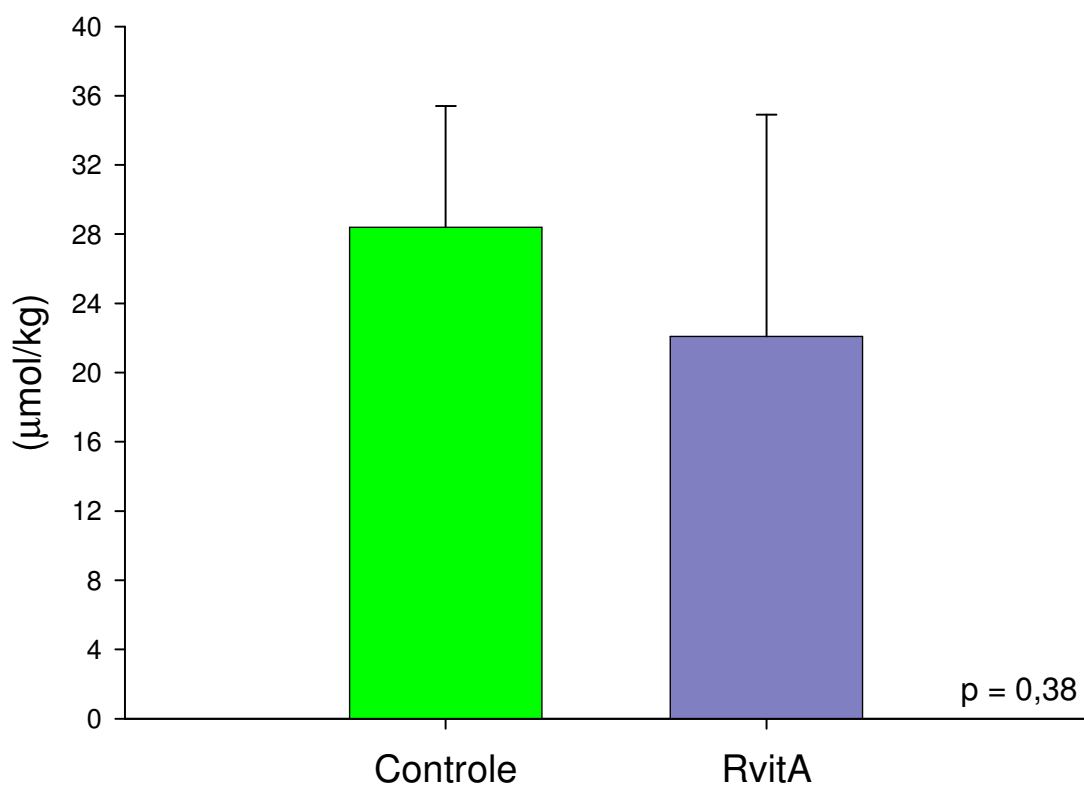


Figura 5. Média e desvio padrão da dosagem da vitamina A total hepática das fêmeas recém-nascidas, por cromatografia líquida de alta eficiência.

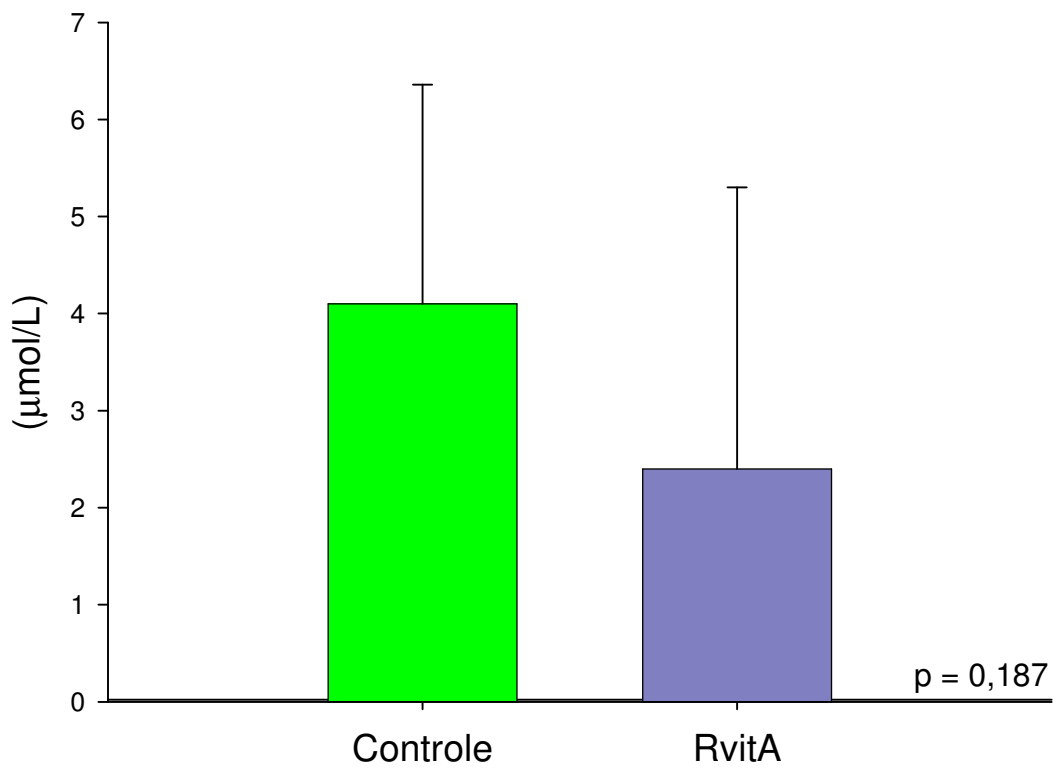


Figura 6. Média e desvio padrão da dosagem do retinol sérico das ratas adultas, por cromatografia líquida de alta eficiência.

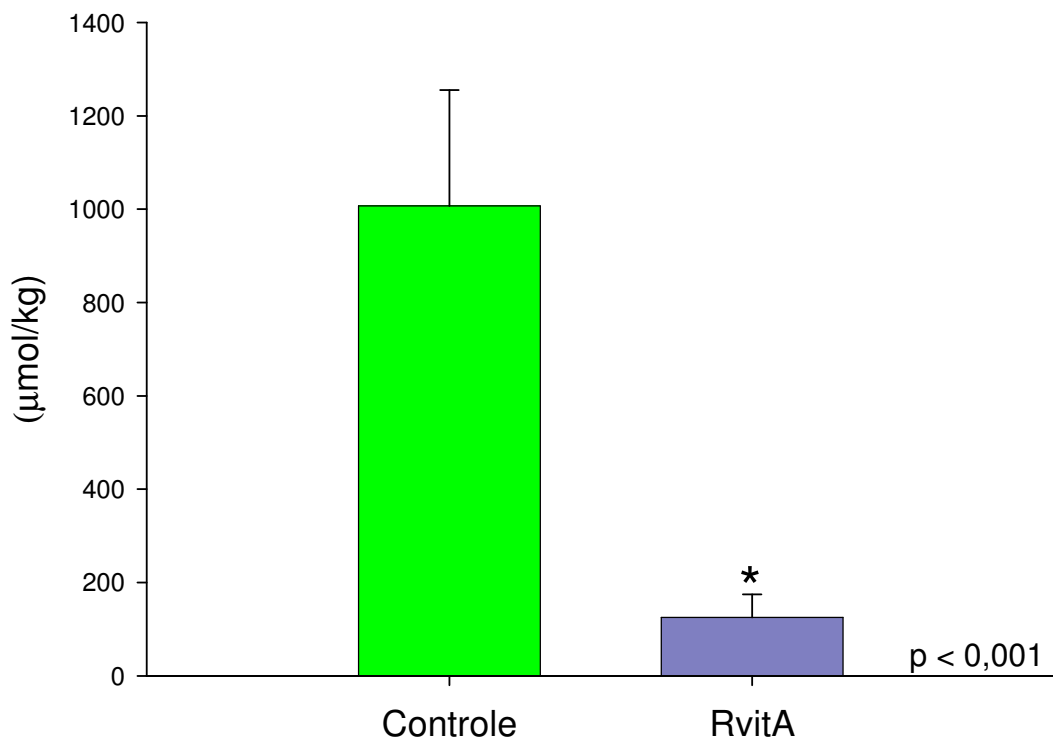


Figura 7. Média e desvio padrão da dosagem da vitamina A total hepática das ratas adultas, por cromatografia líquida de alta eficiência.

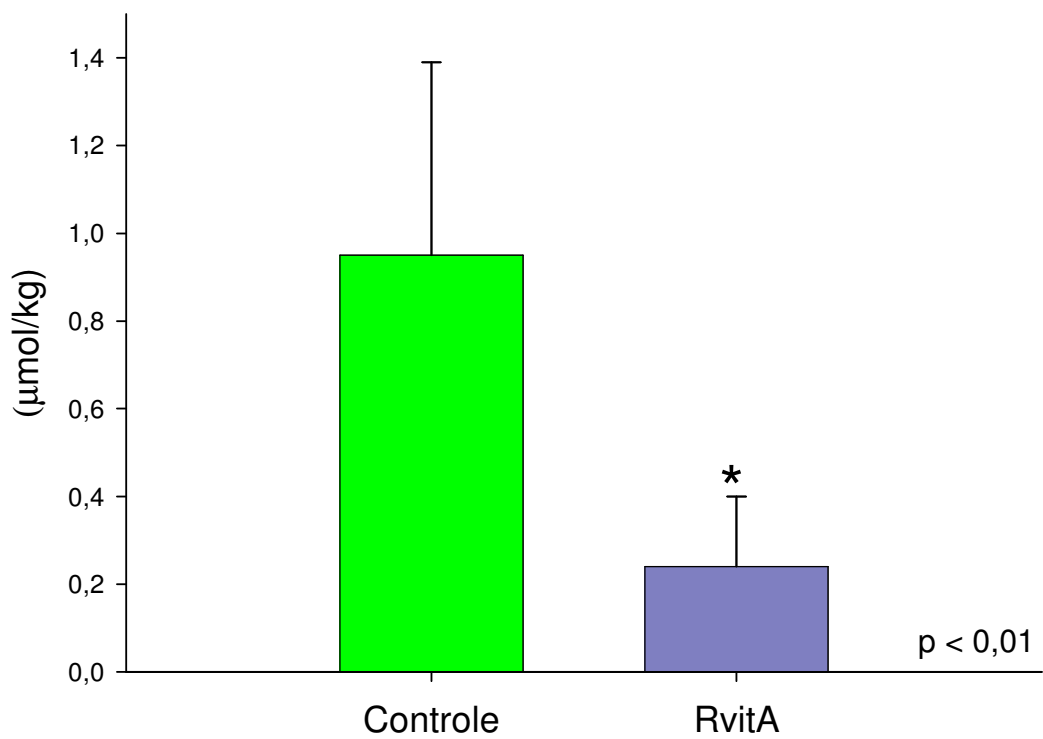


Figura 8. Média e desvio padrão da dosagem da vitamina A total cardíaca das ratas adultas, por cromatografia líquida de alta eficiência.

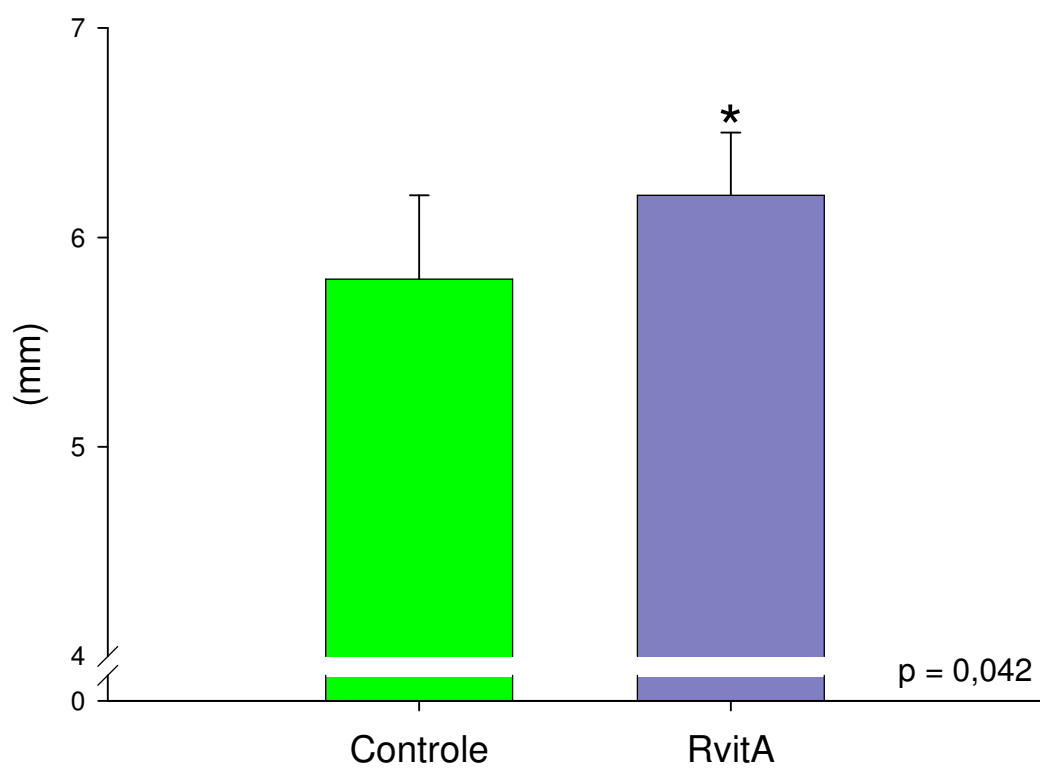


Figura 9. Média e desvio padrão da medida do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo realizada por ecocardiografia.

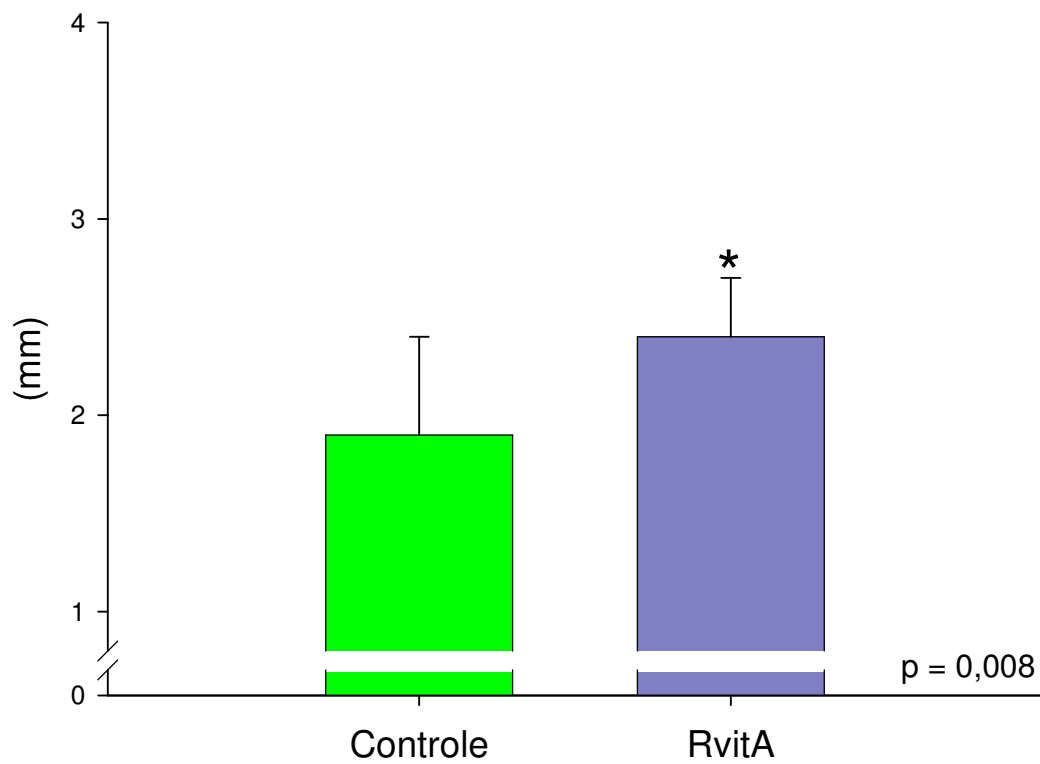


Figura 10. Média e desvio padrão da medida do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo realizada por ecocardiografia.

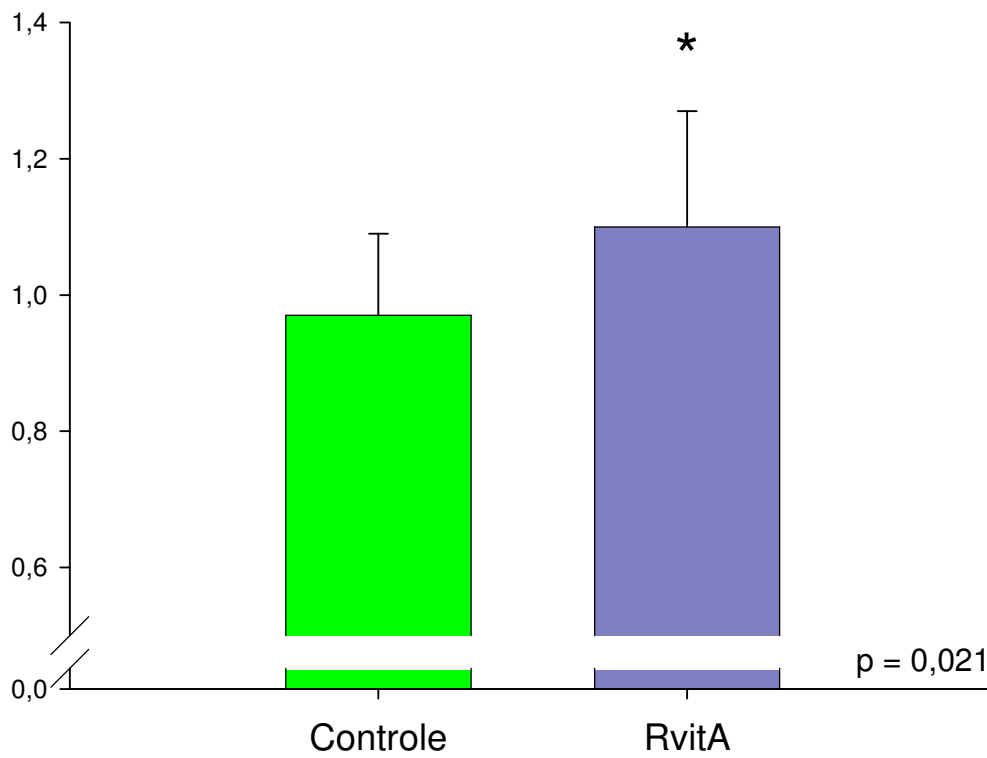


Figura 11. Média e desvio padrão da razão entre as medidas do diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta, realizadas por ecocardiografia.

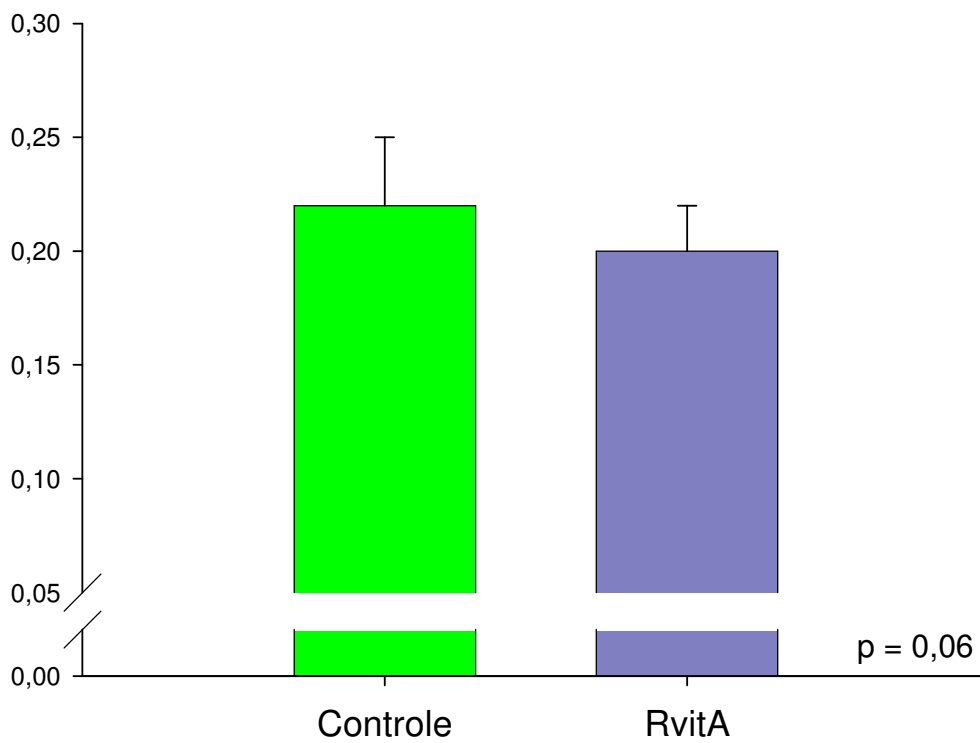


Figura 12. Média e desvio padrão da razão entre as medidas da espessura da parede posterior e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, realizadas por ecocardiografia.

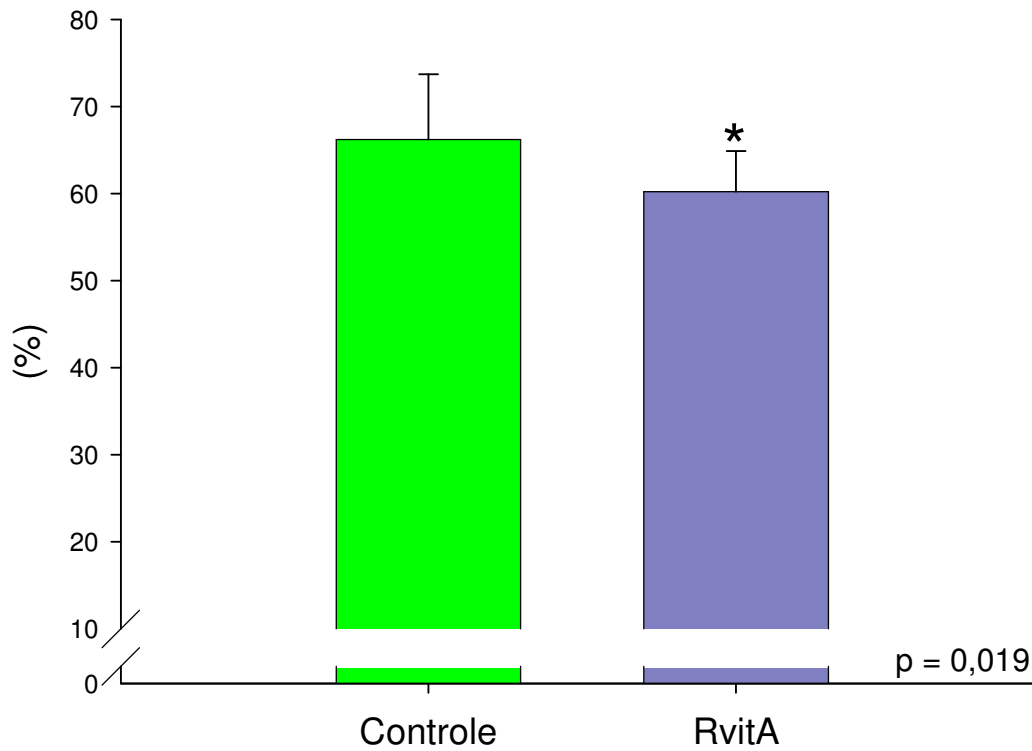


Figura 13. Média e desvio padrão da avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo por meio da porcentagem de encurtamento realizada por ecocardiografia.

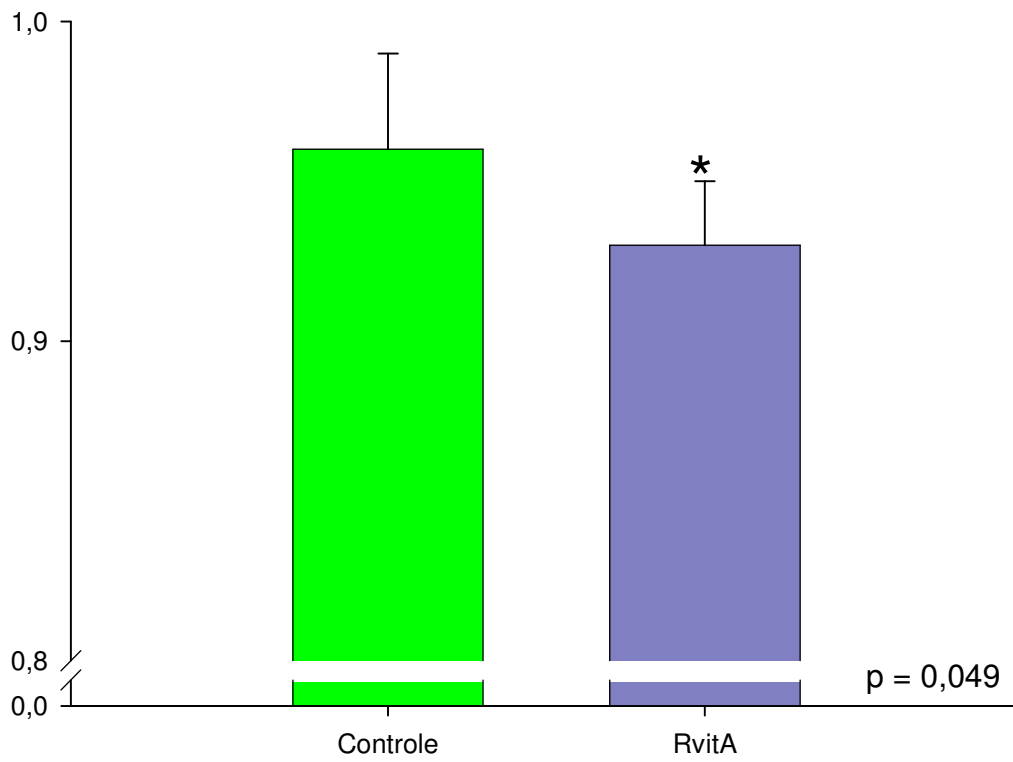


Figura 14. Média e desvio padrão da avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo por meio da fração de ejeção realizada por ecocardiografia.

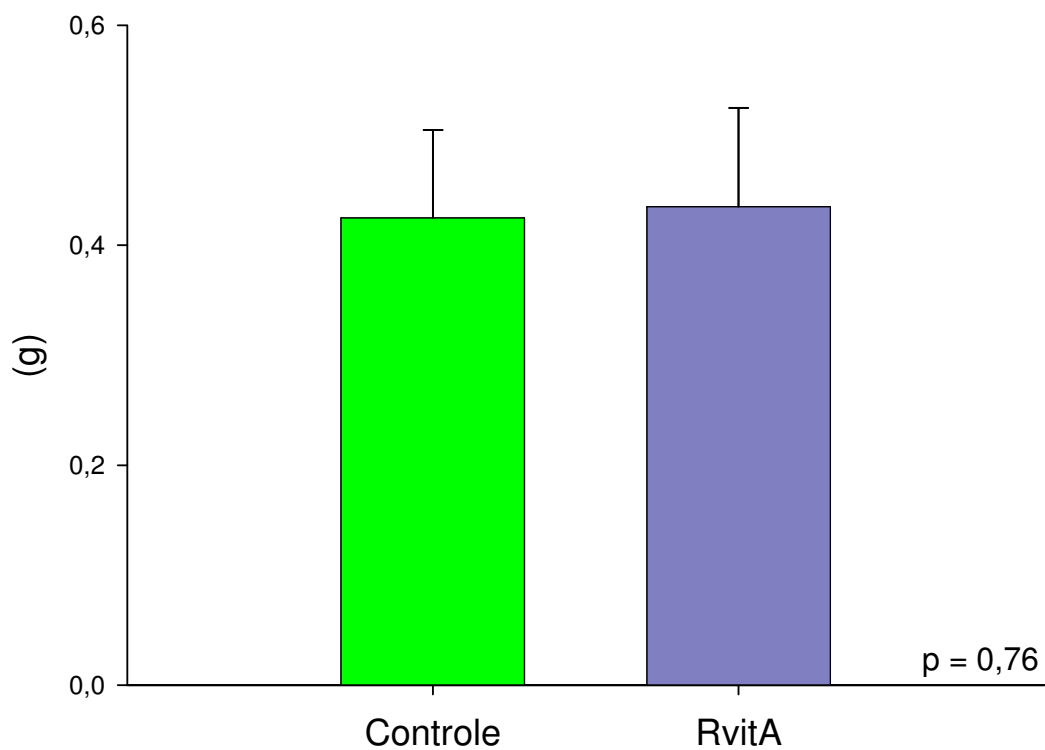


Figura 15. Média e desvio padrão da massa do ventrículo esquerdo realizada por ecocardiografia.

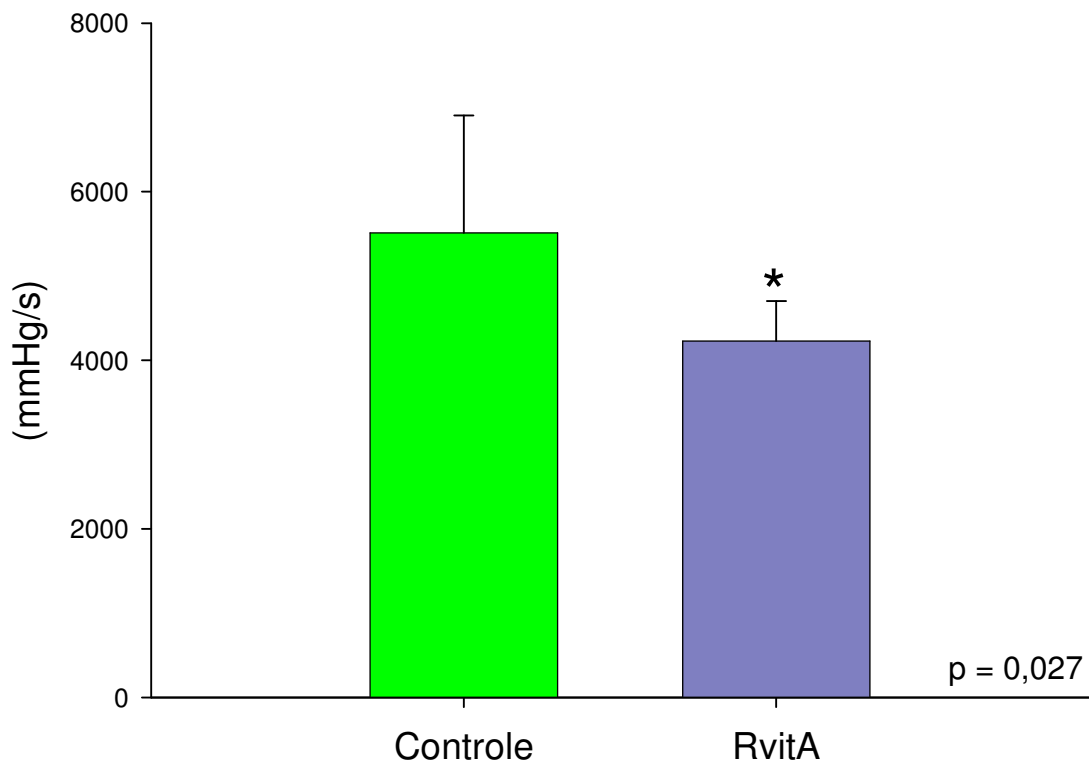


Figura 16. Média e desvio padrão da primeira derivada positiva de pressão obtida por meio do estudo do coração isolado.

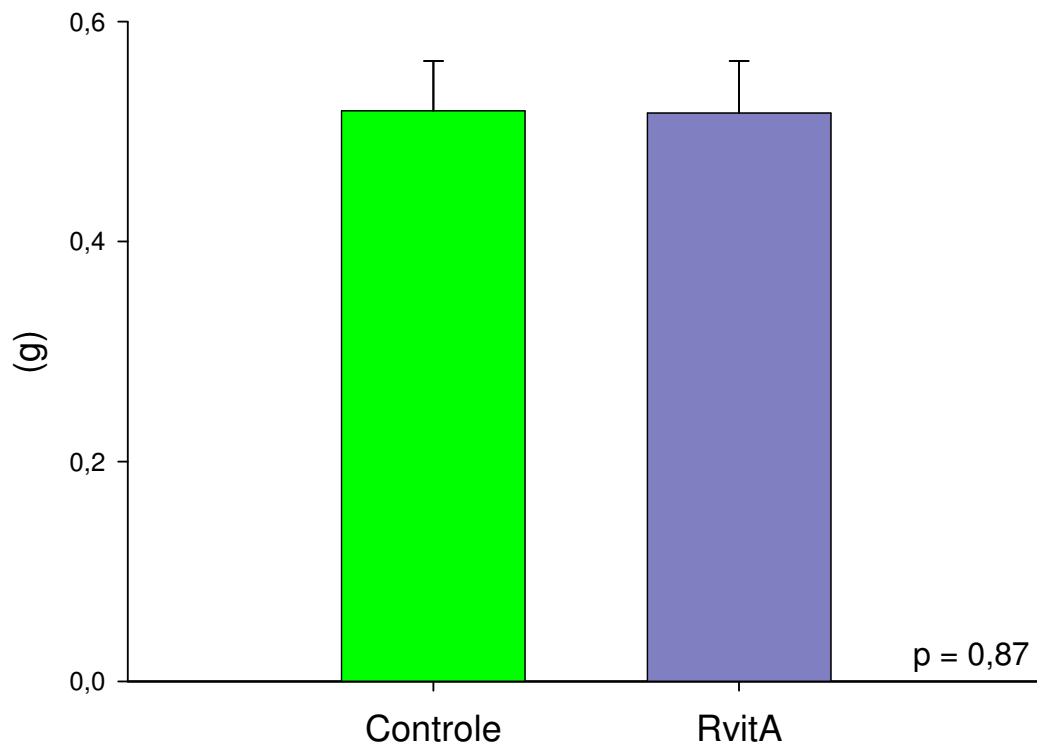


Figura 17. Média e desvio padrão do peso do ventrículo esquerdo.

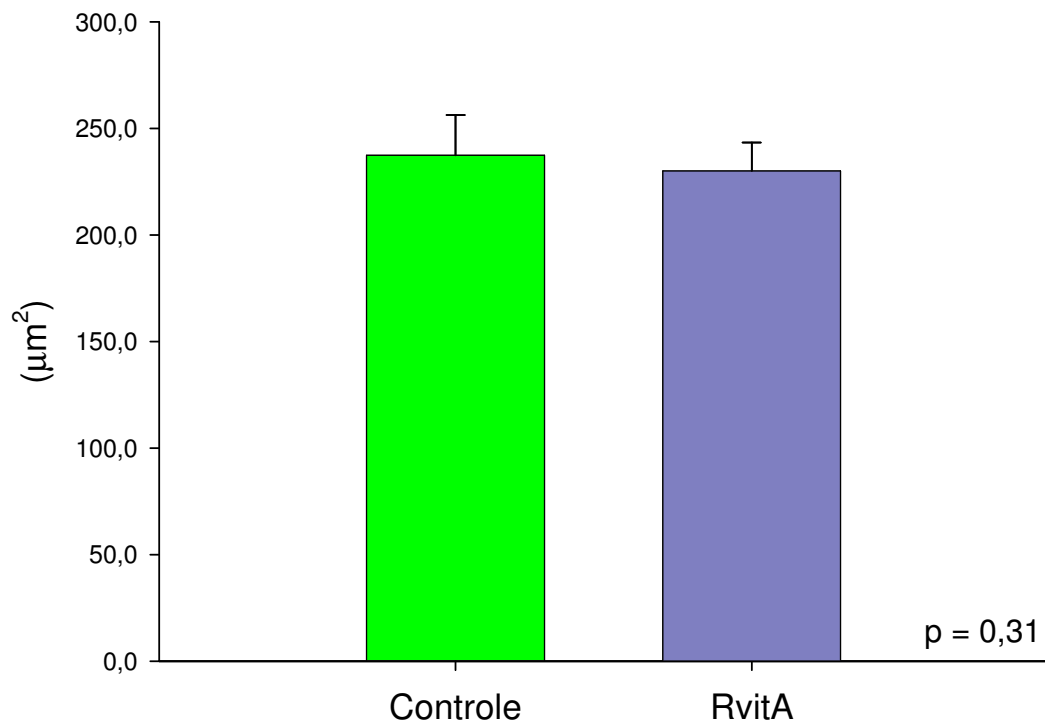


Figura 18. Média e desvio padrão da área seccional dos miócitos obtida por microscopia óptica, em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

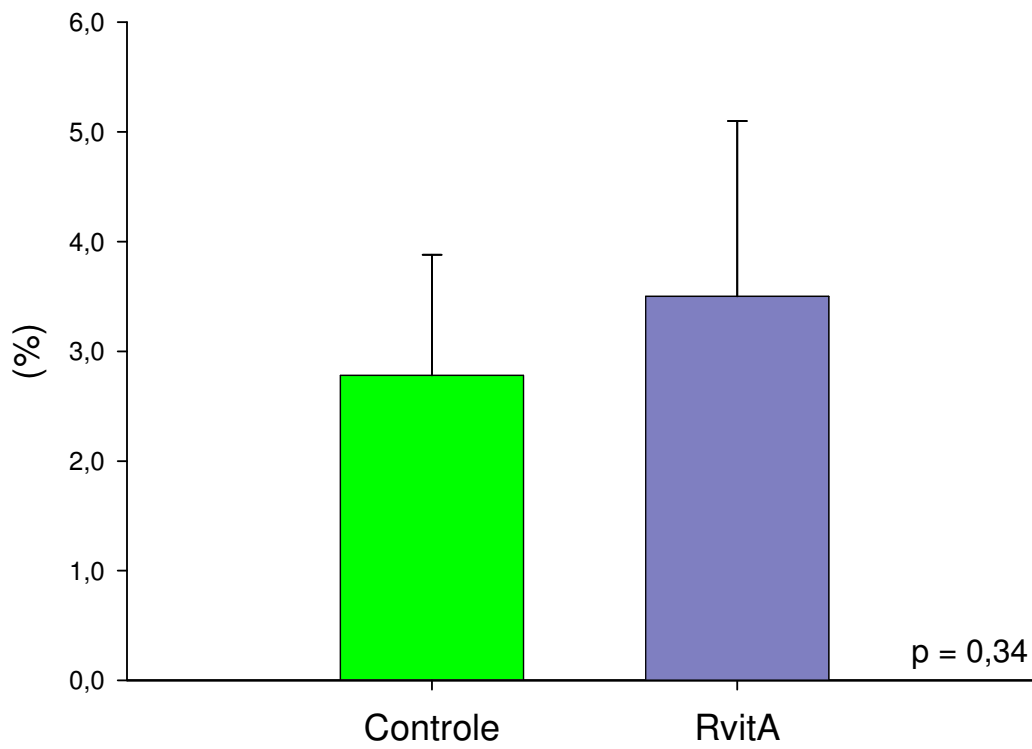


Figura 19. Média e desvio padrão da porcentagem de colágeno obtida por microscopia óptica de lâminas coradas com picrosirius vermelho.

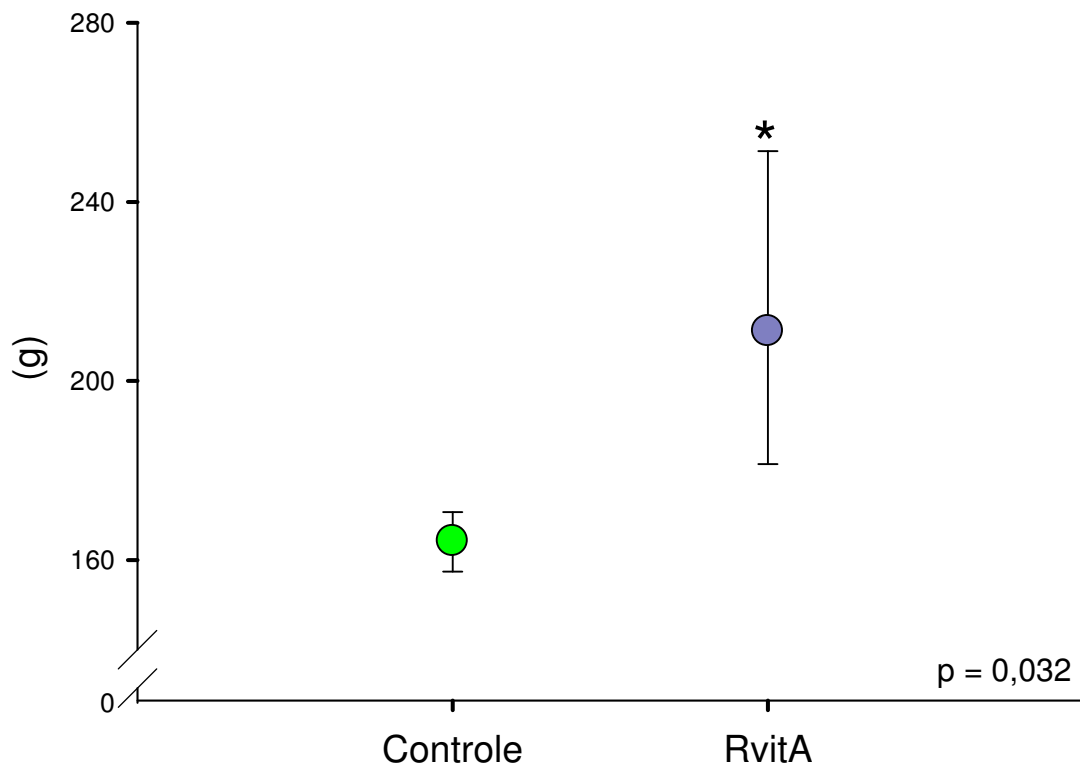


Figura 20. Mediana e intervalo interquartil da medida do estresse oxidativo por meio da quantificação da formação de hidroperóxidos de lipídeos no tecido cardíaco

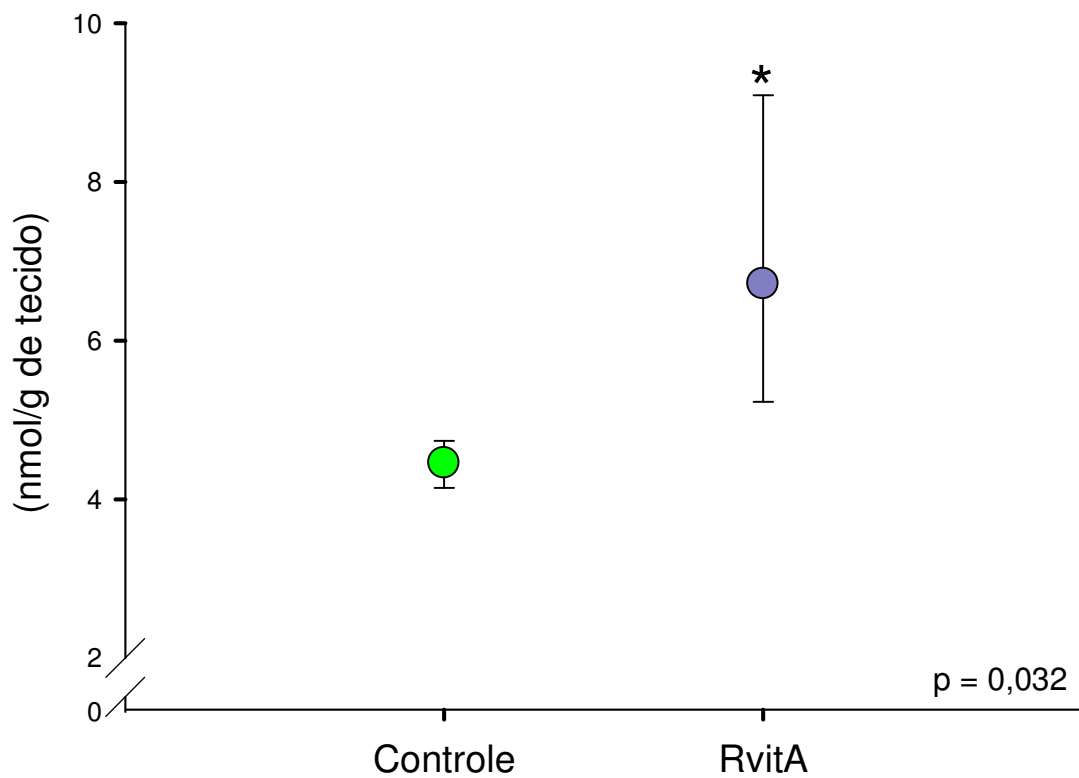


Figura 21. Mediana e intervalo interquartil da avaliação do estresse oxidativo obtida pela razão entre a formação de hidroperóxidos de lipídeos e a capacidade antioxidante total, no tecido cardíaco.

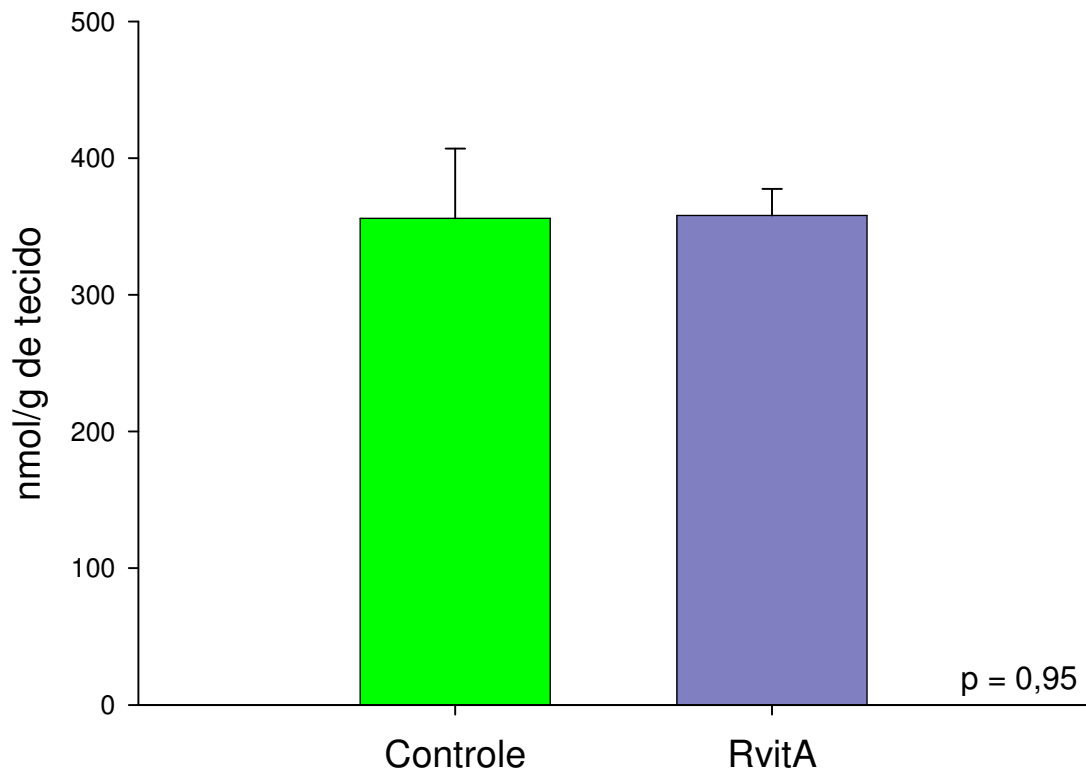


Figura 22. Média e desvio padrão da avaliação do estresse oxidativo obtida por meio da quantificação da formação de hidroperóxidos de lipídeos no fígado.

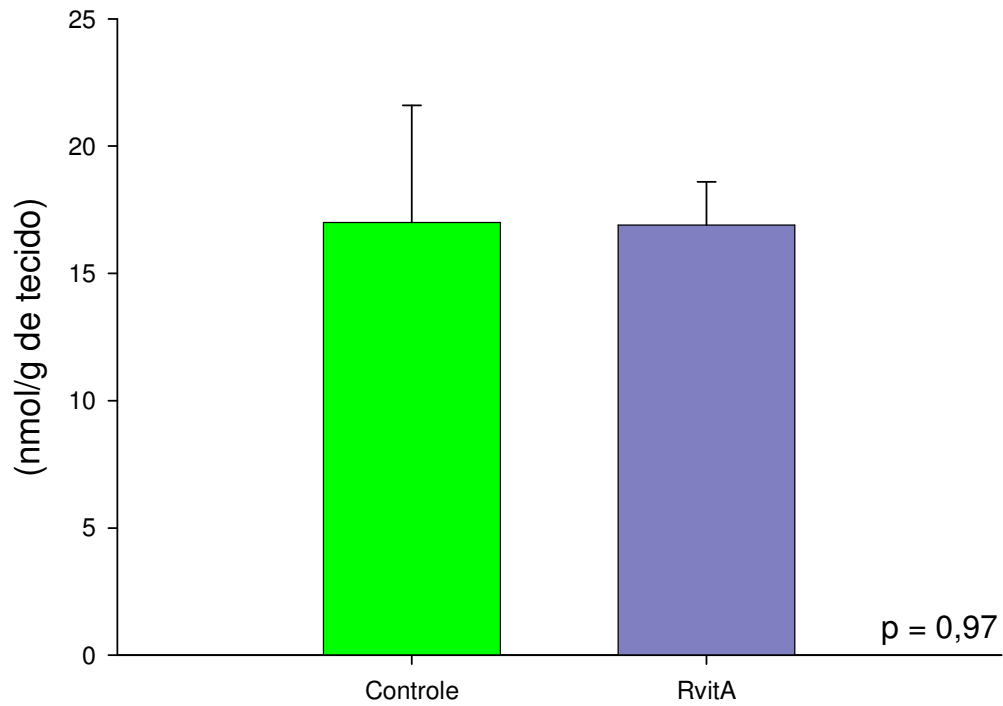


Figura 23. Média e desvio padrão da avaliação do estresse oxidativo obtida pela razão entre a formação de hidroperóxidos de lipídeos e a capacidade antioxidante total, no tecido cardíaco.

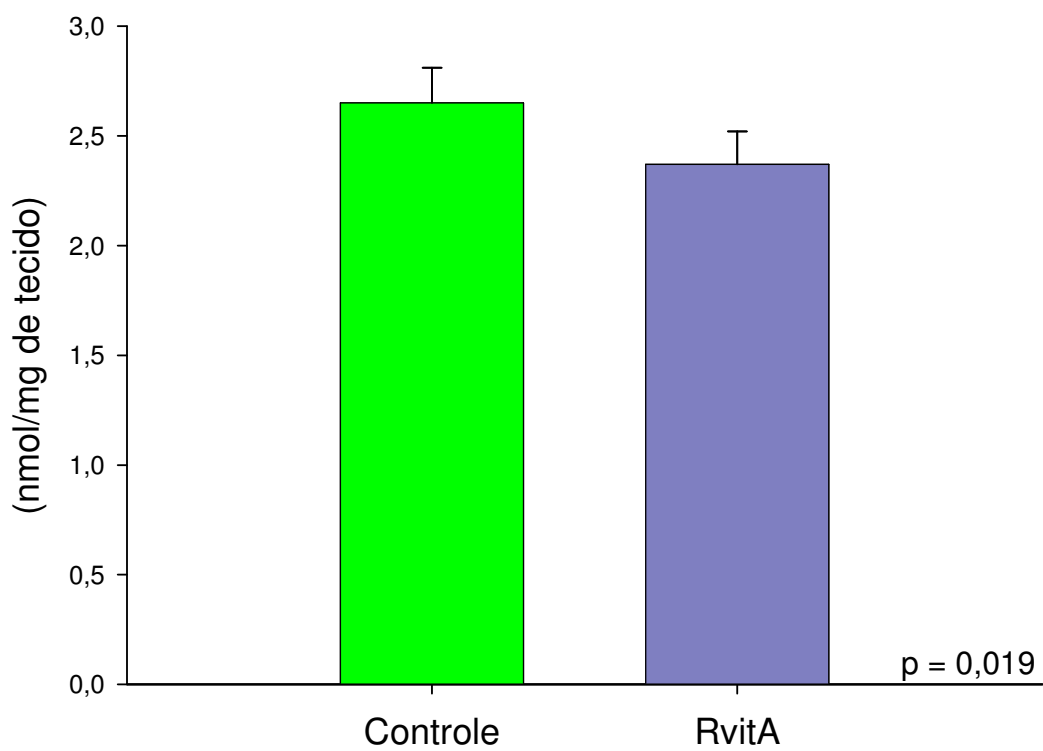


Figura 24. Média e desvio padrão da avaliação do estresse oxidativo obtida pela dosagem da enzima superóxido dismutase, no tecido hepático.

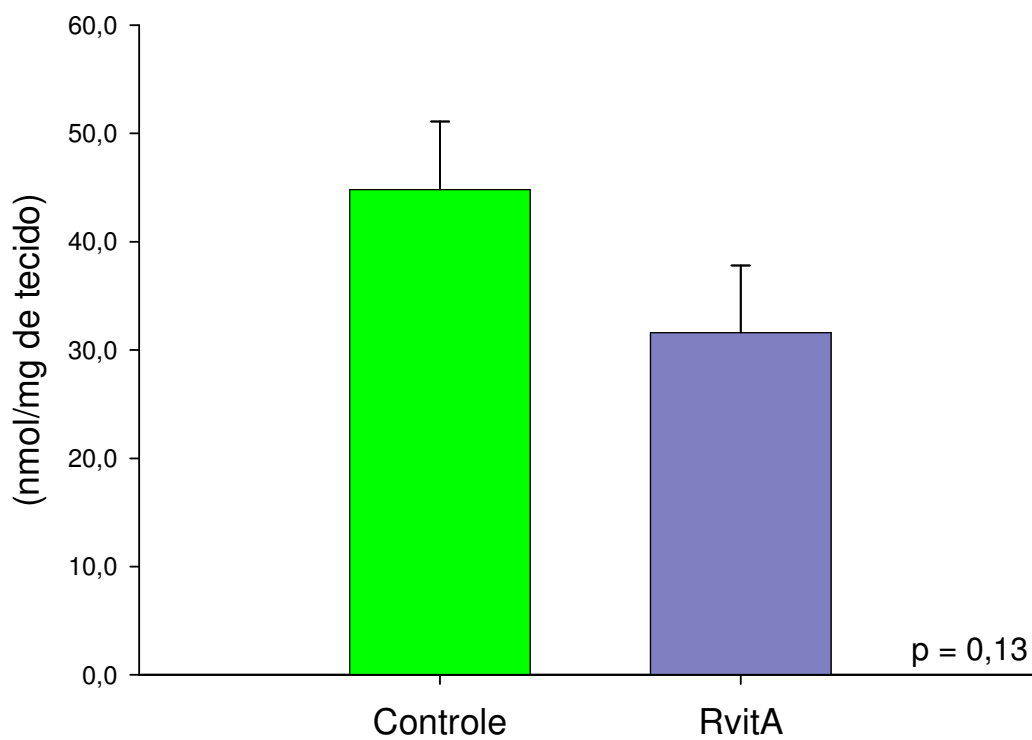


Figura 25. Média e desvio padrão da avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem da enzima beta hidróxiacil coenzima-A desidrogenase.

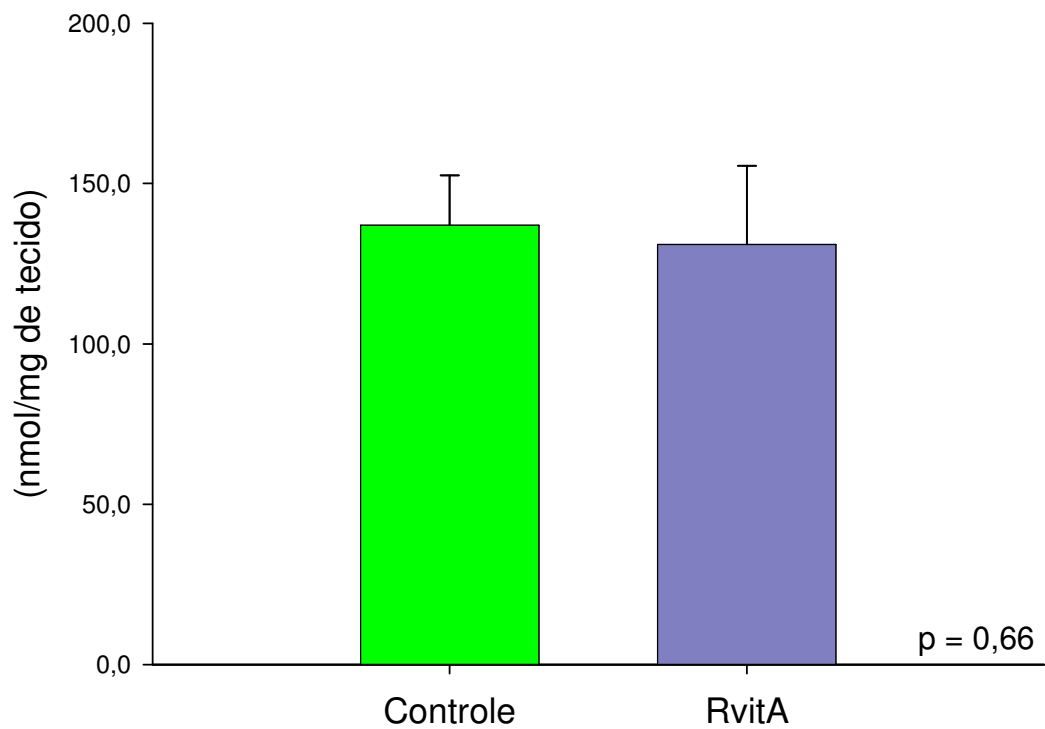


Figura 26. Média e desvio padrão da avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem da enzima lactato desidrogenase.

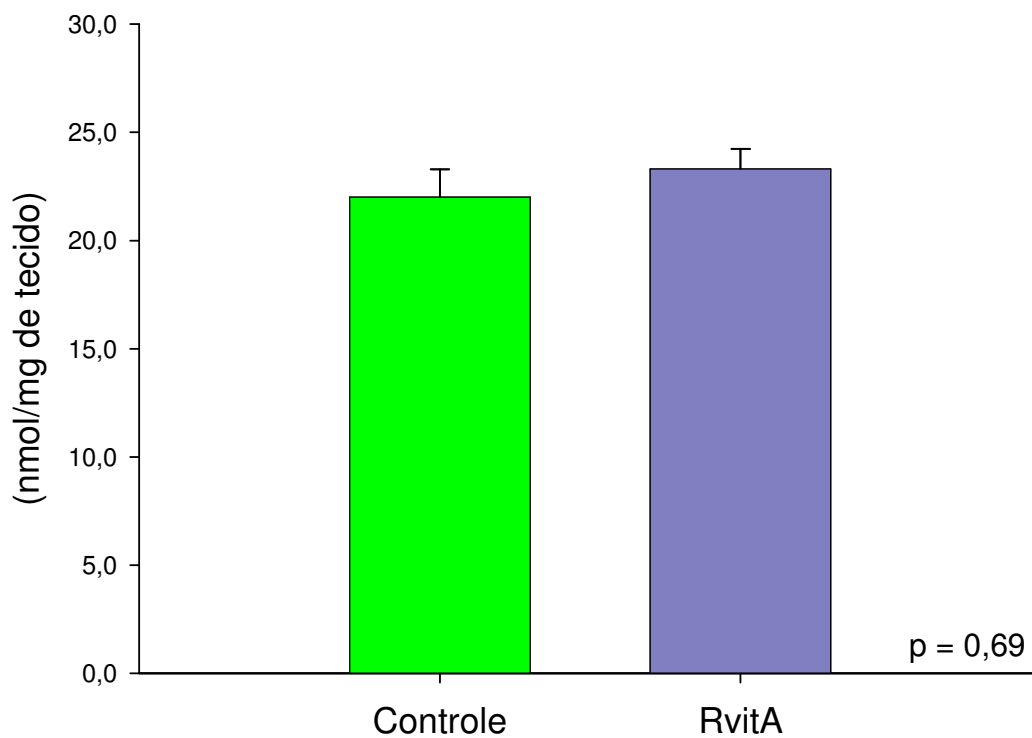


Figura 27. Média e desvio padrão da avaliação do metabolismo energético cardíaco por meio da dosagem da enzima citrato sintase.

6. DISCUSSÃO

A redução da ingestão alimentar de vitamina A é a principal causa desta deficiência. Sendo assim, modelos experimentais de restrição alimentar de vitamina A são amplamente utilizados para a investigação da influência desta carência sobre órgãos alvos. Estes modelos podem gerar animais com diferentes graus de deficiência de vitamina A, dependendo da intensidade e momento em que é realizada a restrição alimentar deste nutriente. A deficiência intensa da vitamina A, durante a gestação, causa infertilidade, abortamento, reabsorção dos embriões e malformações graves ⁽⁴¹⁾. A restrição deste nutriente iniciada aos filhotes após seu nascimento, se intensa causa redução do peso corporal e se leve torna o experimento muito longo até a redução dos estoques hepáticos ⁽¹⁷⁾.

O modelo experimental proposto por Gardner & Ross ⁽¹⁷⁾, utiliza a restrição alimentar, em duas gerações, sendo possível a obtenção de filhotes com deficiência marginal de vitamina A, sem comprometimento da fertilidade das matrizes, do desenvolvimento dos filhotes e com ausência de malformações teciduais.

O presente estudo foi adaptado do modelo descrito acima, utilizando apenas a primeira geração de animais. Assim, matrizes sem deficiência prévia de vitamina A, após o acasalamento passaram a receber dieta isenta desta vitamina durante a gestação e lactação e os filhotes passaram a receber dieta com quantidade de vitamina A inadequada, após o desmame.

A restrição alimentar de vitamina A durante a gestação e lactação, em matrizes previamente saudáveis, têm por finalidade reduzir os estoques maternos e a transferência de vitamina A da matriz para os filhotes pela lactação, sem causar deficiência vitamínica intra-útero ou interferência com o desenvolvimento da prole ^(17,24,41). No presente estudo, os recém-nascidos apresentaram níveis hepáticos de vitamina A semelhantes nos dois grupos. Estes valores são também, próximos aos encontrados na literatura, 20 $\mu\text{mol/kg}$ ⁽²⁴⁾. Este dado mostra que não houve deficiência de vitamina A intra-útero, já que valores reduzidos são os esperados logo após o nascimento ⁽²⁴⁾. Observou-se, ainda que o comportamento semelhante entre os grupos controle e RvitA, em relação ao peso ao desmame e peso no momento do estudo, mostra que não houve

comprometimento do desenvolvimento dos animais durante a fase embriogênica e pós-nascimento.

Outros fatores que poderiam interferir com o desenvolvimento dos animais seriam a quantidade de dieta ingerida e a influência de outros macro ou micronutrientes. Para evitar estes fatores confundidores, foi utilizada a dieta AIN-93 e realizada a quantificação da ingestão. Esta dieta, por ser quimicamente definida, ao ser produzida, permite o acréscimo ou retirada de qualquer composto ou nutriente, com a manutenção das outras substâncias ⁽²⁵⁾. Não é possível com a dieta habitual utilizada em laboratórios, por serem a base de cereais, controlar a quantidade de vitamina A, o que não ocorre com a AIN-93. Observou-se, ainda, que a ingestão de dieta entre os grupos controle e com restrição, dos animais em estudo e de suas progenitoras, foi semelhante, mostrando que não houve interferência de outros nutrientes da dieta nos resultados, já que a única diferença entre elas é a quantidade de vitamina A.

No momento da eutanásia, os animais adultos do grupo controle apresentaram vitamina A total hepática ($1007 \pm 249 \mu\text{mol/kg}$ de tecido hepático) semelhante ao encontrado no trabalho de Gardner & Ross ($917 \pm 71 \mu\text{mol/kg}$ de tecido hepático) ⁽¹⁷⁾. Os animais que receberam dieta restrita em vitamina A, apresentavam níveis séricos de retinol semelhantes ao grupo controle. Os valores encontrados não são considerados baixos, pois são superiores a $0,7 \mu\text{mol/L}$ ⁽¹⁾. O retinol hepático do grupo que recebeu dieta restrita em vitamina A ($124,9 \pm 50,3 \mu\text{mol/kg}$ de tecido hepático) foi inferior ao grupo controle. A deficiência marginal de vitamina A foi caracterizada por Gardner e Ross por níveis séricos de retinol próximo a $0,7 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ e níveis hepáticos de vitamina A total de $3,8 \pm 1,3 \mu\text{mol/kg}$ ⁽¹⁷⁾. Assim, observa-se que no presente estudo a redução da ingestão de vitamina A não causou deficiência deste nutriente, pois, apesar dos estoques hepáticos estarem menores que os do grupo controle, são superiores aos considerados depletados, pela literatura.

No presente estudo, foi observado que a dosagem da vitamina A total no coração dos animais, que receberam dieta restrita deste nutriente, foi inferior a do controle, evidenciando deficiência tecidual deste composto. Este

achado mostra que, outro órgão diferente do pulmão, também apresenta níveis de vitamina A reduzidos, em vigência da restrição alimentar deste nutriente.

Desta forma, é possível que a via de transporte de vitamina A pelos quilomicrons aos tecidos, dependente da ingestão alimentar, tenha importância também no coração ^(2,23,24). Pois, até o presente momento, prevalecia a hipótese que, em vigência de redução de ingestão de vitamina A, a mobilização dos estoques hepáticos seria suficiente para evitar deficiência sérica e conseqüentemente tecidual.

Sabe-se que, em órgãos como o coração, a vitamina A, por meio da ação do ácido retinóico, modula a transcrição gênica envolvida com diversos processos como síntese de proteínas de miócitos, de estruturas da matriz extracelular e produção de energia ^(4,42). No entanto, pouco se sabe sobre a deficiência sistêmica e/ou tecidual de vitamina A sobre o coração após o nascimento.

O presente estudo mostra que a redução tecidual de vitamina A no coração foi suficiente para alterar a morfologia e função deste órgão. A evidência de aumento das cavidades ventricular e atrial, observadas por aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e da razão entre átrio esquerdo e aorta, reflete claramente que houve remodelação cardíaca.

Um dos potenciais mecanismos para que a deficiência tecidual de vitamina A tenha desencadeado remodelação seria por redução da ação do ácido retinóico no coração. Estudos experimentais mostram que a sinalização da expressão gênica, modulada pelo ácido retinóico, tem importante papel na regulação da hipertrofia cardíaca ⁽⁴²⁾. Assim, na falta da ação deste, poderia haver ativação de síntese protéica anormal levando a hipertrofia cardíaca ou a qualquer outra alteração celular, bioquímica e intersticial, capaz de alterar sua forma, dilatando a cavidade ventricular.

Outro mecanismo pelo qual a redução tecidual de vitamina A poderia desencadear remodelação é por meio do estresse oxidativo. Estudos prévios em ratos mostraram que a deficiência marginal de vitamina A causou estresse oxidativo e mudanças nos sistemas de defesa antioxidantes do coração ^(14,43). Entretanto, estes estudos analisaram animais com diferença de peso entre

grupo deficiente e controle, o que poderia favorecer o estresse oxidativo, por desnutrição energético-protéica.

O papel da restrição de vitamina A como indutor de estresse oxidativo pode ser evidenciado pelo fato da deficiência de vitamina A levar a redução dos ácidos graxos essenciais, favorecendo a lipoperoxidação. Outro fator a ser considerado é a interação da vitamina A com outros antioxidantes. Estudos prévios sugerem que a vitamina A interage com outros sistemas antioxidantes não enzimáticos como a vitamina E, zinco, cromo, etc ⁽¹⁴⁾.

O estresse oxidativo é um dos fatores que podem desencadear, participar ou ser consequência do processo de remodelação. Existem genes sensíveis a oxi-redução, que ao serem ativados pelo estresse oxidativo, modulam a síntese protéica envolvida com hipertrofia, com proliferação de fibroblastos, com síntese de colágeno, com atividade das metaloproteases e a inibição da atividade dos sistemas envolvidos com o trânsito de cálcio, entre outros ⁽⁴⁴⁾.

O que se observou, neste estudo, foi que a lipoperoxidação estava aumentada no grupo que recebeu a dieta restrita de vitamina A, observada pelo aumento da formação de hidroperóxidos de lipídeos.

A lipoperoxidação é o dano gerado às membranas de células e de organelas, causado por espécies reativas de oxigênio. O desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e a função dos antioxidantes, a favor do primeiro, levando a dano celular é denominado estresse oxidativo.

De fato, o metabolismo aeróbio do oxigênio por oxidação e redução, ocorre em todo momento no organismo levando a formação de moléculas altamente reativas que incluem os radicais livres (superóxido, radical hidroxila), que apresentam um ou mais elétrons não pareados. Outras moléculas como o peróxido de hidrogênio, não são consideradas radicais livres, mas detêm grande capacidade de causar toxicidade e dano celular ^(44,45). Deve haver, portanto, equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e os sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas antioxidantes enzimáticos mais conhecidos são dependentes da ação da glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Estes sistemas enzimáticos, de forma geral, são capazes de interceptar as espécies reativas já formadas neutralizando os

compostos oxidantes ⁽⁴⁶⁾. Existem ainda os antioxidantes não-enzimáticos hidrofílicos como proteínas, ácido ascórbico, ácido úrico, selênio, manganês, cromo, zinco e lipofílicos como o α -tocoferol. Estes interceptam as espécies reativas de oxigênio, desativando-as por meio da formação de compostos que não são radicais livres e, portanto não reativos ⁽⁴⁶⁾. Para a detecção destes sistemas antioxidantes não enzimáticos, é possível realizar a dosagem individual de cada composto, o que não permite a avaliação da cooperação ou sinergismo entre as substâncias hidrofílicas e lipofílicas ^(47,48). Outro método de detecção destes antioxidantes é por meio da medida da capacidade antioxidante total. Neste, o tecido é exposto a uma substância capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, em seguida é realizada a medida da capacidade dos antioxidantes inibirem a oxidação deste composto. Assim, é possível detectar o efeito cumulativo e integrado entre todas as substâncias antioxidantes e não apenas medidas isoladas de antioxidantes ⁽⁴⁹⁾. Apesar de sua aplicação ainda ser questionada, esta estratégia foi utilizada neste estudo não individualmente, mas em complemento às dosagens de atividades enzimáticas ⁽⁴⁶⁾. A razão entre formação de hidroperóxido lipídico e capacidade antioxidante total (HP/TAS), tem sido utilizada para a avaliação do balanço entre os sistemas oxidantes/antioxidantes ⁽⁵⁰⁾.

No presente estudo, observamos que os sistemas enzimáticos cardíacos não foram afetados pela restrição de vitamina A, já que não houve diferenças entre a atividade da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase no coração dos animais controle e com restrição vitamínica. No entanto, a razão entre a lipoperoxidação e a capacidade antioxidante total foi maior no grupo com restrição vitamínica. Diferente do achado de Oliveros et al. que observaram modificações nos dois sistemas, enzimáticos e não enzimáticos cardíacos, em ratos com deficiência marginal de vitamina A ⁽¹⁴⁾.

Neste estudo, observamos ainda que no fígado, dos animais que receberam dieta restrita de vitamina A, não houve aumento da lipoperoxidação. Este fato ocorreu provavelmente pela ação da enzima superóxido dismutase, reduzida neste grupo. O fígado é o órgão que reflete a o estresse oxidativo de forma sistêmica ⁽⁴⁶⁾. Portanto, é possível que a redução da ingestão de vitamina A

cause aumento do estresse oxidativo sistêmico, requisitando o sistema antioxidante enzimático.

Deste modo, observou-se que a restrição de vitamina A aumentou o estresse oxidativo cardíaco, desencadeou o processo de remodelação, que foi evidenciado pelo aumento das cavidades esquerdas.

Os potenciais mecanismos para ocorrer dilatação destas cavidades podem ser por meio de alterações intersticiais como modificações no colágeno da matriz extracelular ou por hipertrofia excêntrica. Ambos podem ser desencadeados por aumento do estresse oxidativo e por síntese anormal de proteínas resultante da falta de ácido retinóico.

No coração, o colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular. O colágeno tem papel importante no alinhamento entre as fibras musculares e miócitos, na manutenção da estrutura cardíaca, no suporte às tensões mecânicas, auxiliando na contração cardíaca. É necessário, no entanto que exista equilíbrio entre a formação da matriz colágena e sua degradação realizada pelas metaloproteases. A expressão das metaloproteases, enzimas que degradam o colágeno da matriz extracelular, é ativada por estímulos de oxidação e redução. Sendo assim, o estresse oxidativo pode ativar metaloproteases que podem degradar e alterar a composição da matriz extracelular, favorecendo alterações estruturais como dilatação das câmaras ⁽⁵¹⁾. Independentemente das espécies reativas de oxigênio, o ácido retinóico no tecido epitelial interfere com o colágeno, impedindo a degradação do mesmo. Em outro tecido, diferente do coração, a deficiência marginal de vitamina A na modificou a matriz extracelular, alterando a composição do colágeno levando a prejuízo da função renal ⁽¹⁶⁾. Então, é possível explicar a dilatação das cavidades em vigência de restrição de vitamina A por meio do aumento do estresse oxidativo e talvez por ação direta da falta de ácido retinóico na modulação da síntese e degradação da matriz extracelular.

A hipertrofia cardíaca acontece como resposta adaptativa a várias formas de agressão cardíaca. A hipertrofia excêntrica, que ocorre pelo crescimento longitudinal do miócito, em relação à espessura da parede deve ser considerada como um dos mecanismos para dilatação de cavidades. O estresse

oxidativo tem sido apontado como indutor de hipertrofia, por alterar expressão gênica cardíaca estimulando a síntese protéica e o crescimento do miócito ⁽⁵²⁾. Como já citado, o ácido retinóico também regula a hipertrofia cardíaca. No entanto, no presente estudo, as variáveis, peso do ventrículo esquerdo, massa do ventrículo esquerdo e área seccional dos miócitos, semelhantes entre os grupos, mostram que não houve hipertrofia.

O processo de remodelação tem papel fundamental no desenvolvimento de disfunção cardíaca diastólica ou sistólica ^(9,42). Neste estudo não observamos disfunção diastólica. Este fato pode ter ocorrido devido à alta frequência cardíaca do rato, que prejudica a avaliação. Outra justificativa para a ausência de disfunção diastólica seria a dilatação do ventrículo esquerdo, que poderia levar a maior complacência da câmara, mudando a forma de enchimento, não permitindo a visualização desta disfunção.

Os dados ecocardiográficos do presente estudo mostram que houve disfunção sistólica observada pela redução da fração de ejeção, da porcentagem de encurtamento e por maior diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. O estudo ecocardiográfico apresenta a vantagem por ser não invasivo e realizado em condições próximas as fisiológicas, admitindo as variações sistêmicas humorais e mecânicas de cada animal.

O estudo do coração isolado, por sua vez, permite a obtenção de dados sugestivos da função da cavidade cardíaca e do miocárdio. A vantagem deste método é que são retirados os fatores humorais sistêmicos, a carga é controlada e é realizado em presença de marcapasso artificial mantendo-se constante a frequência cardíaca. Assim, este estudo complementa os achados do realizado por meio de ecocardiografia ⁽²⁸⁾.

A primeira derivada positiva da pressão ventricular, que representa a variação máxima da pressão em determinado tempo, e o estresse/ deformação sistólicos são considerado indicadores de contratilidade intrínseca do miocárdio, durante o estudo do coração isolado. A primeira derivada positiva máxima estava reduzida no grupo que recebeu dieta restrita de vitamina A, mas o estresse/deformidade sistólico preservado. Esta função intrínseca ao músculo é complexa e difícil de ser avaliada. Portanto, apesar de não haver diferenças entre

estas duas variáveis, é possível afirmar que houve prejuízo da contratilidade miocárdica, considerando os valores da primeira derivada positiva de pressão.

A contração cardíaca depende da interação de muitos fatores como o trânsito de cálcio, proteínas contráteis, sinalização de estruturas do citoesqueleto, sinalização da matriz extracelular entre outros. Assim, a disfunção ventricular pode ter origem em estruturas do miócito, em alterações na função da cavidade cardíaca ou dependente de fatores humorais sistêmicos ^(9,53).

A disfunção sistólica causada pela remodelação pode ocorrer por aumento da morte celular por apoptose ou por necrose, reduzindo o número de unidades contráteis ⁽⁵³⁾. É possível a ocorrência de alterações na síntese de proteínas contráteis, como o aumento da síntese de miosina de cadeia pesada β (MHC- β), com menor poder contrátil ou redução da MHC- α ⁽⁹⁾.

O citoesqueleto também pode estar envolvido na disfunção miocárdica, pois além de contribuir para a integridade da estrutura cardíaca e resistência mecânica dos miócitos cardíacos, desempenha papel na transmissão de sinais da membrana ao núcleo que podem estar relacionados com a contração cardíaca ⁽⁵³⁾.

O cálcio e sua homeostase são fundamentais para que ocorra contração muscular adequada. Alterações em canais-L, rianodina, calsequestrina, calmodulina, fosfolamban, enzima SERCA-2 entre outros componentes do processo de trânsito de cálcio podem levar a disfunção muscular ^(9,53). O comprometimento da via beta-adrenérgica, que é responsável pela interação do estímulo de catecolaminas com receptores celulares resultando em alterações enzimáticas e iônicas, principalmente no trânsito de cálcio, resultando em contração muscular, é outro potencial mecanismo de disfunção ⁽⁵³⁾.

Alterações no colágeno da matriz extracelular podem levar a disfunção sistólica. O colágeno não tem apenas função em manter a estrutura cardíaca, mas também regulam a apoptose, a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante a contração, sendo importante para a função cardíaca. O aumento de fibrose, em substituição a massa celular dos miócitos ou aumento da degradação do colágeno por ativação das metaloproteases podem ser decisivos para a deterioração da contratilidade cardíaca ⁽⁵¹⁾.

As agressões ao coração capazes de induzir ao processo de remodelação podem alterar a produção de energia deste órgão. Alterações no metabolismo energético podem tanto causar disfunção por déficit de energia, como podem acontecer em consequência da remodelação agravando este processo (55,56).

No presente estudo, o estresse oxidativo pode ter sido um dos responsáveis pela pior função cardíaca dos animais que ingeriram dieta pobre em vitamina A. Este fato pode ser explicado por meio do papel do estresse oxidativo em reduzir a atividade da retículo sarcoplasmático cálcio ATPase SERCA2, que é uma bomba de cálcio de membrana e fundamental para a contração cardíaca adequada (52,54). O estresse oxidativo também pode induzir apoptose, ativar degradação da matriz extracelular pelas metaloproteases, entre outros fatores que regulam a contração cardíaca. Outra explicação pode estar relacionada com o papel do ácido retinóico em modular a expressão das proteínas contráteis como as miosinas de cadeia pesada α e β . Assim, a restrição de vitamina A poderia estar reduzindo a miosina de cadeia pesada α , com maior velocidade e poder contrátil (42).

Neste estudo foram avaliadas variáveis como fibrose e metabolismo energético. Não evidenciamos aumento de fibrose por meio do estudo por microscopia óptica, mas outras alterações na matriz extracelular como ativação de metaloproteases e mudanças no tipo de colágeno não foram avaliadas.

Em relação ao metabolismo energético, sabe-se que em situações normais o coração utiliza os ácidos graxos como principal fonte de energia. Cerca de 60 a 90% do ATP produzido é proveniente desta fonte e o restante de glicose (54). Os ácidos graxos sofrem processo de beta-oxidação até a formação de acetil coenzima A que entrará no ciclo do citrato. Os carboidratos pelo processo da glicólise formam lactato, piruvato e depois acetil coenzima A para o ciclo do citrato. O ciclo do citrato resulta na formação de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) e nicotinamida adenina nucleotídeo (NADH) que entram em cadeia de transporte de elétrons gerando gradiente eletroquímico ao longo da membrana da mitocôndria, permitindo a síntese de ATP. Este processo é denominado fosforilação oxidativa (55). Em situações de estresse cardíaco, os

carboidratos passam a ser a principal fonte de energia, gerando, no entanto, quantidade menor de ATP. Várias enzimas participam deste processo e suas atividades podem sugerir se uma ou outra via estão em bom funcionamento ^(54,55). O presente estudo não encontrou alterações entre a dosagem das enzimas β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase e lactato desidrogenase, mostrando que a via da beta oxidação e via glicolítica estavam preservadas. Outra enzima estudada foi a citrato sintase, que também foi semelhante entre os dois grupos mostrando que a entrada do substrato acetilcoenzima-A no ciclo do citrato também não foi alterada pela restrição de vitamina A. Geralmente durante o processo de remodelação, ocorre alteração do metabolismo energético. Porém, é possível que, pelo fato dos animais estarem em situação de repouso, sem grandes necessidades de geração de ATP, não foram observadas alterações nestas enzimas ^(38,55,56).

Os resultados encontrados neste estudo podem ser esclarecedores dos resultados obtidos por Zornoff et al. em 2005 ⁽⁵⁷⁾. Este mostra que a administração de β -caroteno a ratos adultos levou ao aumento das cavidades e redução da função sistólica, assim como o observado nos animais submetidos à restrição de vitamina A. Sabe-se que o β -caroteno pode ter ação tanto antioxidante, como pró-oxidante. Em relação a sua ação pró-oxidante evidências sugerem que metabólitos do β -caroteno, como o β -Apo-8'-carotenal induzem à atividade de enzimas do citocromo P450, as CYPs, que aumentam o catabolismo do ácido retinóico, depletando o organismo deste composto ^(57,58). Liu et al. observaram que adoninhas expostas a fumaça de cigarro e que receberam suplementação farmacológica de beta-caroteno apresentaram aumento das atividades das CYPs, levando ao aumento do catabolismo do ácido retinóico no tecido pulmonar. Ou seja, os danos gerados pela administração de β -caroteno foram compatíveis com o que ocorre em situações de deficiência tecidual de vitamina A ⁽⁵⁹⁾.

7. CONCLUSÃO

Portanto, pode-se concluir que a restrição dietética de vitamina A é capaz de reduzir os níveis teciduais deste nutriente. Esta deficiência tecidual induziu remodelação cardíaca, observado por aumento das cavidades esquerdas e acompanhado de disfunção sistólica. O estresse oxidativo gerado pela restrição de vitamina A associado à modificação da capacidade antioxidante total são mecanismos participantes do processo de remodelação. Este estudo traz informações inéditas, sugerindo que a redução tecidual de vitamina A, causa lesões e disfunção a órgãos como o coração. Considerando a ingestão inadequada de vitamina A por grande parte da população, esta possibilidade poderia ter implicação em termos de saúde pública. Além disso, estes resultados podem ajudar a explicar achados de outros estudos que envolvem a administração de carotenóides e ácido retinóico.

8. RESUMO

A deficiência de vitamina A é problema de saúde pública mundial e as principais populações acometidas são crianças e gestantes. Existem 250 milhões de pessoas no mundo com esta deficiência e sua principal causa é a redução da ingestão deste composto. O conceito de deficiência de vitamina A consta da depleção de estoques hepáticos associada à redução do retinol sérico.

A deficiência de vitamina A é sabidamente prejudicial à fase embriogênica cardíaca. Após o nascimento, na idade adulta, a vitamina A exerce papel na manutenção da estrutura e função do coração e sua suplementação parece ser benéfica como atenuante da remodelação cardíaca.

Pouco se sabe, no entanto, sobre a influência da deficiência de vitamina A sobre o coração após o nascimento, já que esta carência não é comum na população adulta, devido ao grande estoque hepático. Existe, entretanto, o transporte de vitamina A, para os tecidos, pela via dos quilomicrons. Esta via é dependente da ingestão vitamínica e não de seus estoques. Sendo assim, é possível que a ingestão inadequada deste composto, cause redução tecidual desta vitamina previamente à depleção dos estoques hepáticos e ao aparecimento da deficiência de vitamina A.

Considerando que mais da metade da população brasileira, incluindo adultos, apresenta ingestão de vitamina A inferior a 50% das recomendações, a redução tecidual deste composto passa a ser uma possibilidade ainda não estudada nos tecidos, como o coração. Portanto, formulamos a hipótese que a ingestão inadequada de vitamina A, na ausência de deficiência deste composto, ou seja, com manutenção da retinolemia sérica e estoques hepáticos, leva à redução vitamínica no tecido cardíaco causando remodelação.

Assim, foram estudadas 91 ratas Wistars: 45 do grupo controle e 46 do grupo com ingestão reduzida de vitamina A (RvitA). As ratas controle são filhas de 13 matrizes que durante a gestação e lactação receberam dieta AIN-93 com 4 equivalentes de retinol por grama de dieta (RE/g), considerada adequada para estes animais. As ratas RvitA são filhas de 12 matrizes que durante a gestação e lactação receberam dieta AIN-93 isenta de vitamina A. Quando recém-nascidas, 16 ratas de cada grupo foram eutanasiadas e avaliadas quanto à dosagem hepática de vitamina A. As 29 ratas C e 30 ratas RvitA restantes foram

amamentadas e desmamadas com 21 dias. Após o desmame as ratas C continuaram recebendo a mesma dieta e as ratas RvitA, passaram a receber dieta AIN-93 com 0,18 RE/g de dieta, quantidade considerada inferior à adequada. Estes animais foram criados até atingirem peso entre 200 - 250g, quando foram avaliados por meio da ecocardiografia quanto a variáveis indicadoras de remodelação: função, geometria e massa. Em seguida, os corações de alguns animais foram submetidos à avaliação de função pelo método do coração isolado. Após a eutanásia, foram coletadas amostras de tecidos nos quais foram realizadas dosagens bioquímicas de retinol sérico e hepático, medidas de hipertrofia e de fibrose, dosagens bioquímicas indicativas de lipoperoxidação, dosagens bioquímicas da atividade de enzimas antioxidantes e da capacidade antioxidante total e dosagem de enzimas envolvidas com o metabolismo energético.

Os resultados mostraram dilatação de átrio e ventrículo esquerdos, acompanhados de disfunção sistólica, nos animais com ingestão inadequada de vitamina A, comprovando que houve remodelação cardíaca. Adicionalmente, foi observado aumento da razão entre lipoperoxidação e capacidade antioxidante total. Sendo assim, um dos mecanismos envolvidos no processo de remodelação, causado pela restrição dietética de vitamina A, é o estresse oxidativo.

9. ABSTRACT

Pregnancy and childhood Vitamin A deficiency is an important public health concern. There are 250 million people around the world with this deficiency. The inadequate ingestion of this nutrient is the most important cause of it. Low serum retinol concentration and liver stores severely depleted are the biochemical findings in vitamin A deficiency.

Cardiac embryonic development requires vitamin A. Postnatal heart are also a retinoid target organ, including the remodeling process. In spite of it, there are few studies about vitamin A deficiency at postnatal heart.

Esterified retinol transported in chylomicron to tissues is reduced in low vitamin A ingestion and can cause target organ deficiency in spite of preserved serum and hepatic vitamin A.

The hypothesis of this study is that inadequate vitamin A ingestion, without systemic deficiency of this nutrient, produces low heart levels of vitamin A, resulting in cardiac remodeling.

Wistar female rats were studied: 45 at control group and 46 at diet reduced in vitamin A (RvitA) group. Control rats were born from dams fed with AIN-93 diet sufficient in vitamin A, during pregnancy and lactation. RvitA rats were born from dams fed with AIN-93 vitamin A-free diet, during pregnancy and lactation. Liver vitamin A was measured in sixteen newborns of each group. Twenty nine control rats were fed onto the same diet during weaning and post weaning period. Thirty RvitA rats were fed onto vitamin A-free diet during weaning and vitamin A containing 0,18 retinol equivalent (RE)/g of diet post weaning.

When the animals were 200-250g, they were subjected to a transthoracic echocardiographic exam and to isolated rat heart study. Blood, liver and heart samples were collected to vitamin A dosage, to oxidative stress evaluation, to energetic metabolism evaluation, and to hypertrophy and fibrosis measurements.

The Rvit A animals showed a higher left chamber diameters and a reduced systolic function than the control rats. Also, lipid hydroperoxid/total antioxidant capacity was higher in RvitA animals. In conclusion, heart deficiency of vitamin A, caused by inadequate ingestion of this nutrient causes cardiac remodeling. Additionally, the stress oxidative is one of the mechanisms involved with the findings of this study.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Ross C. Vitamin A and Carotenoids, in Modern Nutrition in Health and Disease. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. Modern nutrition in health and disease. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. P. 351-75.
- 2) Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J. Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroent.* 2001;17:184-92.
- 3) Linting JV, Vogt K. Vitamin A formation in animals: Molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *J Nutr.* 2004;134:251-6.
- 4) Smith SM, Dickman ED. New insights into retinoid signaling in cardiac development and physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 1997;7:324-9.
- 5) Dyson E, Sucov HM, Kubalak SW, Schmidtschonbein GW, Delano FA, Evans RM, Ross J Jr, and Chien KR. Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid-X receptor - α -/- mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:7386-90.
- 6) Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:7391-95.
- 7) Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1996;97:1577-88.
- 8) Wang HJ, Zhu YC, Yao T. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II - induced myocyte hypertrophy. *J Appl Physiol.* 2002; 92: 2162-68.
- 9) Swynghedaumw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79:215-62.
- 10) Paiva SA, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, Zornoff LA. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr.* 2005;135:2326-8.
- 11) Lü L, Yao T, Zhu YZ, Huang GY, Cao YX, Zhu YC. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intrarenal

- arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am j Heart Circ Physiol*. 2003;285:1370-7.
- 12) Zhong JC, Huang DY, Liu GF, Jin HY, Yang YM, Li YF, Song XH, Du K. Effects of all-trans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2005;65:743-50.
 - 13) Paiva, SAR, Zornoff, LAM, Okoshi, MP, Okoshi, K, Matsubara, LS, Matsubara BB, Cicogna, AC, Campana, AO. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol*. 2003;284:2242-6.
 - 14) Oliveros L, Vega V, Anzulovich AC, Ramirez D, Gimenez MS. Vitamin A deficiency modifies antioxidant defenses and essential element content in rat heart. *Nutr Research*. 2000;20:1139-50.
 - 15) Downie D, Antipatis C, Ddelday MI, Maltin CA, Sneddon AA. Moderate maternal vitamin A deficiency alters myogenic regulatory protein expression and perinatal organ growth in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:73-9.
 - 16) Marin MP, Esteban-Pretel G, Alonso R, Sado Y, Barber T, Renau-Piqueras J, Timmoneda J. Vitamin A deficiency alters the structure and collagen IV composition of rat renal basement membranes. *J Nutr*. 2005;135:695-701.
 - 17) Gardner EM, Ross C. Dietary vitamin A restriction produces marginal vitamin A status in Young rats. *J Nutr*. 1993;123:1435-43.
 - 18) Third Report on the World Nutrition Situation. Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition. Geneva: Publications WHO; 1997. 111p.
 - 19) Geraldo RRC, Paiva SAR, Pitas AMCS, Godoy I, Campana AO. Distribution of hypovitaminosis A in Brazil in the last four decades: dietary intake, clinical signs and biochemical data. *Rev Nutr*. 2003;16:443-60.
 - 20) Ramalho RA, Flores H, Saunders C. Hypovitaminosis A in Brazil: a public health problem. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;12:117-22.
 - 21) Cruz AAVE, Castro FAA, Fernandes SL, Cortes JF, Pierre-Filho PTP, Rocha EM, Marchini JS. Adult blindness secondary to vitamin A deficiency associated with an eating disorder. *Nutrition*. 2005;21:630-3.

- 22) Fourth Report on the World Nutrition Situation. Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition. Geneva: Publications WHO; 2000. 121p.
- 23) Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Fainaru M, Brecht WJ, Lindquist L. Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. *J Biol Chem.* 1989;264:9571-82.
- 24) Ross AC, Li N. Lung retinil ester is low in young adult rats fed a vitamin A-deficient diet after weaning, despite neonatal vitamin A supplementation and maintenance of normal plasma retinol. *J Nutr.* 2007;137:2213-18.
- 25) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939-51.
- 26) Sanh DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Ecocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circ.* 1978;58:1072-83.
- 27) Zornoff LA, de Paiva S, Tornero MT, Carvalho MS, Tucci PJ. Influence of mannitol added to the nutrient solution on the mechanical performance and on the degree of myocardial edema of isolated hearts of rats. *Arq Bras Cardiol.* 1995;64:225-9
- 28) Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *Eur J Heart Fail.* 2006;8:874-9.
- 29) Tang G, Krinsky NI. Differentiation between central and excentric cleavage of beta-carotene. *Methods Enzymol.* 1993;214:69-74
- 30) Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI, Russel RM. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:594-602.
- 31) Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1974;358:251-61.

- 32) Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem.*1995;232:243-8.
- 33) Aebi H. *Methods of enzymatic analysis.* 2nd ed. New York: Verlag chemie Weinheim, 1974.
- 34) Rice-Evans C, Miller N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.*1994;234:279-93.
- 35) Jiang ZY, Woolard AC, Wolf S. lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids.*1991;26:853-6.
- 36) Bass A, Brdicka PE, Eyer P, Hofer F, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.*1969;10:198-205.
- 37) Moura RA. *Técnicas de laboratório.* 2nd Ed. São Paulo: Atheneu editora, 1982.
- 38) Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli EL. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition.*2004;20:230-4.
- 39) Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, Weber KT. Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res.*1998;22:686-95.
- 40) Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:1534-9.
- 41) Antipatis C, Grant G, Ashworth CJ. Moderate maternal vitamin A deficiency affects perinatal organ growth and development in rats. *Brit J Nutr.* 2000;84:125-32.
- 42) Pan J, Baker KM. Retinoic acid and the heart. *Vitam and horm.* 2007;75:257-83.
- 43) Arruda SF, Siqueira EMA, Souza EMT. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and Purslane (*Portulaca oleracea*) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rat. *Ann Nutr Metab.* 2004;48:288-95.

- 44) Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart Lung Circ.* 2004;13:132-8.
- 45) Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43:61-8.
- 46) Sies H. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiol.* 1997;82:291-5.
- 47) Sies H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *J Nutr.* 2007;137:1493-5.
- 48) Yeum KJ, Russel RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430:97-103.
- 49) Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review and experimental data. *Free Radic Boil Med.* 2000;29:1106-14.
- 50) Burneiko RCM, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli ELB. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food and Chem Toxicol.* 2006;44:1167-72.
- 51) D'armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:97:102.
- 52) Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:379-88.
- 53) 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.
- 54) Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115:500-8.
- 55) Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut.* 2004;9:31-45.

- 56) Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetic. *Circ res.* 2004;95:568-78.
- 57) Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, 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.* 2006;90:259-66.
- 58) Nagao A. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr.* 2004;134:237-40.
- 59) Liu C, Russel RM, Wang XD. Exposing ferrets to cigarette smoke and pharmacological dose of beta-carotene supplementation enhance in vitro retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J Nutr.* 2003;133:173-9.