

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

***Influência da suplementação de vitamina D na
remodelação ventricular após o infarto do
miocárdio***

Andréa de Freitas Gonçalves

Botucatu

2013

Andréa de Freitas Gonçalves

Influência da suplementação de vitamina D na remodelação ventricular após o infarto do miocárdio

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adj. Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Co-orientador: Dr^a Fernanda Chiuso Minicucci

Botucatu

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Gonçalves, Andréa de Freitas.

Influência da suplementação de vitamina D na remodelação ventricular após o infarto do miocárdio / Andréa de Freitas Gonçalves. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Coorientador: Fernanda Chiuso Minicucci

Capes: 40101100

1. Infarto do miocárdio. 2. Vitamina D. 3. Coração - Ventrículos - Doenças.
4. Apoptose. 5. Protocolos médicos.

Palavras-chave: Infarto agudo do miocárdio; Remodelação cardíaca; Vitamina D.

Dedicat6rias

Aos meus pais *José e Leda*, por guiarem minha formação pessoal, pelos valores ensinados e pelo incentivo que sempre deram à minha carreira profissional.

Ao meu irmão *Fabio*, meu maior exemplo de dedicação, responsabilidade e persistência.

Ao meu namorado *Bruno*, pelo carinho e por ser meu companheiro em todos os momentos.

Agradecimientos especiales

A *Deus*, por sempre me guiar e estar ao meu lado, por colocar em minha vida todos os obstáculos necessários para o meu crescimento, mas também coloca pessoas incríveis em momentos únicos para me ajudar a vencê-los!

Ao meu orientador *Prof. Adj. Leonardo A. M. Zornoff*, pela orientação e pela oportunidade que me deu ao realizar este trabalho, que além do desenvolvimento do projeto, levou a um grande crescimento e amadurecimento profissional. Agradeço à confiança depositada em mim.

Às minhas colegas de pós-graduação e amigas *Bruna* e *Priscila*, que não mediram esforços ao me ensinar o que sabiam e ajudar na execução deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

Agradecimientos

Aos Professores do grupo de pesquisa, *Prof. Dr. Marcos F. Minicucci*, *Prof.^ª Dr.^a Paula S. A. Gaiolla* e *Prof. Adj. Sérgio A. R. Paiva* por sempre colaborarem prontamente e pelos ensinamentos e sugestões durante todo o trabalho.

À *Dr.^a Fernanda Chiuso Minicucci*, pela colaboração com o projeto.

Ao *Prof. Adj. Katashi Okoshi*, pela realização dos exames ecocardiográficos e pela sempre pronta colaboração.

À *Prof.^ª Adj. Marina P. Okoshi*, pelas valiosas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

À *Prof.^ª Dr.^a Bertha F. Polegato*, pela colaboração na realização do estudo do coração isolado e pelas contribuições no Exame Geral de Qualificação. Agradeço a amizade e o respeito que sempre teve por mim.

À *Prof.^ª Dr.^a Ana Angélica H. Fernandes*, do Departamento de Bioquímica, pela colaboração nas análises referentes ao metabolismo energético e estresse oxidativo.

Aos *colegas* de Pós-Graduação do laboratório, por terem compartilhado dificuldades, conquistas e crescimentos em diferentes momentos dessa trajetória.

Aos *colaboradores* do Laboratório Experimental da Clínica Médica, do Departamento de Clínica Médica, da Pós-Graduação e da Biblioteca que auxiliaram nas diferentes e essenciais etapas do projeto.

Aos *amigos e familiares* que sempre estiveram torcendo por mim.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP* pela bolsa de estudos (Processo nº 2011/03135-9) e auxílio financeiro (Processo nº 2010/18176-0).

Meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

“O homem converte-se aos poucos naquilo que acredita poder vir a ser. Se me repetir incessantemente a mim mesmo que sou incapaz de fazer determinada coisa, é possível que isso acabe finalmente por se tornar verdade. Pelo contrário, se acreditar que a posso fazer, acabarei garantidamente por adquirir a capacidade para fazer, ainda que não a tenha num primeiro momento.”

Mohandas Karamchand Gandhi

Sumário

Sumário

| | |
|----------------------|----|
| Resumo..... | i |
| Abstract | iv |
| 1 Introdução..... | 1 |
| 2 Justificativa..... | 8 |
| 3 Hipótese | 10 |
| 4 Objetivo..... | 12 |
| 5 Metodologia..... | 14 |
| 6 Resultados..... | 32 |
| 7 Discussão..... | 62 |
| 8 Conclusão..... | 73 |
| Referências..... | 75 |

Resumo

Resumo

O processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio está associado a pior prognóstico. Na fase aguda, a remodelação favorece a formação do aneurisma e predispõe o coração infartado à ruptura ventricular. Cronicamente, está associada com maior prevalência de arritmias malignas e disfunção ventricular, pois a região infartada sofre alterações genéticas, estruturais e bioquímicas que vão resultar em deterioração da capacidade funcional do coração e morte. Portanto, estratégias que atenuam a remodelação resultam em melhora do prognóstico pós-infarto.

Evidências recentes sugerem que alterações dos níveis de vitamina D podem resultar em importantes ações cardiovasculares. Adicionalmente, modelos experimentais sugerem que ela poderia modular o processo de remodelação cardíaca. Porém, os efeitos da suplementação de vitamina D sobre o coração após o infarto não são conhecidos.

No nosso protocolo, avaliamos os efeitos da suplementação de vitamina D nas alterações morfológicas e funcionais cardíacas após o infarto agudo do miocárdio em ratos, por meio do estudo de alguns dos principais mecanismos envolvidos no processo de remodelação cardíaca: hipertrofia e alterações da geometria ventricular, alterações funcionais, quantidade de colágeno, estresse oxidativo, metabolismo energético, inflamação, apoptose e alterações na distribuição das cadeias pesadas da miosina.

Nos nossos resultados, observamos que animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D apresentaram aumento dos diâmetros sistólicos e diastólicos do ventrículo esquerdo, aumento das áreas sistólicas e diastólicas associado à diminuição da fração de variação de área, da fração de ejeção e da velocidade de encurtamento da parede posterior; diminuição da pressão arterial sistólica; aumento da apoptose por meio do aumento da expressão das proteínas caspase 3 e diminuição da bcl-2; além da diminuição da atividade da enzima fosfofrutoquinase. Não houve interação entre os fatores infarto e vitamina D para cadeias pesadas de miosina, atividade das metaloproteinases, estresse oxidativo, ICAM-1, TIMP e IL-10.

Assim, podemos concluir que a suplementação de vitamina D intensificou o processo de remodelação cardíaca. Esse fenômeno parece ser mediado pela indução da apoptose e redução do substrato energético cardíaco, mas não por alterações do estresse oxidativo, inflamação e cadeia pesada da miosina.

Abstract

Abstract

The process of cardiac remodeling after myocardial infarction is associated with poor outcome. In the acute phase, remodeling promotes the formation of the aneurysm and predisposes to ventricular rupture. Chronically, it is associated with higher prevalence of malignant arrhythmias and ventricular dysfunction, because the non infarcted region undergoes genetic, structural and biochemical changes which will result in impairment of functional capacity of the heart and death. Therefore, strategies to attenuate remodeling result in improved prognosis after myocardial infarction.

Recent evidence suggests that changes in the levels of vitamin D can result in important cardiovascular actions. Additionally, experimental models suggest that it could modulate cardiac remodeling process. However, the effects of vitamin D supplementation on heart after infarction are not known.

In our study, we assessed the effects of vitamin D supplementation on cardiac morphological and functional changes after acute myocardial infarction in rats by studying some of the key mechanisms involved in heart remodeling: hypertrophy and changes in ventricular geometry, functional changes, collagen amount, oxidative stress, energy metabolism, inflammation, apoptosis and changes in the distribution of myosin heavy chains.

In our results, we found that infarcted animals that received vitamin D supplementation had higher left ventricle systolic and diastolic diameters, increased systolic and diastolic areas associated with decreased fractional area change, ejection fraction and posterior wall shortening velocity, decreased systolic blood pressure, increased apoptosis by increasing the expression of proteins caspase 3 and decreased bcl-2, decreased activity of the enzyme phosphofructokinase. There was no interaction between infarct and vitamin D for myosin heavy chains, metalloproteinase activity, oxidative stress, ICAM-1, IL-10 and TIMP.

Thus, we can conclude that vitamin D supplementation intensified the process of cardiac remodeling. This phenomenon seems to be mediated by apoptosis induction and decreased cardiac energy substrate but not by changes in oxidative stress, inflammation and myosin heavy chain.

1. Introdução

1 Introdução

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em todo o mundo. Em 2008, segundo a *World Health Organization*, 17,3 milhões de pessoas morreram em todo o mundo vítimas de patologias cardiovasculares, sendo que 42% foram decorrentes de doenças isquêmicas do coração. Estima-se que, em 2030, o número de mortes envolvendo todas essas causas suba para 23,6 milhões¹. No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que no ano de 2012, até o mês de setembro, foram registradas quase 327 mil mortes decorrentes de doenças do aparelho circulatório, sendo que 30,6% foram de doenças isquêmicas do coração².

Após o infarto agudo do miocárdio, o coração pode sofrer complexas alterações conhecidas como remodelação cardíaca. Estas alterações podem ocorrer após diferentes processos de injúria, como sobrecarga de pressão (hipertensão, estenose aórtica), sobrecarga de volume, miocardites e infarto do miocárdio. Este evento é uma forma de adaptação do coração frente às novas condições impostas pela agressão, embora também seja responsável pelo aumento da morbimortalidade após o infarto³. Trata-se de processo complexo que pode atingir tanto a área infartada quanto a não infartada. As alterações da arquitetura ventricular como tamanho, massa, geometria e função do coração são consequências de alterações genéticas, moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que são as características do evento^{4, 5}. Entre as principais alterações, podemos citar alongamento dos miócitos, afinamento da parede ventricular, inflamação e reabsorção do tecido necrosado, formação de cicatriz, dilatação do ventrículo, hipertrofia do miócito, perda de miócitos, excessiva deposição de colágeno no interstício e apoptose⁴.

Na fase inicial de remodelação no infarto, o processo necrótico é acompanhado da desintegração de colágeno, importante para a sustentação tecidual, por meio da ativação das metaloproteinases⁶. Em consequência, a área infartada se torna mais susceptível a deformações podendo ocorrer deslizamento e realinhamento dos

miócitos da área de necrose. Dessa forma, a região atingida torna-se mais fina, dilatando a cavidade, assumindo uma forma esférica e não mais elíptica. É a chamada expansão do infarto^{4, 5, 7}, que é mais comum em infarto transmural e se associa ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva, aneurisma e ruptura ventricular. A dilatação da cavidade aumenta o estresse sistólico e diastólico, sendo posterior estímulo à hipertrofia da área não infartada⁶.

Na fase crônica, a cavidade ventricular esquerda pode continuar a aumentar com o tempo, agora, devido a modificações da região não infartada. Este fenômeno se deve à hipertrofia cardíaca de padrão excêntrico, sendo resultado das novas condições de carga impostas ao ventrículo infartado, devido à perda de tecido contrátil e ao processo de expansão. Outro estímulo à hipertrofia do segmento não infartado é a eventual ativação de fatores neuro-humorais e inflamatórios. Também nessa fase, além de aumentar a prevalência de arritmias malignas, principalmente a taquicardia ventricular sustentada e a fibrilação ventricular, o processo de remodelação desempenha importante papel no desenvolvimento de disfunção do ventrículo. Caso as alterações sofridas, inicialmente com objetivo de reagir às injúrias, se perpetuem, pode levar a deterioração da capacidade funcional do coração, com aparecimento de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e morte^{4, 5, 7}.

Embora o processo de remodelação possa levar à perda progressiva da função cardíaca, os mecanismos que levam a este processo não estão completamente elucidados. Entre os mecanismos envolvidos, podemos destacar modificações nas proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio; alterações das proteínas contráteis, em particular as isoformas da cadeia pesada da miosina; aumento da morte celular, principalmente por apoptose; acúmulo de colágeno, resultando em fibrose; alterações das metaloproteases, em particular o aumento da atividade das metaloproteases 2 e 9; aumento do estresse oxidativo; déficit energético, com aumento da atividade da via glicolítica e diminuição na utilização de ácidos graxos livres; alteração na produção de citocinas inflamatórias e alterações da geometria ventricular⁸⁻¹³.

Pelo exposto, aceita-se que a remodelação cardíaca está associada com disfunção ventricular e mau prognóstico. Portanto, devido ao grande impacto sócio-

econômico e às altas taxas de mortalidade, torna-se relevante a identificação de fatores que modulem o processo de remodelação ventricular. Entre esses fatores encontra-se a vitamina D¹⁴.

A vitamina D pode ser considerada um hormônio esteróide. Suas formas são vitamina D3 (colecalfiferol) e vitamina D2 (ergocalciferol), que são diferentes pela sua cadeia lateral. A vitamina D2 é obtida pela irradiação de plantas, enquanto a vitamina D3 é formada naturalmente na pele após exposição aos raios UV e também por meio da ingestão de alimentos como peixes, seus óleos e ovos. Existem fatores que favorecem a deficiência dessa vitamina, como a idade, pigmentação da pele, uso de protetor solar,¹⁵ síndromes má absorptivas, obesidade e uso de medicamentos, como os glicocorticóides¹⁶.

A vitamina D3 sofre hidroxilação no fígado tornando-se 25-hidroxitamina D3 (25(OH)D) e subsequentemente, outra hidroxilação nos rins, assumindo a estrutura 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)2D), que é a forma ativa da vitamina. Quando a esta atinge quantidade suficiente, o rim forma a 24,25(OH)2D, que é então catabolizada. Os metabólitos da vitamina D são carregados na circulação pela proteína ligante de vitamina D, que possui grande afinidade por 25(OH)D, 1,25(OH)2D, 24,25(OH)2D¹⁵.

Por meio da circulação, a 1,25(OH)2D entra na célula e liga-se ao receptor de vitamina D (VDR) ativando-o e formando um heterodímero com o receptor rexinóide (RXR). O complexo VDR-RXR atua na transcrição e regulação dos genes¹⁷. Proteínas como a proteína ligadora de cálcio (calbindina) ou osteocalcina são exemplos de proteínas sintetizadas por essa interação e atuam no transporte ativo do cálcio na célula. A produção de 1,25(OH)2D é estimulada pelo paratormônio (PTH). Existe feedback negativo por meio do cálcio, que reduz o PTH e um efeito direto do 1,25(OH)2D no PTH¹⁵.

Além do controle de cálcio e fósforo já bem descritos na literatura, a vitamina D tem sido associada a outros processos fisiológicos e patológicos do organismo como câncer, psoríase, doenças autoimunes, imunidade inata e diabetes tipo 2¹⁸.

Relevância clínica das alterações de vitamina D

A deficiência de vitamina D é prevalente em todo o mundo. Os principais fatores que influenciam essa deficiência são síntese cutânea limitada devido à pigmentação da pele, inadequada exposição solar e ingestão deficiente de alimentos fontes de vitamina D¹⁹. Envelhecimento²⁰, obesidade²¹, medicamentos como glicocorticóides e antidepressivos, além de síndromes de má-absorção são também fatores conhecidamente associados à hipovitaminose D¹⁶.

Estudos epidemiológicos associaram a deficiência de vitamina D a condições de saúde adversas^{22, 23}. A hipovitaminose D induz diminuição na absorção do cálcio e alteração na atividade óssea e neuromuscular^{24, 25}. As consequências bem conhecidas da deficiência grave são raquitismo em crianças²⁶ e osteomalacia em adultos²². Entretanto, há indícios de que baixa concentração sérica de 25(OH)D está associada a outros efeitos adversos tais como aumento no risco de osteoporose²⁷, maior susceptibilidade a infecções, doenças autoimunes²⁸ e cardiovasculares¹⁹.

Estudos epidemiológicos e dados clínicos associaram a deficiência de vitamina D ao aumento na morbidade e mortalidade de doenças cardiovasculares^{29, 30}. Em pacientes com insuficiência cardíaca observa-se concentração reduzida de 25(OH)D, principalmente entre pacientes em estágio terminal da doença²⁹. Além disso, os níveis de 25(OH)D correlacionam-se com a severidade e prognóstico da insuficiência cardíaca²⁹. Estudo experimental realizado em nosso laboratório com ratos normais mostrou que a deficiência de vitamina D, induzida por ingestão insuficiente dessa vitamina, levou à remodelação cardíaca, com piora de função sistólica, aumento do conteúdo de colágeno da matriz extracelular e alteração do metabolismo energético³¹.

Apesar dessas evidências clínicas, a associação entre as alterações cardíacas e a deficiência de vitamina D ainda não é completamente compreendida^{32, 33}, e não se sabe se a deficiência de vitamina D é secundária à insuficiência ou se de alguma forma a deficiência de vitamina D poderia determinar alterações cardíacas que culminassem com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

Suplementação de vitamina D

Em ratos, a vitamina D também pode ser sintetizada na pele por intermédio de raios ultravioleta, porém os valores de recomendação de ingestão diária não são bem esclarecidos, sendo estipulado, na ausência de dados, o valor diário de 1000 UI de vitamina D/Kg de ração^{34, 35}. Logo, os valores utilizados em estudos envolvendo suplementação são diversificados.

Em estudo utilizando ratos para avaliar metabolismo e a contratilidade cardíaca, os ratos do grupo controle foram suplementados com vitamina D na dose 3000 UI/kg de ração³⁶. Sinais de toxicidade pela vitamina D como diarreia, perda de peso, hipercalcemia e calcificação dos rins foram observados por Shepard e DeLuca ao suplementarem doses maiores que 1000 UI de vitamina D3 (aproximadamente 30000 UI/Kg de ração)³⁷.

Em relação aos efeitos da suplementação de vitamina D, recentes estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a suplementação com colecalciferol ou seus análogos pode causar alterações funcionais e estruturais no coração³⁸⁻⁴⁰. Em modelos com humanos, pacientes que realizavam terapia regular de hemodiálise, suplementados com um análogo sintético da vitamina D, apresentaram melhora na função sistólica e diastólica, além de redução da hipertrofia cardíaca⁴¹.

Em modelo experimental de hipertensão arterial (e conseqüente hipertrofia ventricular esquerda), os animais suplementados com um análogo da vitamina D apresentaram menor hipertrofia e pressão associadas à melhora da função cardíaca³⁹. Em modelo de agressão cardíaca com exposição dos animais à fumaça de cigarro, a suplementação de vitamina D atenuou a remodelação por atuação na capacidade antioxidante e hipertrofia cardíaca⁴². Em estudo realizado em nosso laboratório com ratos normais suplementados com diferentes doses de vitamina D, não foi observada remodelação cardíaca. Porém os animais que receberam a suplementação apresentaram maiores valores de pressão sistólica e de mediadores inflamatórios no coração e alteração na utilização de substrato energético cardíaco^{43, 44}.

Portanto, as evidências acumuladas até o momento em diferentes modelos experimentais, permitem a proposição de que a vitamina D pode modular o processo de remodelação cardíaca. No entanto, os efeitos da suplementação de vitamina D no processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio não são conhecidos.

2. Justificativa

2 Justificativa

Considerando que tanto o infarto do miocárdio quanto as alterações da vitamina D são altamente prevalentes em todo o mundo, a descoberta do papel da vitamina D como moduladora do processo de remodelação torna-se relevante, podendo levar a importantes repercussões clínicas.

3. Hipótese

3 Hipótese

Formulamos a hipótese de que a vitamina D atenua o processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio.

4. Objetivo

4 Objetivo

Avaliar a influência da suplementação da vitamina D sobre a remodelação ventricular cardíaca após o infarto em ratos, por meio de análise de variáveis morfológicas, funcionais, bioquímicas, celulares e intersticiais cardíacas.

5. Metodologia

5 Metodologia

O protocolo experimental deste trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da nossa instituição. Quando os animais atingiram o peso entre 200 e 250g, o experimento foi iniciado. Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos: um grupo Infarto, que foi submetido ao infarto experimental, e o outro grupo Sham, que sofreu cirurgia simulada (mesmo procedimento do infarto experimental, mas sem a oclusão da artéria coronária).

Infarto experimental

O infarto agudo do miocárdio foi produzido de acordo com método inicialmente descrito por Heimburger e modificado por Pfeffer e colaboradores⁴⁵⁻⁴⁷. Após anestesia com cloridrato de cetamina (70mg/kg), por via intramuscular, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4^o e o 5^o espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria descendente ligada a aproximadamente 2 mm da origem com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado, com aspiração do pneumotórax.

Estudo ecocardiográfico

Após 3 a 5 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado o primeiro estudo ecocardiográfico para aferição do tamanho do infarto dos animais e

assegurar que não havia diferenças entre os grupos. No final dos três meses de acompanhamento, foi realizado novo estudo ecocardiográfico.

Nos dois momentos, o procedimento foi o mesmo. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg), por via intramuscular. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo, para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento Vivid S6 da General Electric Medical Systems (Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz.

A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor, operando em 5,0 MHz. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ($TRIV/(R-R)^{0,5}$). A avaliação conjunta da função diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico (índice de Tei). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E e E' (E/E').

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional, na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor, com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. A espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) também foi avaliada pelo modo-M. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100 mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da *American*

*Society of Echocardiography*⁴⁸ e já validadas no modelo de ratos infartados. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (EDPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede da cavidade. As áreas diastólicas e sistólicas foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo maior e eixo menor. A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada calculando-se a fração de variação de área (FAV=AD-AS/AD x 100) e velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. As medidas referentes aos fluxos foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, em cinco ciclos cardíacos consecutivos.

O aparelho utilizado não foi feito para pequenos animais. No entanto, com a utilização de transdutor adequado, foi possível a aquisição de imagens adequadas das estruturas cardíacas de roedores.

Acompanhamento durante o período experimental

Após o estudo ecocardiográfico inicial, os animais foram novamente subdivididos, para resultar em 4 grupos experimentais de observação. A alocação dos animais em grupos experimentais foi feita da seguinte forma:

a) Grupo Sham dividido em dois novos grupos:

- Grupo sham controle (SC)

Animais Sham que receberam ração padrão adicionadas de óleo.

- Grupo sham vitamina D (SD)

Animais Sham que receberam ração padrão adicionadas de óleo e colecalciferol (3000 UI/Kg ração).

b) Grupo Infarto dividido em dois novos grupos:

- Grupo infarto controle (IC)

Animais Infartados que receberam ração padrão adicionadas de óleo.

- Grupo infarto vitamina D (ID)

Animais infartados que receberam ração padrão adicionadas de óleo e colecalciferol (3000 UI/Kg ração).

Acondicionamento dos animais

Os animais foram acondicionados no biotério em gaiolas individuais, com livre acesso a água e ingestão controlada de ração. A temperatura foi mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e a umidade controlada. Os ciclos de luz (claro/escuro) foram de 12 horas.

A ração foi ofertada diariamente e quantificada o que não havia sido consumida no dia anterior. Foi utilizada ração triturada Nuvilab (Nuvital[®], com a seguinte composição por Kg de ração: Vitamina A 12000 UI; vitamina D 1800 UI; vitamina E 30 mg; vitamina K 3mg; vitamina B1 5 mg; vitamina B2 6mg; vitamina B6 7 mg; vitamina B12 20mcg; niacina 60mg; ácido pantotênico 20mg; ácido fólico 1mg; biotina 0,05mg; colina 600mg; ferro 50mg; zinco 60mg; cobre 10mg, iodo 2mg; manganês 60mg; selênio 0,05mg; cobalto 1,5mg; metionina 300mg; lisina 100mg; cálcio 1,4%; fósforo 0,8%). Como a vitamina D é lipossolúvel, o colecalciferol (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, MO, USA) foi diluído em óleo de milho (10ml/Kg ração), antes de ser adicionada a ração triturada. A ração para o grupo Sham foi preparada da mesma forma, sendo adicionado apenas o óleo (10ml/Kg ração). Após a adição de óleo, a ração foi misturada e peletizada. Após processo de secagem foi armazenada em freezer (-14°C).

Durante todo o período experimental, os animais foram pesados uma vez por semana.

Aferição de pressão arterial sistólica

Uma semana antes da eutanásia dos animais, a pressão sistólica caudal foi aferida. O registro gráfico da pressão sistólica caudal foi realizado indiretamente por pletismografia de cauda. Foi utilizando polígrafo, sensor e eletroesfigmomanômetro. Para produzir vasodilatação da artéria caudal, os animais foram mantidos por 5 minutos em caixa aquecida a 40°C. Após o aquecimento, os animais foram transferidos para um cilindro que permite a exposição da cauda do animal onde foi acoplado o sensor e o manguito. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e desinsuflado progressivamente. As pulsações arteriais foram registradas em esfigmomanômetro.

Estudo do coração isolado - Preparação de Langendorff - Avaliação funcional "in vitro"

Após a realização do segundo ecocardiograma, 6 animais de cada grupo receberam pentobarbital sódico (50 mg/kg) e heparina (1000 UI) por via intraperitoneal e foram ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto, as carótidas ligadas, a aorta cateterizada com cânula de metal número 15 e foi iniciada 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 manitol, na concentração de 8 mmol, para assegurar maior preservação miocárdica. Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sacks Electronic-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, 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 seringa contendo água, que permitiu 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 entre 200-250. Por meio da preparação descrita, foram obtidas curvas de Starling com infusão de líquido no balão, que permitiu variar a pressão diastólica no ventrículo esquerdo de 0 a 25 mmHg, através de incrementos graduais de 5 mmHg, registrando-se as pressões sistólica e diastólica 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.

Eutanásia e coleta de material biológico

Após o estudo ecocardiográfico final, os animais foram anestesiados com dose excessiva de pentobarbital. Foram coletados pulmão, fígado para estudo morfométrico. O coração foi dissecado em átrio direito (AD), átrio esquerdo (AE) e ventrículo direito (VD) que foram utilizados para aferição da porcentagem de água e ventrículo esquerdo (VE) que foi seccionado anel para confecção de lâminas histológicas. O material do restante foi colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80°C. O sangue foi coletado e centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos a 4°C, coletado o sobrenadante e armazenado a -80°C.

Estudo morfométrico

a) Porcentagem de água nos tecidos

Pulmão, fígado, AD, AE e VD foram pesados e colocados por 24 horas em estufa a 80°C. Após esse período, foram novamente pesados para obter a porcentagem de água no tecido (relação entre peso úmido e peso seco), segundo a fórmula:

$$\% \text{ água} = [(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) \times 100] / \text{peso úmido}$$

b) Análise histológica

Após coleta do coração, um anel do VE de aproximadamente 3 mm, seccionado de 4 a 6 milímetros da ponta do VE, foi retirado e colocado em formol tamponado (formol a 10%) por 24 horas^{49, 50}. Depois, foi lavado em água corrente por mais 24 horas e então armazenado em álcool 70% e incluso em parafina.

Foram realizados cortes histológicos de 4 µm nos blocos de parafina e, os mesmos, corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para que posteriormente fossem aferidas as áreas seccional transversa dos miócitos (ASM). Empregou-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador com programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 µm e corados pela técnica de Picro Sirius red, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo e para determinação do tamanho do infarto. Este foi calculado pela soma do comprimento endocárdico e epicárdico do segmento infartado, em relação à soma do comprimento endocárdico e epicárdico total do ventrículo esquerdo. Em relação à determinação do colágeno, a leitura foi feita utilizando-se o mesmo microscópio e sistema acima descrito.

Dosagem de fósforo e cálcio

O cálcio foi dosado no soro por meio da reação com arsenazo III em pH neutro, formando um complexo cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade de cálcio na amostra. A cor obtida foi medida a 600-650 nm em espectrofotômetro.

A dosagem de fósforo inorgânico foi realizada por método colorimétrico (teste kit Laborlab, Laborlab Produtos para Laboratório, SP, Brasil). O fosfato inorgânico presente no soro reage em meio ácido com molibdato e obtém-se o complexo fosfomolibdato, que é reduzido pelo ácido ascórbico a azul de molibdeno, desenvolvendo-se a cor em meio arsenito/citrato. Este combina-se com o excesso de molibdato impedindo sua reação posterior com o fosfato liberado dos estéreis lábeis. A cor obtida foi medida entre 620 e 650 nm.

Dosagem de IL-10, ICAM-1 e TIMP

Para avaliação pelo método ELISA sanduíche, foi feita a extração da proteína do tecido cardíaco adicionando 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco. O material foi homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 minutos à 4º C e 12.000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford⁵¹ e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. Nesse extrato proteico foi avaliada a concentração de IL-10, ICAM-1 e TIMP. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IL-10 ou anti-ICAM-1 ou anti-TIMP de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionada 300 µL da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de IL-10, ICAM-1 e TIMP, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IL-10 ou anti-ICAM-1 ou anti-TIMP de rato biotinilados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluído 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas

foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492 nm.

Atividade de metaloproteinases

A atividade das metaloproteinases foi avaliada por zimografia, conforme descrição abaixo.

Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X e 10 mM CaCl₂. Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 200 µl deste tampão. As amostras foram trituradas a 21.000 rpm e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliácridamida a 8% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean, a 80 V por 2 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado 2 vezes, por 30 minutos cada vez, em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 18 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de CaCl₂, em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação, o gel foi corado com Comassie blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético⁵². Os géis foram fotografados no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA), e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gelpro, que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel.

Cadeias pesadas de miosina

As cadeias pesadas de miosina foram separadas em processo de eletroforese de proteínas, segundo metodologia:

a) Extração de proteínas do tecido miocárdico

Foram adicionados 60 mg de tecido cardíaco a 1,5ml de tampão contendo K_2HPO_4 1M; KH_2PO_4 1M; sucrose 1M; DTT 0,1M, EDTA 0,5M; PMSF 0,1M; NaF 0,5M; inibidor de fosfatase (P2714, Sigma-Aldrich). O tecido foi homogeneizado a 21500 rpm, por 3 vezes de 10 segundos, com o recipiente mantido em gelo. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. A quantidade de proteína na amostra foi quantificada pelo método de Bradford⁵¹.

b) Eletroforese em gel e análise de imagens

O gel de separação utilizado foi de 1,5mm, constituído por acrilamida 8%, glicerol, Tris 1,5M, SDS, Persulfato de amônia e TEMED. O gel superior é composto por acrilamida 4%, glicerol, água, Tris 1,5M, SDS, persulfato de amônia e TEMED. Após a polimerização, os pocinhos formados foram lavados com azul de bromofenol e então, as amostras foram pipetadas, tendo o músculo sóleo como amostra padrão de corrida. O tampão de corrida inferior (lower buffer) é composto por SDS, Tris e glicerol, enquanto o superior (upper buffer) tem a mesma composição, acrescido de 2-mercaptoetanol. Com o aparato montado, a corrida durou 6 horas a 70V e 40 horas a 100V. Após a corrida, o gel foi corado com Comassie Blue e analisado no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA), onde também foram quantificadas as bandas.

Determinação do metabolismo energético e estresse oxidativo

Para avaliação por espectrofotometria, amostras de aproximadamente 200 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas a 10000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, hidroperóxido de lipídios, atividade das enzimas antioxidantes e as do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial foi determinada após ressuspensão do *pellet* com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de

sacarose e 2mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e centrifugação (10000 rpm, 5 minutos, 4⁰C), de acordo com técnica adaptada de Cassina e Radi ⁵³.

As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μQuant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes utilizados foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

a) Metabolismo energético

- **Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)**

A atividade da LDH foi determinada de acordo com metodologia proposta por Wilkinson⁵⁴ com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH₂, (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

- **Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK)**

A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose -6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂, segundo método descrito por Bass *et al*⁵⁵.

- **Determinação da atividade do complexo piruvato desidrogenase (PI-DH)**

Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) determinou-se a atividade da PI-DH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, MgCl₂, NBT (nitrobluetetrazóilico), piruvato de sódio e fenazina metasulfato, onde se mediu a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD ⁵⁵.

- **Determinação da atividade da citrato sintase**

A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase, cuja atividade foi determinada na

presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB (dithiobis-2-nitrobenzoato) em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0⁵⁵.

- **Determinação da atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH)**

Foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH⁵⁵.

- **Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (complexo I)**

A atividade do complexo I foi determinada pelo método de Singer⁵⁶ em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, onde monitorou a velocidade de oxidação do NADH.

- **Determinação da atividade da succinato desidrogenase (complexo II)**

A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi medida pelo método descrito por Fischer *et al*⁵⁷ em meio com tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e DPIP (diclorofenolindofenol), o qual teve absorbância, a 600nm, diminuída.

- **Determinação da atividade ATP sintetase**

A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0, na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase⁵⁸.

b) Avaliação do estresse oxidativo

- **Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio**

O hidroperóxido de lipídio foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe²⁺) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90%⁵⁹.

- **Determinação da atividade da glutatona peroxidase (GSH Px)**

Foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutatona reduzida, azida sódica, EDTA, glutatona redutase, a qual catalisa a redução da glutatona oxidada⁶⁰.

- ***Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)***

A atividade da SOD foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH₂ e fenazina metassulfato⁶¹.

Determinação da apoptose

A expressão das proteínas caspase 3 e bcl-2 foi realizada pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

a) Extração das proteínas miocárdicas

Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 mL de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford⁵¹ utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.

b) Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C com 50 μ g de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução, determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada, foi de 15% para a caspase e 12% para a bcl-2. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2,5 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

c) Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, em agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0 e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1,5 horas em agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram analisadas

no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA) nos tempos padronizados para cada proteína estudada. Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH. As mesmas membranas foram lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos para o GAPDH e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente.

Uma vez com os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi feita da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pela amostra de um animal e repetido em todos os géis; 2) o GAPDH, da mesma forma, foi normalizado pelo animal repetido em todos os géis; 3) as proteínas (já normalizadas) foram então normalizadas pelo GAPDH (já normalizado), para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot.

d) Anticorpos primários utilizados

- Caspase 3, rabbit monoclonal IgG (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA, 9664). Diluição utilizada 1:1000.
- Bcl2, rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc492). Diluição utilizada de 1:200.
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada 1:10000.

e) Anticorpos secundários utilizados

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005). A diluição utilizada foi de 1: 5000.
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004). A diluição utilizada foi de 1: 2000.

Fator Nuclear Eritróide 2 (Nrf-2)

A expressão do Nrf-2 foi realizada pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

a) Extração das proteínas miocárdicas

Fragmentos de aproximadamente 60 mg de tecido cardíaco foram homogeneizados com 500µl de tampão de extração (10mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,05% NP40) manualmente com bastão de vidro, aguardado 10 minutos e centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado (fração citoplasmática) e o pellet ressuspendido com tampão (5mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 0,5mM DTT, 26% glicerol (v/v)) adicionado a NaCl, homogeneizado. Após aguardar 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 15000 rpm, por 20 minutos 4°C e coletado o sobrenadante (fração nuclear), que foi utilizado para a quantificação do Nrf2. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford⁵¹ utilizando-se a curva de BSA Protein Standard como padrão.

b) Eletroforese em gel

Realizada com a mesma metodologia utilizada na apoptose, já descrita anteriormente, com as seguintes diferenças: gel de resolução utilizado de 10% e corrida a 100V por 2 horas e 20 minutos.

c) Transferência e identificação das proteínas

Realizada com a mesma metodologia utilizada na apoptose, já descrita anteriormente.

d) Anticorpos primários utilizados

- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada: 1:5000.

- Nrf-2, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-722).
A diluição utilizada foi de 1: 400.

e) Anticorpos secundários utilizados

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
A diluição utilizada foi de 1: 5000.
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004). A diluição utilizada foi de 1: 8000.

Análise estatística

Quando os dados apresentaram distribuição normal, eles foram apresentados em média \pm erro padrão. Caso não tenham distribuição normal, foram transformados e também expressos em média \pm erro padrão.

Para comparação do tamanho do infarto, foi utilizado o teste t de Student. Nas demais variáveis, a comparação entre os grupos foi feita pelo teste ANOVA de duas vias. Cabe ressaltar que neste teste, é feita inicialmente a comparação da influência dos fatores de forma independente: fator infarto (I) e fator vitamina (VD). Após esta primeira comparação, havendo interação entre os fatores, é realizado o pós-teste de Holm-Sidak para verificação da diferença entre os grupos. Nesse caso, a comparação é feita entre os grupos infartados (IC e ID), os grupos sham (SCxSD), os que receberam vitamina D (IDxSD) e os que receberam ração padrão (ICxSC).

Os resultados foram apresentados em tabelas, e quando houve interação entre os fatores, foi feita a representação na forma de figuras para mostrar as diferenças entre os grupos, adotando o sinal (*) como indicativo da comparação que apresentou diferença.

O pacote estatístico utilizado foi o *SigmaStat for Windows* versão 3.5 (Systat Software, Inc) e os gráficos foram elaborados no programa *SigmaPlot for Windows* versão 11.0 (Systat Software, Inc).

Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

6. Resultados

6 Resultados

Peso dos animais, consumo de ração e mortalidade

Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso dos animais SC=466,1±8,8g; SD=451,1±8,8g; IC=459,1±8,8g; ID=445,8±8,5g; p(I)=0,483; p(VD)=0,109; p(IxVD)=0,928) e na ingestão de ração (SC=25,8±0,2g; SD=24,6±0,23g; IC=25,7±0,21g; ID=25,4±0,21g; p(I)=0,187; p(VD)=0,101; p(IxVD)=0,143).

Quanto à mortalidade, até as 48 horas após a cirurgia de indução do infarto houve mortalidade de 53% dos animais. Durante o período experimental, não houve perda de nenhum animal nos grupos sham, e nos animais infartados não houve diferença na mortalidade entre os grupos (IC=25%, ID=26,9%, p=0,5).

Pressão arterial sistólica

No nosso experimento, houve redução da pressão nos animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D em relação ao grupo de animais infartados sem a suplementação (SC=133,24±3,4; SD=135,8±3,4; IC=131,8±3,92; ID=115,1±3,9; p(I)=0,004; p(VD)=0,06; p(IxVD)=0,01) (Figura 1).

Estudo ecocardiográfico

Quanto às variáveis funcionais, os animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D apresentaram redução na fração de ejeção e na velocidade de encurtamento da parede posterior e aumento da E/E' média e A' septal, fração de variação da área do VE (Tabelas 1 e 2 e Figuras 2 a 6). O fator vitamina, de forma independente, levou a diminuição da porcentagem de encurtamento do miocárdio e S septal e ao aumento da porcentagem de encurtamento do miocárdio e da onda E mitral (Figura 7 e Tabela 1). Em contrapartida, o fator infarto, de forma independente, induziu o aumento da onda E mitral, E/A, tempo de relaxamento

isovolumétrico do VE (corrigido pela frequência cardíaca), Índice Tei e a uma diminuição de S lateral, E' lateral, S média e E' média (Tabela 3 e Figura 8).

Nos ratos infartados, a suplementação de vitamina D induziu aumento das áreas sistólica e diastólica, assim como nos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo. Esse aumento também foi observado na massa do VE e no índice de massa do VE (Tabela 3 e Figuras 9 a 14). A vitamina D interferiu de forma independente aumentando o diâmetro do átrio esquerdo (AE). Também de forma independente, o infarto levou a um aumento da espessura diastólica da parede posterior do VE, da espessura diastólica do septo interventricular e da relação entre átrio esquerdo e o diâmetro da aorta (Tabela 3).

Coração isolado

No nosso trabalho, não encontramos interação entre os fatores no estudo do coração isolado. O infarto, de forma independente, levou à redução da pressão sistólica, da primeira derivada e da derivada negativa (Tabela 4).

Estudo morfológico

Quanto à análise morfológica, não houve interação entre os fatores infarto e vitamina D. O infarto influenciou no aumento do peso do ventrículo esquerdo (Tabela 5).

Quanto ao tamanho do infarto, não houve diferença entre os grupos (IC=46,7±6,5; ID=45,8±6,3; p=0,593).

O infarto, de forma independente, aumentou a porcentagem de colágeno no miocárdio, assim como a suplementação de vitamina D. Porém, não houve interação entre os fatores (SC= 1,99±0,45; SD=2,56±0,43; IC=4,53±0,45; ID=6,47±0,45; p(I)<0,001; p(VD)=0,009; p(IxVD)=0,139), como observado na Figura 15.

O infarto aumentou a área do miócito, porém, sem interferência do fator vitamina D, não sendo encontrada diferença entre os grupos (SC=256,2±17,9;

SD=246,3±17,9; IC=387,2±17,9; ID=398,9±15,5; p(I)<0,001; p(VD)=0,958; p(IxVD)=0,541), como observado na Figura 16.

Dosagem de cálcio e fósforo, IL-10, ICAM-1 e TIMP

Na Tabela 6 vemos os resultados encontrados. Não houve diferença nos valores de cálcio, fósforo, IL-10, TIMP e ICAM-1 entre os grupos estudados.

Atividade das metaloproteinases

Encontramos nas nossas amostras apenas uma banda da metaloproteinase 9, em sua forma ativa (aproximadamente 92KDa), que não apresentou diferença entre os grupos. As metaloproteinases 2 foram encontradas em 3 bandas, uma com a forma inativa, de aproximadamente 72 KDa (pró MMP-2), que apresentou diferença apenas para o fator infarto, onde os animais infartados tiveram maior atividade dessa enzima. As outras duas formas encontradas da metaloproteinase 2 foi a banda ativa, de aproximadamente 64 KDa, e a outra a banda intermediária de degradação entre as duas formas, que não apresentaram diferença entre os fatores. Também não houve diferença entre os grupos quando feita a relação entre a forma ativa e inativa da MMP-2⁶² (Tabela 7).

Cadeias pesadas de miosina

Não houve diferença na composição das cadeias pesadas de miosina (Tabela 8).

Metabolismo energético e estresse oxidativo

Os valores das enzimas referentes ao metabolismo energético encontram-se na Tabela 9. Houve interação entre os fatores infarto e vitamina D para a enzima fosfofrutoquinase, onde os animais infartados que receberam a suplementação apresentaram redução da atividade dessa enzima (Figura 17). As enzimas lactato desidrogenase, β -hidroxiaciltransferase, complexos I e II apresentaram interferência do fator infarto, aumentando a primeira e reduzindo as demais. As enzimas citrato sintase e ATP sintase apresentaram interação entre os fatores, com redução para os animais sham que receberam a suplementação (Figuras 18 e 19). Não houve diferença no complexo piruvato desidrogenase.

Os dados referentes ao estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 10. A atividade das enzimas hidróperóxido de lipídio e catalase apresentaram diferença apenas para o fator infarto, com aumento da sua atividade na primeira e redução na segunda. O infarto aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase e a vitamina D diminuiu sua atividade porém sem interação entre os fatores (Figura 20). Não houve diferença na atividade da glutathione peroxidase. Quanto ao Nrf2, houve uma diminuição da sua expressão nos animais infartados (Figura 21 e Tabela 11).

Apoptose

A apoptose foi determinada pela expressão das proteínas caspase 3 (Peso molecular de 35KDa) e bcl-2 (Tabela 11).

Houve interação entre os fatores infarto e vitamina, com aumento da expressão da caspase 3 no grupo de animais infartados que recebeu a suplementação de vitamina D (Figura 22).

Quanto à bcl2, houve interação entre os fatores, sendo que a suplementação de vitamina D nos animais infartados diminuiu a expressão da proteína (Figura 23).

Tabela 1. Variáveis funcionais.

| Variável | sc (n=25) | sd (n=24) | ic (n=18) | id (n=20) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|-------|---------|
| PC (g) | 466,1 ± 8,8 | 451,1 ± 8,8 | 459,1 ± 8,8 | 445,8 ± 8,5 | 0,483 | 0,109 | 0,928 |
| FC (bpm) | 268,2±7,67 | 272,9±7,83 | 284,8±11,5 | 258,7±9 | 0,896 | 0,247 | 0,098 |
| % Enc. Endo | 54,7±2,1 | 54,1±2,1 | 42,2±3,2 | 32,5±2,53 | <0,001 | 0,048 | 0,08 |
| VEPP (mm/s) | 36,3±1,18 | 37,1±1,2 | 33,8±1,78 | 28,9±1,39 | <0,001 | 0,159 | 0,049 |
| FE | 0,9±0,02 | 0,89±0,02 | 0,76±0,03 | 0,64±0,02 | <0,001 | 0,028 | 0,048 |
| FAV | 74,4±2,1 | 73,3±2,21 | 52±3,2 | 39,6±2,55 | <0,001 | 0,011 | 0,031 |
| E mitral | 78,96±2,75 | 79,7±2,81 | 81,7±4,15 | 93,6±3,24 | 0,014 | 0,057 | 0,097 |
| A mitral | 51,28±3,28 | 56,79±3,34 | 51,3±4,94 | 44,7±3,86 | 0,13 | 0,886 | 0,125 |
| E/A | 1,59±0,23 | 1,48±0,24 | 2,17±0,35 | 2,63±0,28 | 0,003 | 0,546 | 0,311 |
| TDE (m/s) | 43,8±1,69 | 44±1,91 | 41,2±2,56 | 43,6±1,91 | 0,449 | 0,528 | 0,558 |
| TRIV (m/s) | 26,2±0,83 | 27,3±0,85 | 30,1±1,26 | 29,9±0,98 | 0,002 | 0,669 | 0,507 |
| R-R (s) | 0,228±0,005 | 0,226±0,006 | 0,213±0,009 | 0,234±0,007 | 0,629 | 0,182 | 0,129 |
| TRIV/R-R | 55,1±1,46 | 57,3±1,49 | 65,6±2,2 | 61,8±1,72 | <0,001 | 0,654 | 0,085 |
| Índice de Tei | 0,49±0,02 | 0,53±0,02 | 0,66±0,03 | 0,73±0,03 | <0,001 | 0,093 | 0,543 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; % Enc. Endo.: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; FAV: fração de variação da área; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; R-R: distância de um batimento a outro (para cálculo do TRIV/R-R); TRIV/R-R: TRIV normalizado para a frequência cardíaca (TRIV dividido pela raiz quadrada do R-R); Índice de Tei ou Índice de Performance Miocárdica (avalia conjuntamente a função sistólica e diastólica, calculado considerando o tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + tempo de relaxamento isovolumétrico).

Tabela 2. Variáveis funcionais (Doppler tissular).

| Variável | SC (n=25) | SD (n=24) | IC (n=18) | ID (n=20) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-------|---------|
| S lateral (cm/s) | 3,52±0,1 | 3,62±0,1 | 3,35±0,16 | 3,19±0,12 | 0,021 | 0,843 | 0,31 |
| E' lateral (cm/s) | 3,94±0,14 | 4,52±0,15 | 3,75±0,23 | 3,75±0,17 | 0,01 | 0,114 | 0,114 |
| A' lateral (cm/s) | 3,72±0,22 | 4,31±0,23 | 3,7±0,35 | 3,38±0,26 | 0,091 | 0,611 | 0,105 |
| S septal (cm/s) | 3,6±0,1 | 3,43±0,1 | 3,55±0,16 | 2,97±0,12 | 0,042 | 0,004 | 0,1 |
| E' septal (cm/s) | 3,96±0,18 | 4,37±0,18 | 3,95±0,28 | 3,63±0,21 | 0,095 | 0,814 | 0,104 |
| A' septal (cm/s) | 3,58±0,24 | 4,08±0,24 | 3,95±0,37 | 3,16±0,28 | 0,352 | 0,633 | 0,031 |
| S média (cm/s) | 3,56±0,07 | 3,51±0,07 | 3,06±0,16 | 3,12±0,08 | <0,001 | 0,964 | 0,598 |
| E' média (cm/s) | 4,08±0,14 | 4,52±0,14 | 3,62±0,32 | 3,65±0,16 | 0,002 | 0,265 | 0,333 |
| A' media (cm/s) | 3,62±0,23 | 4,18±0,23 | 3,43±0,51 | 3,4±0,26 | 0,155 | 0,434 | 0,381 |
| E/E' média | 19,2±0,87 | 17,8±0,87 | 20,4±1,95 | 25,3±0,97 | 0,001 | 0,18 | 0,016 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D; S lateral: onda sistólica do anel mitral lateral; E' lateral: onda diastólica inicial do anel mitral lateral; A' lateral: onda diastólica tardia do anel mitral lateral; S septal: Onda sistólica do anel mitral lateral; E' septal: onda diastólica inicial do anel mitral septal; A' septal: onda diastólica tardia do anel mitral septal; S média; E' média; A' media; E/E' média.

Tabela 3. Variáveis morfológicas.

| Variável | SC (n=25) | SD (n=24) | IC (n=18) | ID (n=20) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|--------|---------|
| DDVE (mm) | 8,11±0,16 | 7,96±0,17 | 8,94±0,25 | 10±0,19 | <0,001 | 0,014 | 0,002 |
| DDVE/PC | 17,5±0,42 | 17,7±0,42 | 19,7±0,63 | 23,6±0,49 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| DSVE (mm) | 3,67±0,28 | 3,66±0,29 | 5,29±0,42 | 6,97±0,33 | <0,001 | 0,016 | 0,014 |
| EDPP (mm) | 1,37±0,03 | 1,39±0,03 | 1,66±0,05 | 1,64±0,04 | <0,001 | 0,966 | 0,74 |
| EDSIV (mm) | 1,38±0,02 | 1,4±0,03 | 1,54±0,04 | 1,52±0,03 | <0,001 | 0,96 | 0,58 |
| AO (mm) | 3,91±0,04 | 3,91±0,04 | 3,85±0,07 | 3,83±0,05 | 0,242 | 0,892 | 0,885 |
| AE (mm) | 5,54±0,19 | 5,69±0,19 | 6,44±0,29 | 7,22±0,22 | <0,001 | 0,048 | 0,179 |
| AE/AO | 1,41±0,06 | 1,45±0,06 | 1,67±0,09 | 1,91±0,07 | <0,001 | 0,066 | 0,184 |
| AE/PC | 11,9±0,4 | 12,68±0,4 | 14,2±0,68 | 16,8±0,53 | <0,001 | 0,003 | 0,088 |
| Massa VE (g) | 0,78±0,05 | 0,77±0,05 | 1,13±0,08 | 1,4±0,06 | <0,001 | 0,052 | 0,03 |
| Índice de massa | 1,69±0,1 | 1,71±0,11 | 2,51±0,16 | 3,22±0,12 | <0,001 | 0,006 | 0,009 |
| Área sistólica (mm²) | 12,3±2,4 | 12,3±2,4 | 31,5±3,67 | 53,4±2,87 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Área diastólica (mm²) | 47,5±2,5 | 45,9±2,5 | 62±3,82 | 84,9±2,99 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D; PC: Peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; EDSVI: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Área sistólica: Área sistólica do VE em eixo menor paraesternal.

Tabela 4. Estudo do coração isolado (valores máximos).

| Grupo | SC (n=6) | SD (n=6) | IC (n=6) | ID (n=6) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|--------------|----------------|
| Pressão sistólica (mmHg) | 150±7,5 | 157,5±7,5 | 93,3±9,71 | 89,3±8,4 | <0,001 | 0,083 | 0,505 |
| +dP/dt (mmHg/s) | 2625±233,7 | 2950±233,7 | 1250±301,7 | 1250±261,2 | <0,001 | 0,541 | 0,541 |
| -dP/dt (mmHg/s) | 1675±121 | 1775±121 | 875±156,3 | 937±135 | <0,001 | 0,555 | 0,891 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D; +dP/dt e -dP/dt: primeira derivada e derivada negativa, respectivamente.

Tabela 5. Variáveis morfométricas.

| Variável | SC (n=15) | SD(n=16) | IC(n=12) | ID(n=13) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|-----------------------------------|-----------|------------|-----------|-------------|--------|-------|---------|
| PVE (mg) | 899,2±23 | 904,7±21,6 | 1132±36,4 | 1152,7±33,7 | <0,001 | 0,542 | 0,929 |
| PVE/PC | 1,79±0,08 | 1,94±0,08 | 2,7±0,14 | 2,8±0,13 | <0,001 | 0,206 | 0,952 |
| Teor de água no VD (%) | 76,3±0,57 | 76,1±0,55 | 75,1±2,14 | 72,37±2,15 | 0,128 | 0,351 | 0,412 |
| Teor de água no átrio (%) | 81,4±1,33 | 81,2±1,29 | 76,5±5,33 | 75,1±3,77 | 0,115 | 0,814 | 0,863 |
| Teor de água no pulmão (%) | 74,4±0,92 | 75,1±0,95 | 73,1±1,73 | 74,7±1,9 | 0,525 | 0,433 | 0,765 |
| Teor de água no fígado (%) | 67,3±1,03 | 66,5±1,05 | 67,5±1,98 | 67,3±2,42 | 0,736 | 0,784 | 0,47 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; VD: ventrículo direito.

Tabela 6. Dosagem de cálcio, fósforo, IL-10, ICAM-1 e TIMP.

| | SC (n=8) | SD (n=8) | IC (n=8) | ID (n=8) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|--------------|----------------|
| Cálcio (mg/dL) | 8,53±0,21 | 8,95±0,22 | 8,9±0,26 | 8,6±0,23 | 0,849 | 0,669 | 0,172 |
| Fósforo (mg/dL) | 6,44±0,35 | 7,04±0,37 | 6,38±0,42 | 5,82±0,39 | 0,107 | 0,958 | 0,146 |
| IL-10 (pg/mg proteína) | 84,6±10,7 | 60±10,7 | 82,6±12,6 | 67,8±10,7 | 0,8 | 0,09 | 0,66 |
| ICAM-1 (pg/mg proteína) | 137,7±15 | 101,6±15 | 139,2±17,8 | 136±17,8 | 0,268 | 0,228 | 0,31 |
| TIMP (pg/mg proteína) | 4,12±0,16 | 3,7±0,16 | 4,18±0,19 | 4,14±0,16 | 0,2 | 0,23 | 0,329 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D.

Tabela 7. Atividade de metaloproteinases.

| | SC (n=7) | SD (n=7) | IC (n=7) | ID (n=7) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|---------|
| MMP-2 inativa | 0,42±0,22 | 0,14±0,22 | 0,88±0,24 | 0,81±0,24 | 0,002 | 0,435 | 0,645 |
| MMP-2 ativa intermediária | 0,22±0,16 | 0,02±0,16 | 0,45±0,17 | 0,35±0,15 | 0,074 | 0,296 | 0,64 |
| MMP-2 ativa | 1,21±0,37 | 1,67±0,31 | 0,9±0,34 | 1,04 | 0,18 | 0,395 | 0,647 |
| MMP-9 | 0,9±0,12 | 1,03±0,12 | 1,26±0,13 | 0,96±0,11 | 0,26 | 0,492 | 0,093 |
| MMP-2 (ativa/inativa) | 0,59±0,18 | 1±0,18 | 0,57±0,2 | 0,76±0,17 | 0,493 | 0,134 | 0,575 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D.

Tabela 8. Cadeias pesadas de miosina.

| Variável | SC (n=7) | SD (n=7) | IC (n=7) | ID (n=7) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|---------|
| Cadeia alfa (unidades arbitrárias) | 0,66±0,1 | 0,66±0,14 | 0,74±0,14 | 0,65±0,13 | 0,809 | 0,72 | 0,722 |
| Cadeia beta (unidades arbitrárias) | 0,826±0,1 | 1±0,14 | 0,76±0,14 | 0,62±0,13 | 0,116 | 0,874 | 0,224 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D.

Tabela 9. Metabolismo energético.

| Variáveis | SC(n=7) | SD(n=7) | IC(n=7) | ID(n=7) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|---|------------|------------|-------------|------------|--------|--------|---------|
| Fosfotruoquinase (nmol/g) | 94,4±10 | 104,6±12,2 | 129,8±10 | 92,8±10 | 0,291 | 0,213 | 0,041 |
| Lactato desidrogenase (nmol/g) | 140,8±12,8 | 165,6±15,7 | 214,6±12,8 | 184,6±12,8 | 0,003 | 0,851 | 0,06 |
| Complexo piruvato desidrogenase (nmol/g) | 290,9±16,7 | 274,5±19,2 | 243,3±15,75 | 278,5±15,7 | 0,206 | 0,574 | 0,137 |
| Citrato sintase (nmol/g) | 43,9±1,8 | 28,7±2,27 | 14,8±1,8 | 19,4±1,8 | <0,001 | 0,015 | <0,001 |
| β- hidroxiltransferase (nmol/mg) | 39,4±2,9 | 42,5±3,5 | 30,3±2,9 | 31,5±2,9 | 0,005 | 0,499 | 0,758 |
| Complexo I (NADH desidrogenase) (nmol/mg) | 6,15±0,47 | 5,7±0,58 | 4±0,47 | 4,54±0,47 | 0,004 | 0,915 | 0,346 |
| Complexo II (succinato óxido redutase) (nmol/mg) | 5,8±0,25 | 4,97±0,31 | 3,24±0,25 | 3,29±0,25 | <0,001 | 0,159 | 0,113 |
| ATP sintase (nmol/mg) | 72,6±2,45 | 41,3±3 | 40,6±2,45 | 45±2,45 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D.

Tabela 10. Estresse oxidativo.

| | SC(n=7) | SD(n=7) | IC(n=7) | ID(n=7) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|--|------------|------------|------------|------------|--------|-------|---------|
| Hidroperóxido de lipídio (nmol/g) | 164,6±16,2 | 168,7±19,8 | 278,4±16,2 | 284,3±16,2 | <0,001 | 0,778 | 0,958 |
| Catalase (µmol/g) | 75,1±6,76 | 82,5±8,2 | 57,8±6,76 | 68,9±6,76 | 0,045 | 0,213 | 0,798 |
| Superóxido dismutase (nmol/mg) | 9,55±0,88 | 8,15±1,08 | 15,4±0,88 | 11,2±0,88 | <0,001 | 0,008 | 0,149 |
| Glutaciona peroxidase (nmol/mg) | 34,4±2,45 | 35,7±3 | 30,3±2,45 | 32,9±2,45 | 0,2 | 0,466 | 0,806 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D.

Tabela 11. Proteínas por Western Blot.

| Variáveis | SC(n=7) | SD(n=7) | IC(n=7) | ID(n=7) | p(I) | p(VD) | p(IxVD) |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|---------|
| Caspase 3 (unidades arbitrárias) | 0,71±0,47 | 0,76±0,52 | 0,86±0,47 | 2,97±0,52 | 0,021 | 0,039 | 0,033 |
| Bcl-2 (unidades arbitrárias) | 1,08±0,26 | 1,46±0,26 | 1,46±0,22 | 0,7±0,24 | 0,457 | 0,447 | 0,032 |
| Nrf-2 (unidades arbitrárias) | 0,72±0,1 | 0,81±0,08 | 0,66±0,08 | 0,47±0,08 | 0,043 | 0,62 | 0,146 |

Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; I: fator infarto; VD: fator vitamina D; IxVD: interação entre os fatores infarto e vitamina D.

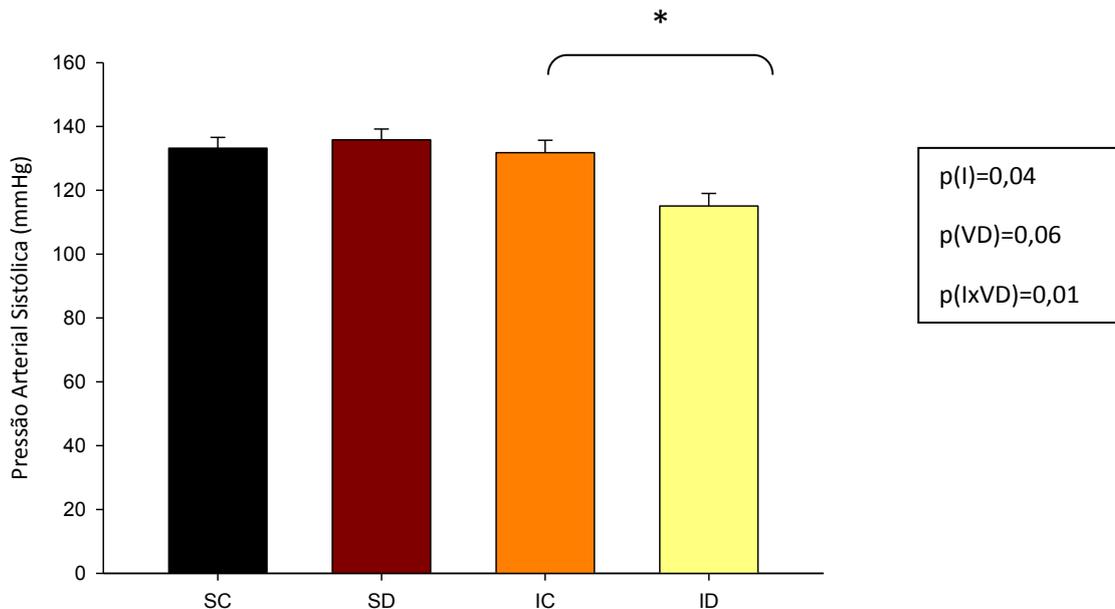


Figura 1. Pressão arterial sistólica. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: Animais sham que receberam ração padrão; SD: Animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

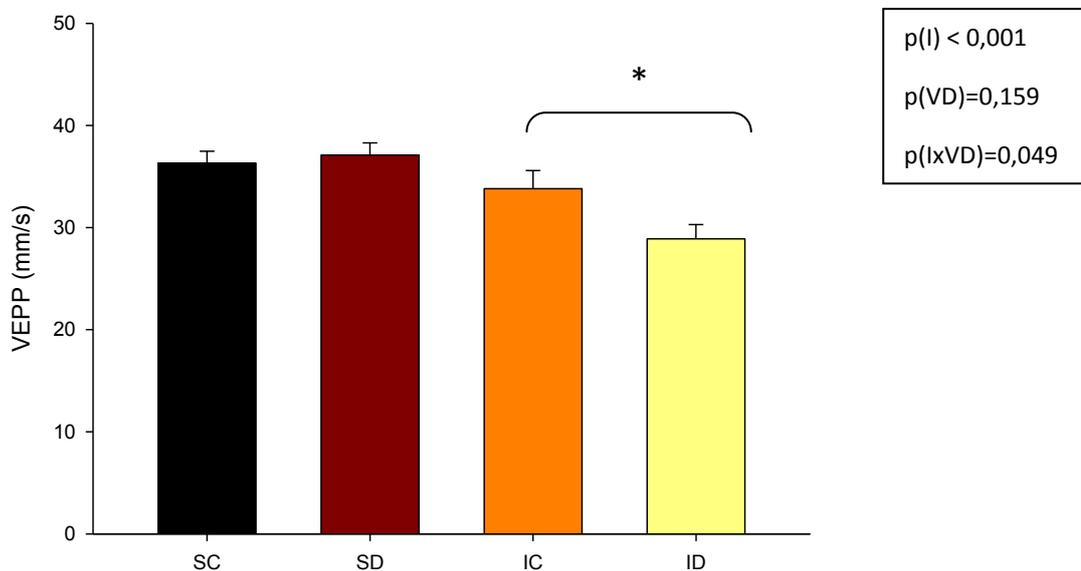


Figura 2. Velocidade de encurtamento da parede posterior. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: Animais sham que receberam ração padrão; SD: Animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

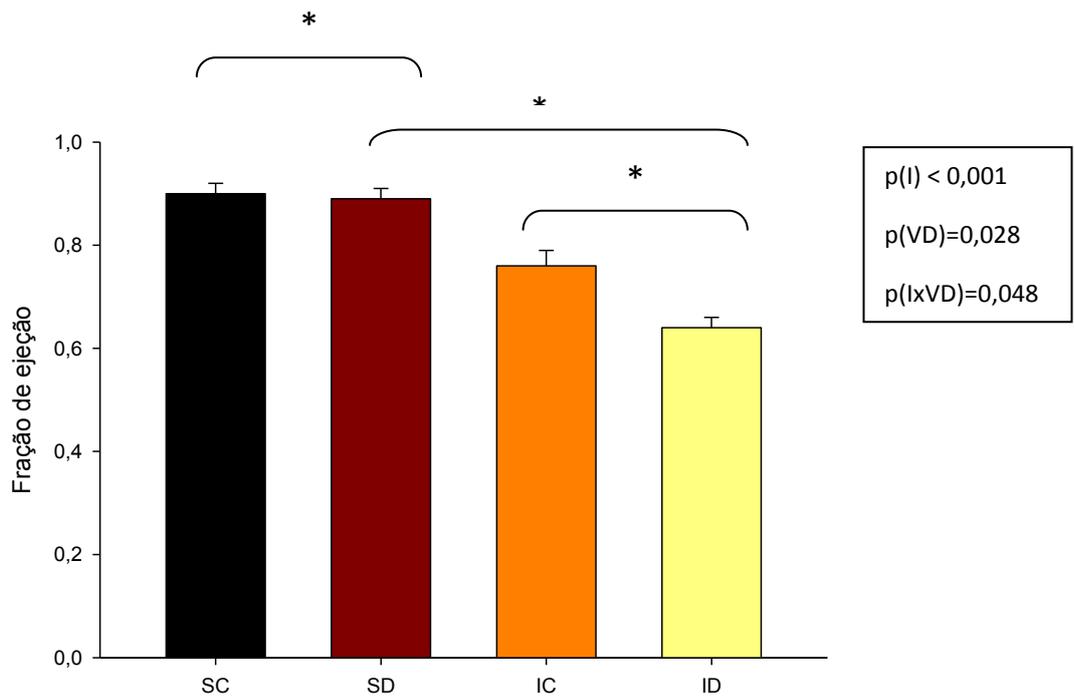


Figura 3. Fração de ejeção. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: Animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

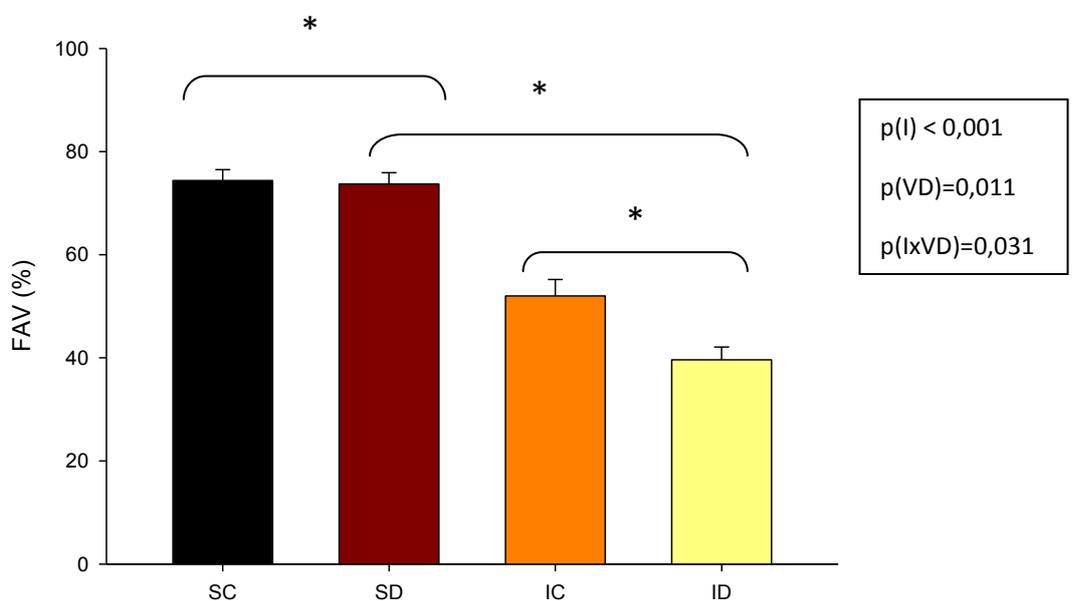


Figura 4. Fração de variação da área. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que recebem ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

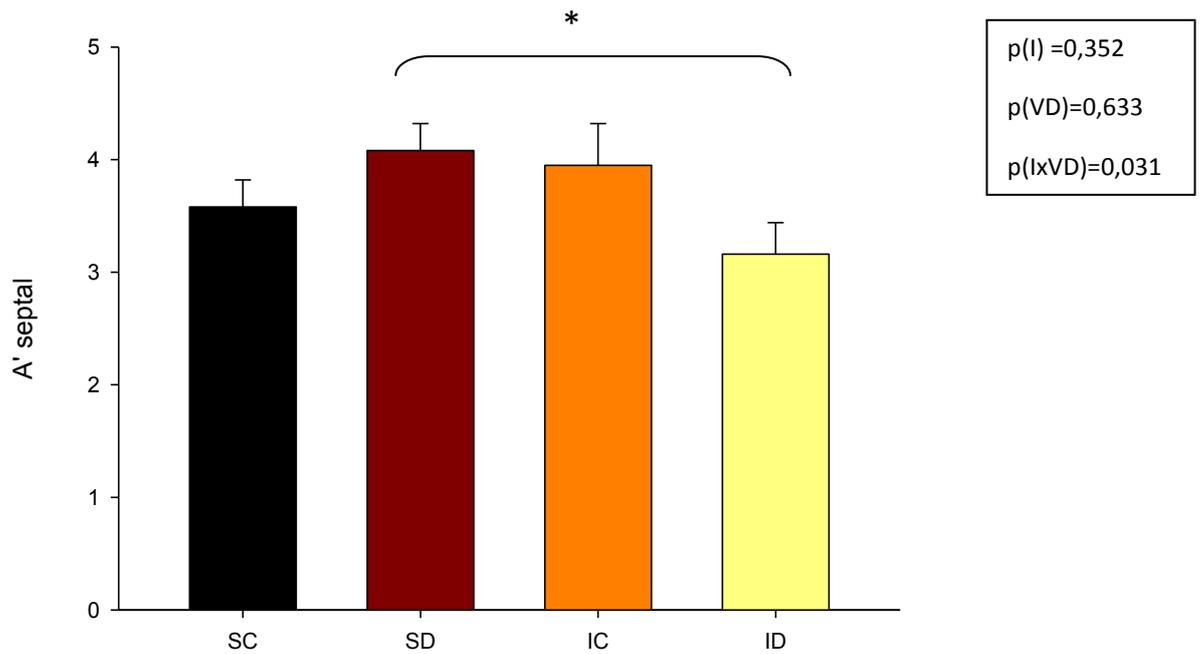


Figura 5. A' septal. Dados expressos em média ± erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

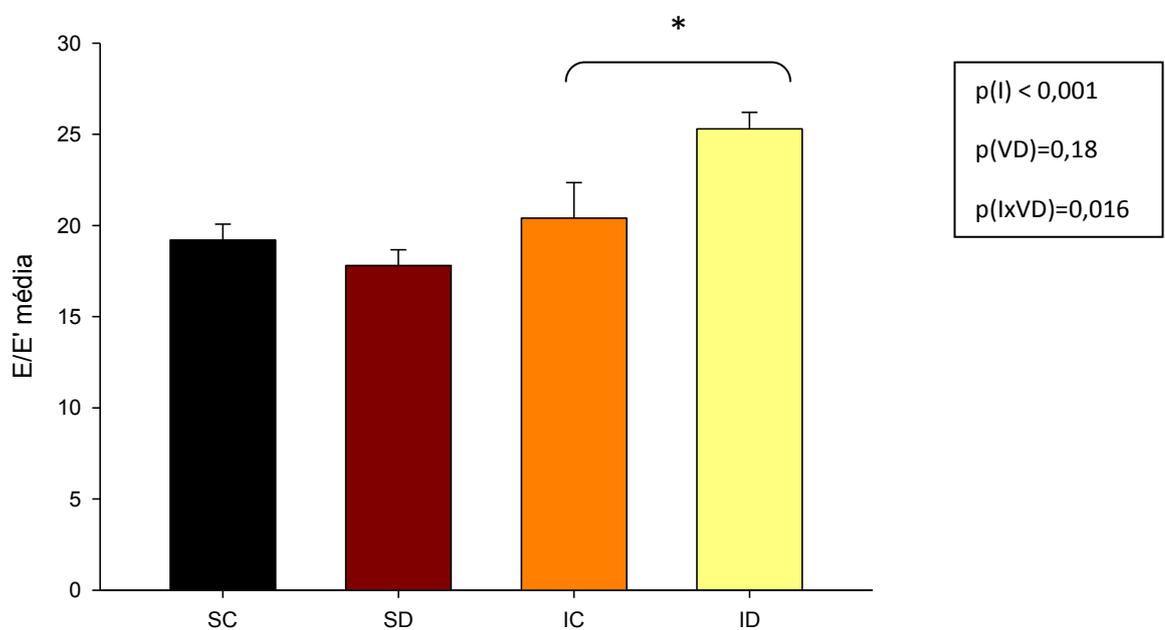


Figura 6. E/E' média. Dados expressos em média ± erro padrão. SC: Animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

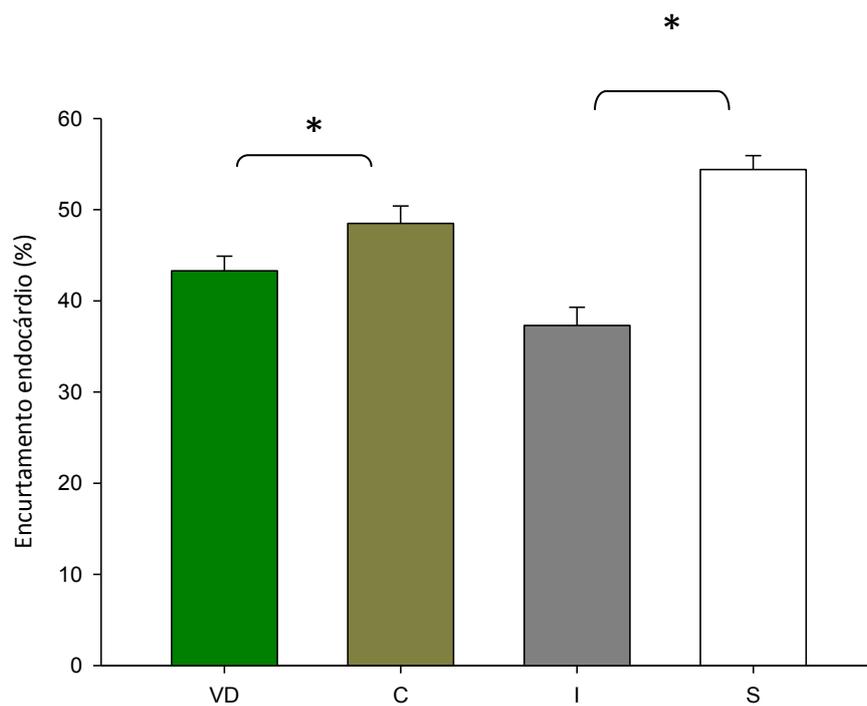


Figura 7. Variável com influência dos fatores infarto e vitamina de forma independente: Porcentagem de encurtamento endocárdico. Dados expressos em média \pm erro padrão. VD: todos os animais que receberam ração com suplementação de vitamina D; C: todos os animais que receberam ração padrão; I: todos os animais infartados; S: todos os animais sham. (*) Diferença estatisticamente significante.

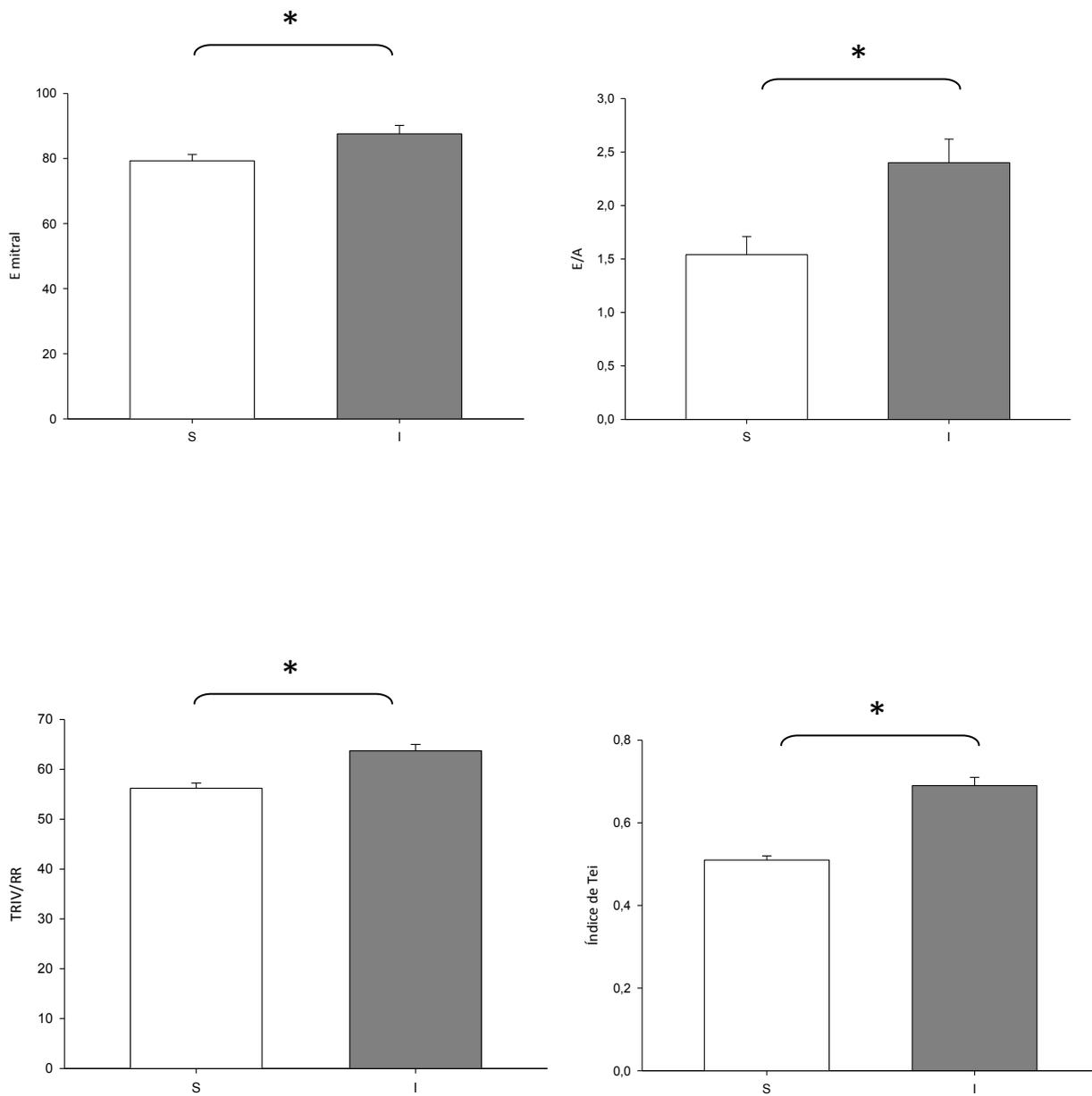


Figura 8. Variáveis com influência apenas do fator infarto de forma independente: Onda E mitral; E/A; TRIV/RR, Índice de Tei. Dados expressos em média \pm erro padrão. I: todos os animais infartados; S: todos os animais sham. (*) Diferença estatisticamente significativa.

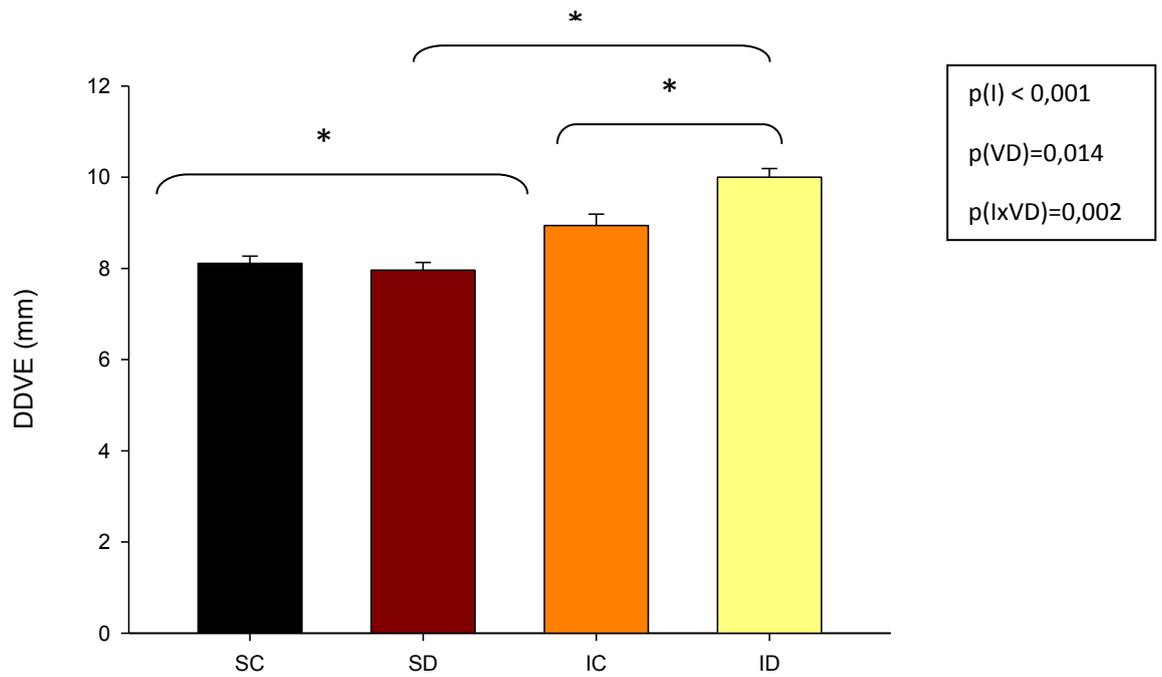


Figura 9. Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença significativa.

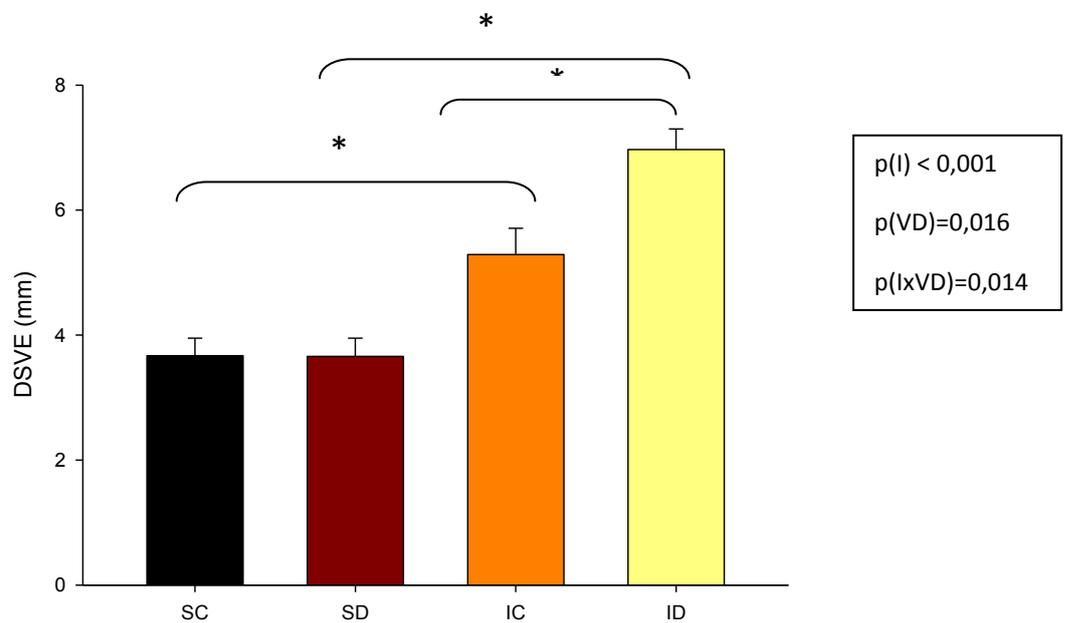


Figura 10. Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: Animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

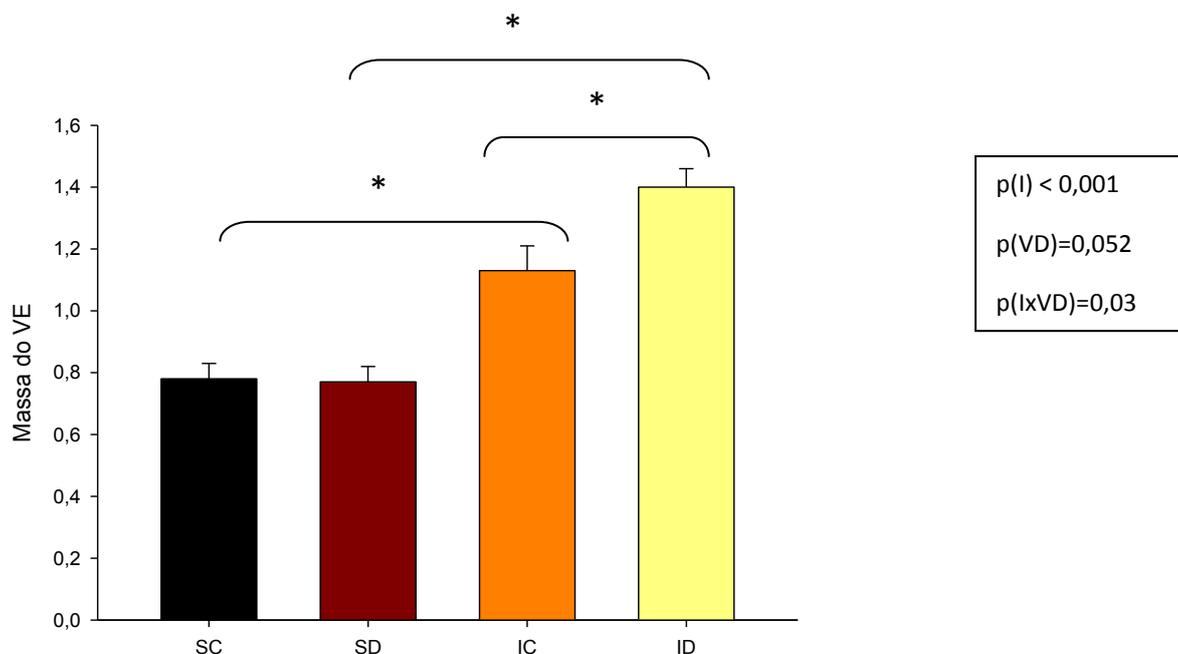


Figura 11. Massa do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: Animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significante.

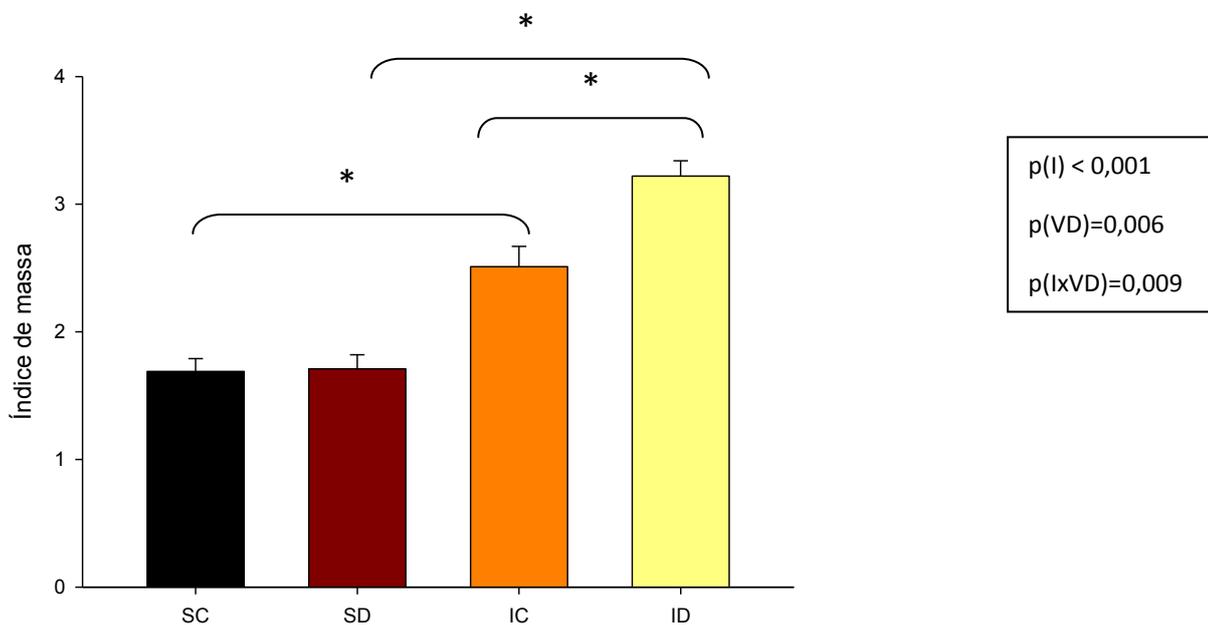


Figura 12. Índice de massa do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significante.

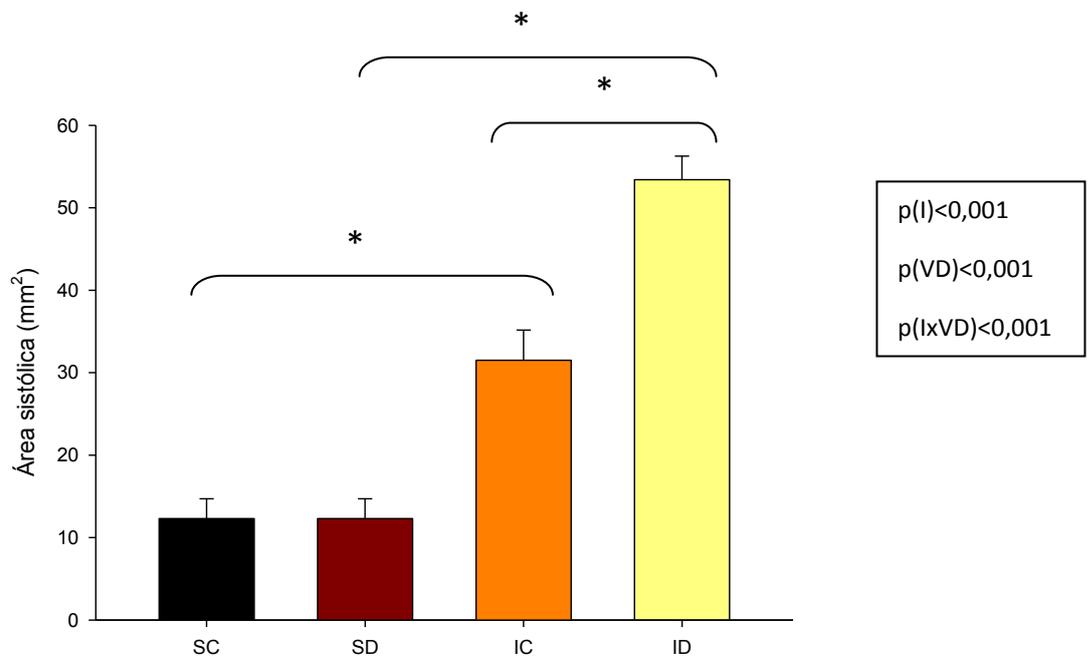


Figura13. Área sistólica. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão, SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que recebem ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

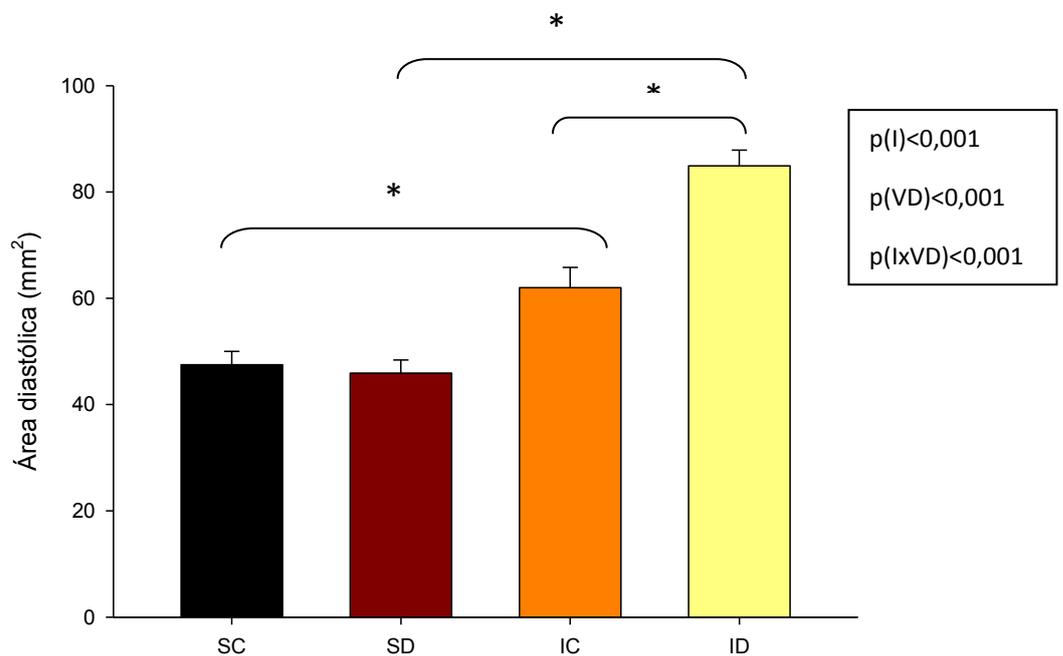


Figura 14. Área diastólica. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que recebem ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

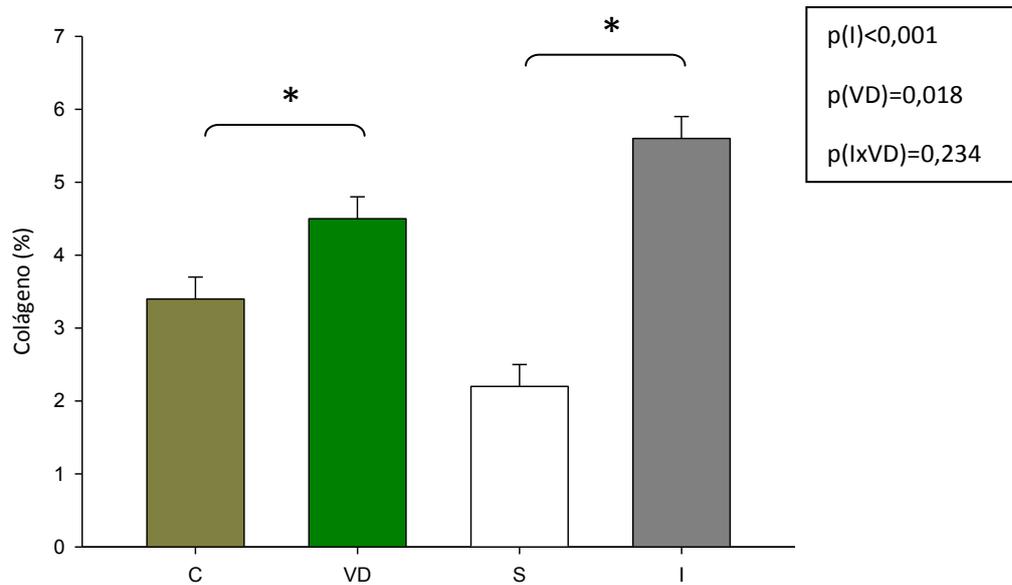


Figura 15. Porcentagem de colágeno: variável com influência dos fatores infarto e vitamina de forma independente. Dados expressos em média \pm erro padrão. VD: todos os animais que receberam ração com suplementação de vitamina D; C: todos os animais que receberam ração padrão; I: todos os animais infartados; S: todos os animais sham. (*) Diferença estatisticamente significativa.

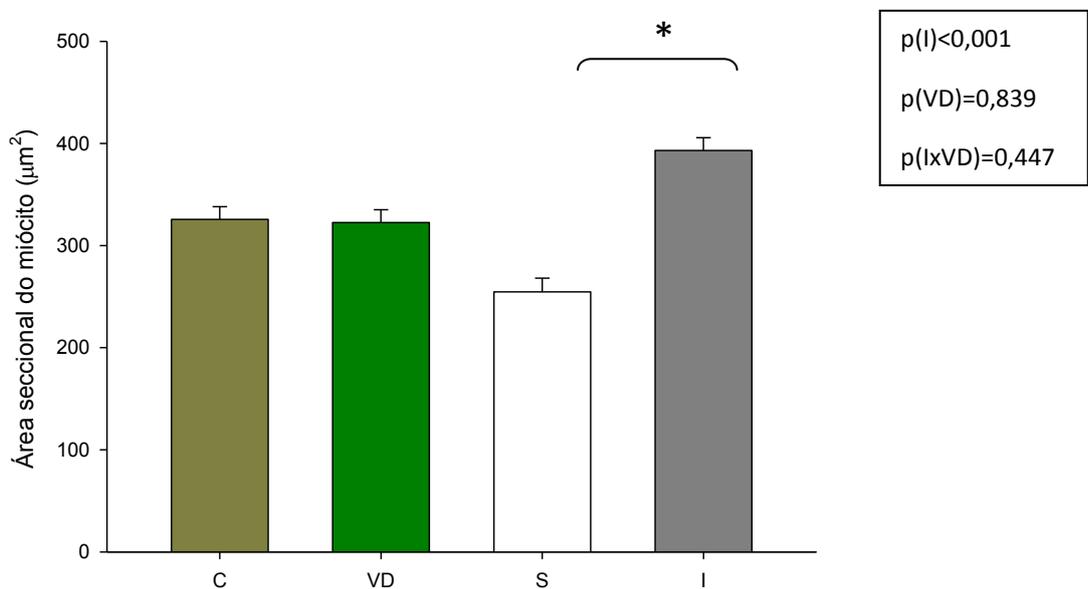


Figura 16. Área seccional do miócito: variável com influência dos fatores infarto e vitamina de forma independente. Dados expressos em média \pm erro padrão. VD: todos os animais que receberam ração com suplementação de vitamina D; C: todos os animais que receberam ração padrão; I: todos os animais infartados; S: todos os animais sham. (*) Diferença estatisticamente significativa.

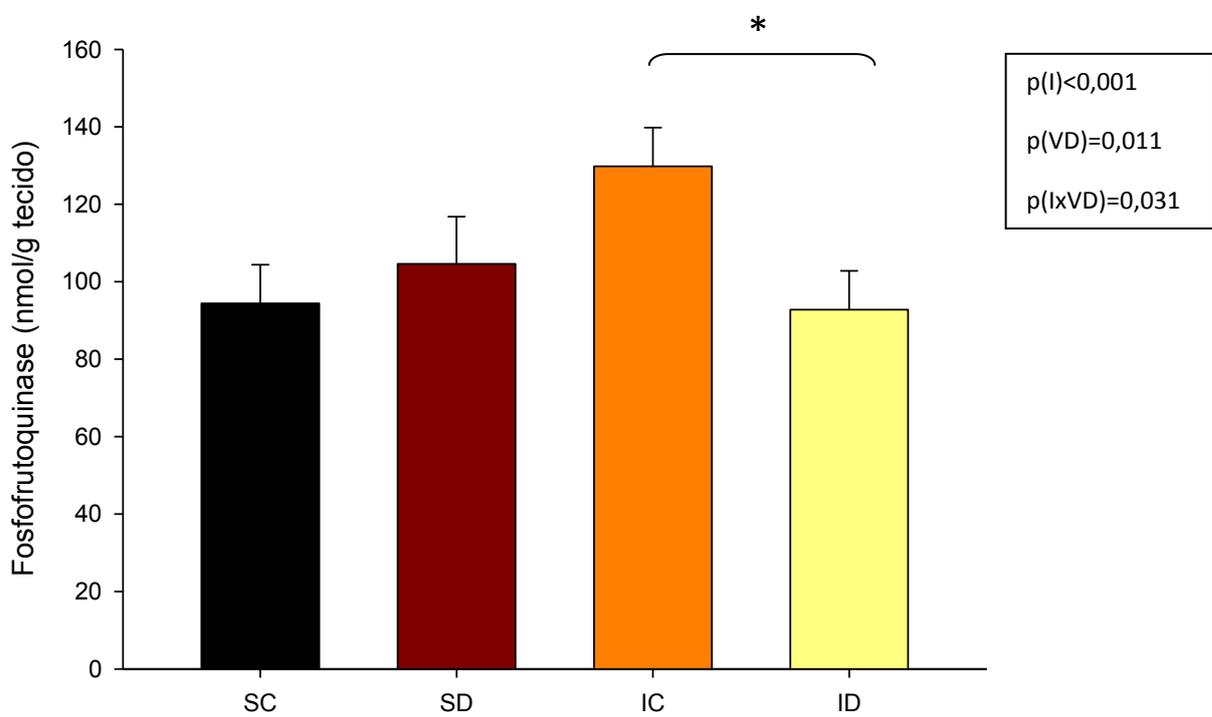


Figura 17. Fosfofrutoquinase. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significante.

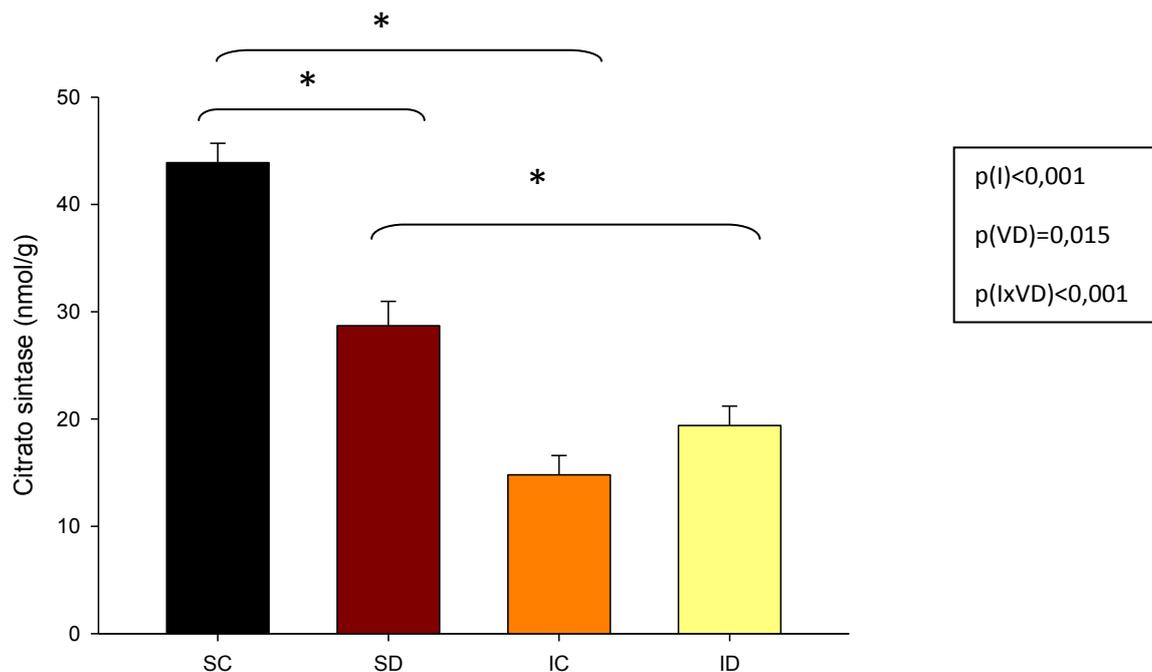


Figura 18. Citrato sintase. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão, SD: Animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

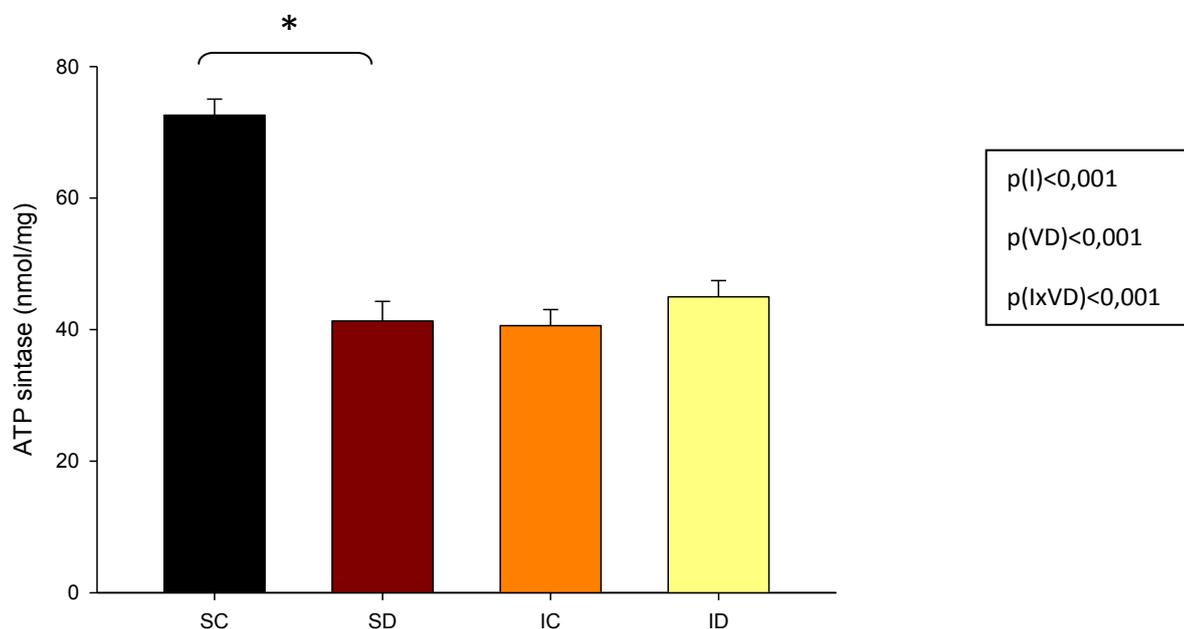


Figura 19. ATP sintase. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão, SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

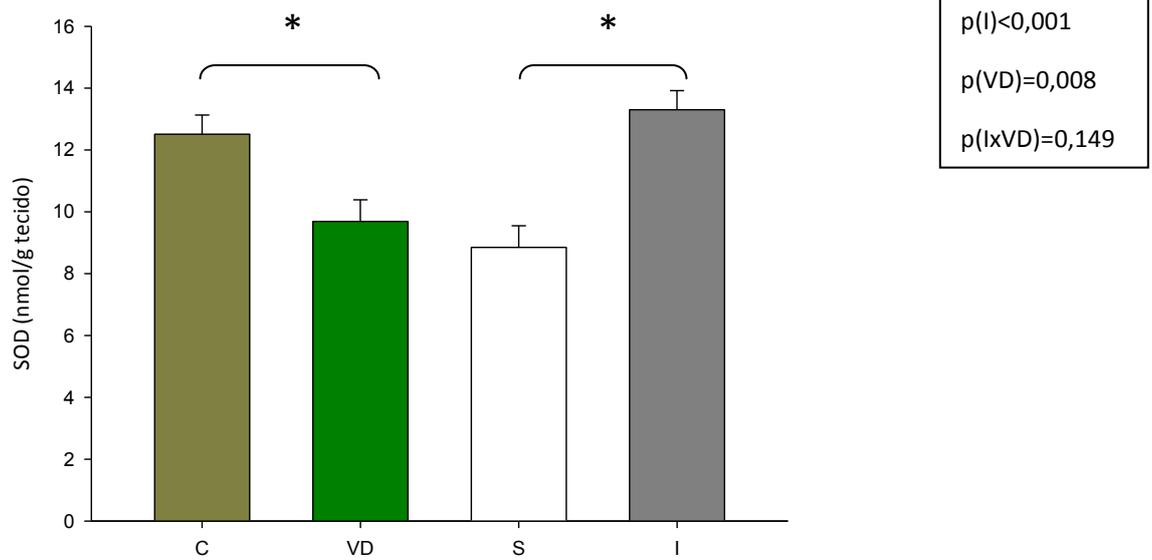


Figura 20. Superóxido dismutase: variável com influência dos fatores infarto e vitamina de forma independente. Dados expressos em média \pm erro padrão. VD: todos os animais que receberam ração com suplementação de vitamina D; C: todos os animais que receberam ração padrão; I: todos os animais infartados; S: todos os animais sham. (*) Diferença estatisticamente significativa.

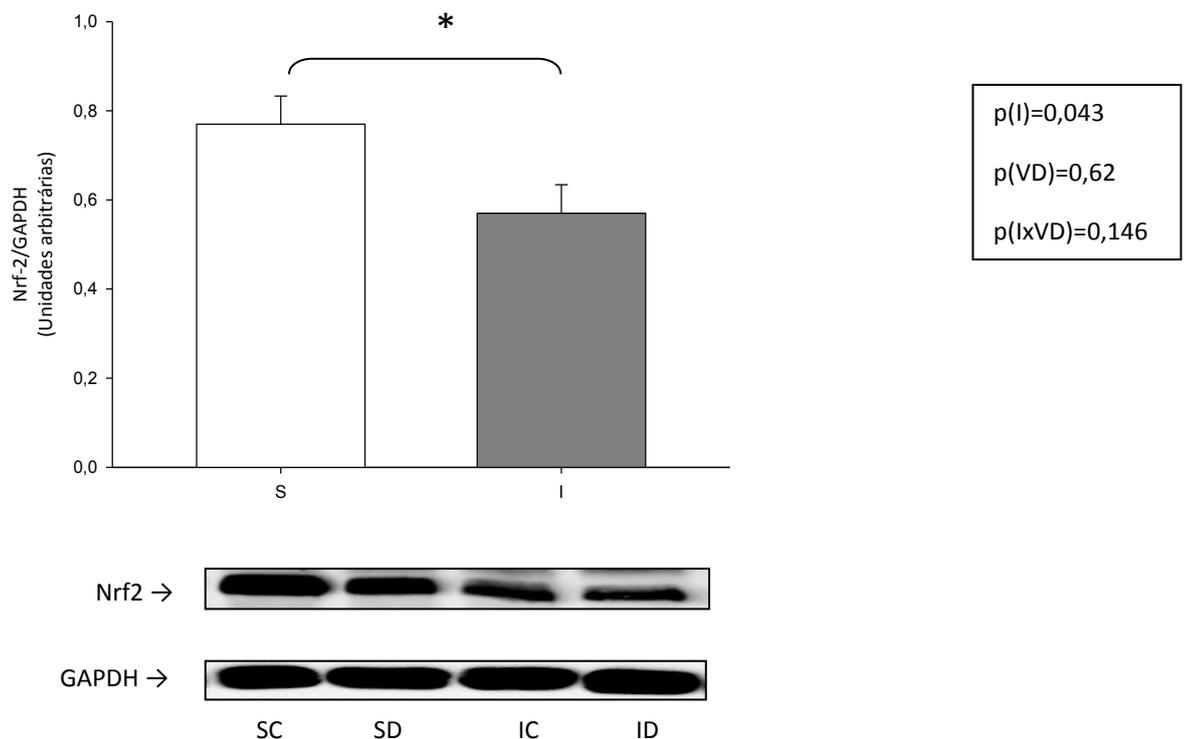


Figura 21. Expressão proteica do Nrf-2 por Western Blot. Dados expressos em média \pm erro padrão. I: todos os animais infartados; S: todos os animais sham. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

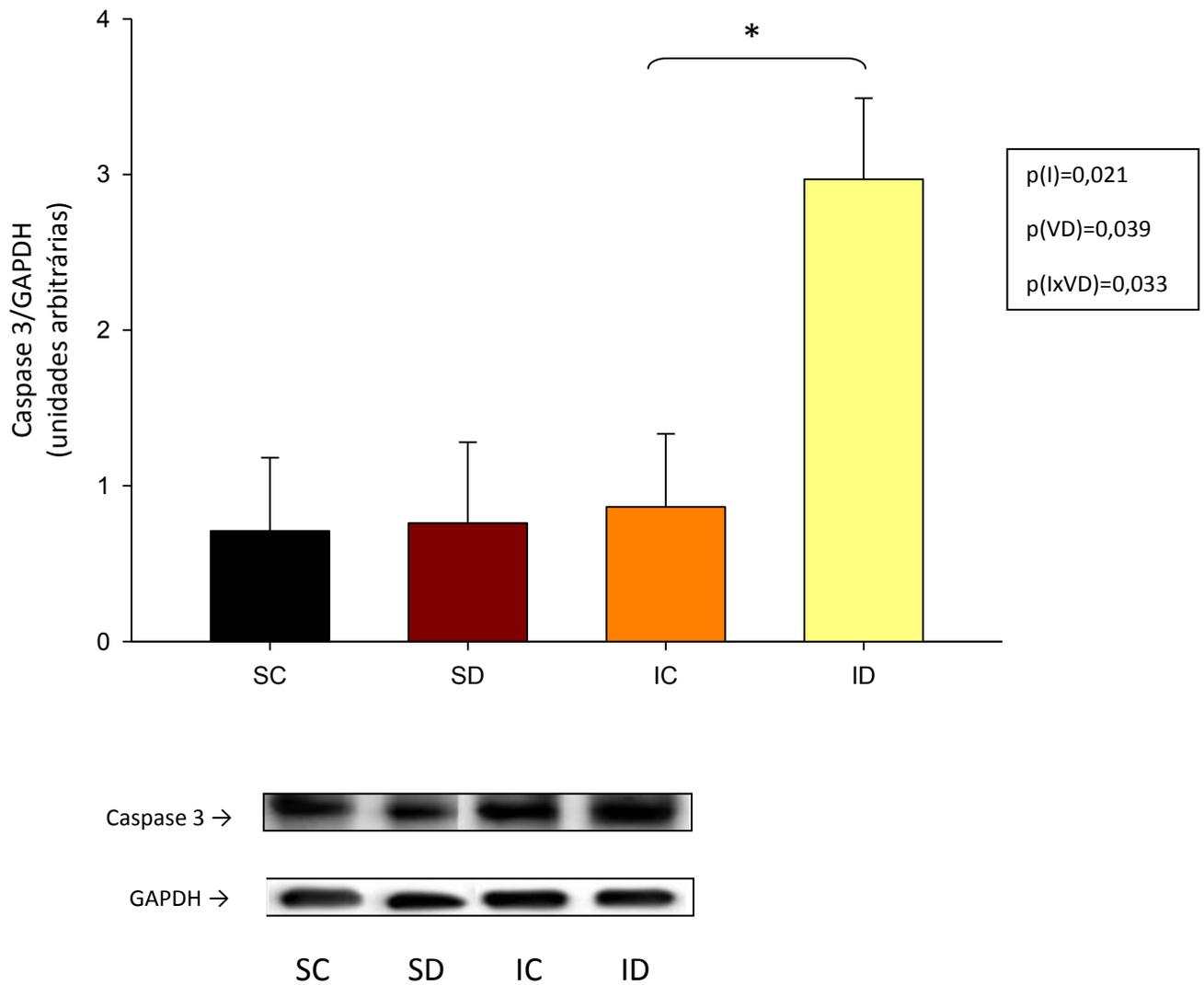


Figura 22. Expressão proteica da Caspase 3 por Western Blot. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D; IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significante.

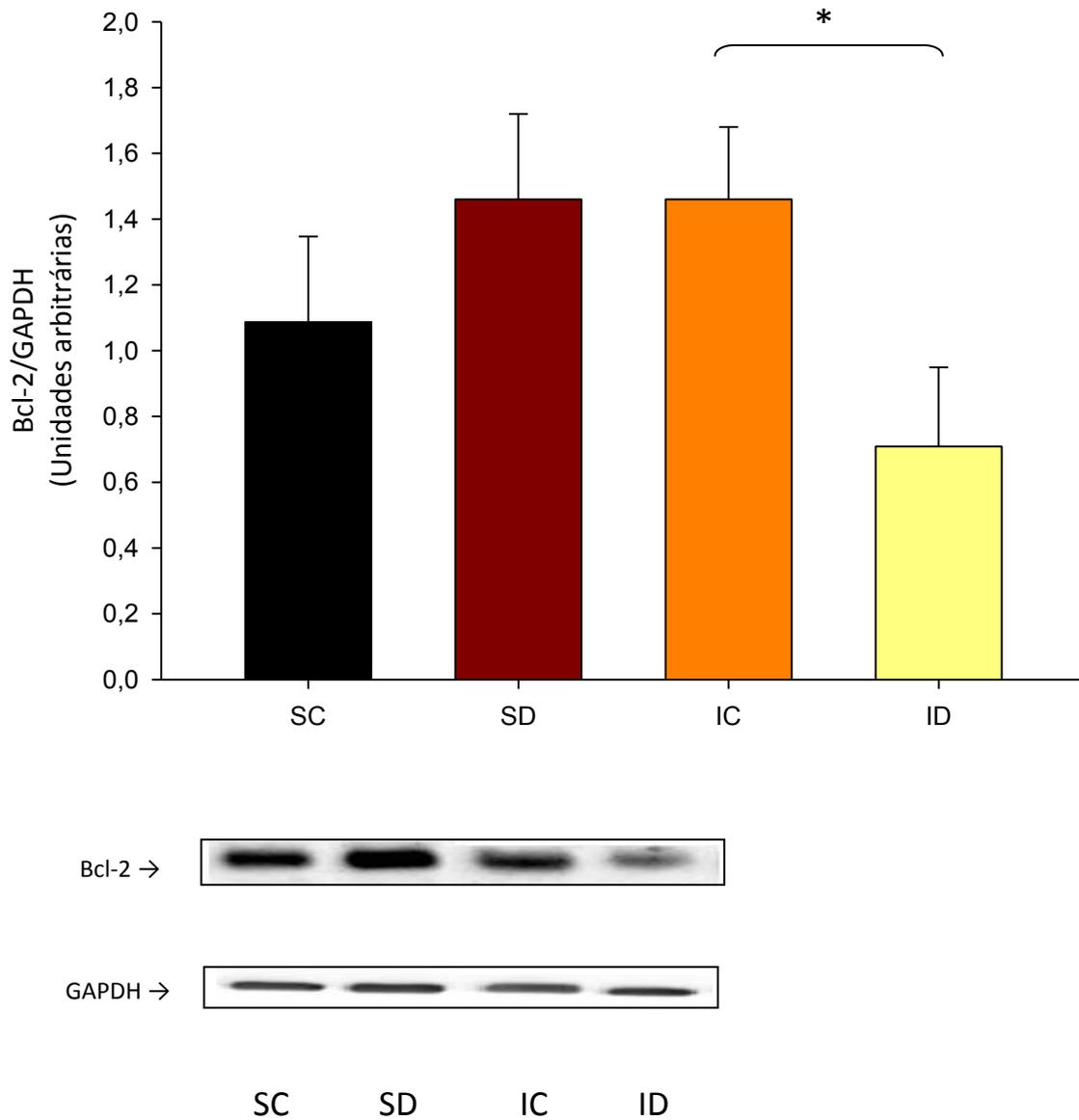


Figura 23. Expressão proteica da Bcl-2 por Western Blot. Dados expressos em média \pm erro padrão. SC: animais sham que receberam ração padrão; SD: animais sham que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D, IC: animais infartados que receberam ração padrão; ID: animais infartados que receberam ração padrão e suplementação de vitamina D. (*) Diferença estatisticamente significativa.

7. Discussão

7 Discussão

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D na remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio. A partir dos dados apresentados, pode-se sugerir que o processo de remodelação foi intensificado com a suplementação de vitamina D.

Após injúria cardíaca, o coração pode sofrer diversas alterações. Posteriormente ao infarto do miocárdio, podem ocorrer alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a área infartada quanto a não infartada. Nos últimos anos, esse conjunto de alterações vem sendo estudado com o nome de remodelação cardíaca. Didaticamente, esse processo pode ser definido como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestarão clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração^{4, 7, 63}.

Inicialmente, a remodelação tem o objetivo de manter a função do coração. No entanto, na fase crônica, pode ocorrer a deterioração progressiva dessa capacidade funcional⁴. O melhor conhecimento dos mecanismos responsáveis pela disfunção ventricular após o infarto do miocárdio é relevante, pois permite a elaboração de estratégias que modulem o processo de remodelação. Dentre as novas estratégias terapêuticas com potencial para interferir no processo de remodelação cardíaca secundária a diversos estímulos, encontra-se a vitamina D.

Em relação aos efeitos desta vitamina no sistema cardiovascular, estudos mostraram a associação entre a vitamina D e insuficiência cardíaca. Nesse sentido, pacientes com insuficiência cardíaca apresentaram menores valores de vitamina D¹⁹. Na tentativa de explicar essa associação, a identificação de receptores para a vitamina D no coração de ratos e de humanos sugere que a vitamina D pode desempenhar papel regulador importante na fisiologia do coração^{64, 65}.

Atualmente, aceita-se que a vitamina D possa interferir no sistema cardiovascular por meio de diferentes mecanismos, dentre os quais se destacam a apoptose, metabolismo energético, composição da matriz extracelular, modulação da

atividade inflamatória⁶⁶, interferência com a pressão arterial e regulação do processo de hipertrofia do miócito⁶⁷. Apesar dessa fundamentação, os dados sobre vitamina D e coração ainda são escassos. Portanto, em nosso estudo, analisamos os efeitos da suplementação de vitamina D em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas após o infarto experimental.

Considerando variáveis morfológicas, o infarto resultou conforme esperado, em aumento dos diâmetros diastólicos e sistólicos do VE, acompanhado por aumento da espessura da parede ventricular, da massa e do índice de massa do VE. Esses achados são compatíveis com o processo de hipertrofia observado na fase crônica do infarto. O resultado encontrado na análise da área seccional dos miócitos está em concordância com essa suposição, pois foi observado aumento da área dos miócitos nos animais infartados em relação ao grupo sham. Cabe ressaltar que apesar da remodelação ser evento extremamente complexo, após o infarto, esse processo é reconhecido clinicamente, por aumento da cavidade ventricular esquerda ou por evidências de hipertrofia cardíaca. Nesse sentido, podemos inferir que nosso protocolo foi eficiente para a indução de remodelação após o infarto experimental.

Para indução da remodelação após o infarto, Minicucci *et al* mostraram que para observar alterações morfológicas, funcionais e anormalidades clínicas, é necessário uma área infartada de pelo menos 36%, 38% e 40% respectivamente⁶⁸. Por isso, optamos por utilizar em nosso protocolo animais com área de infarto avaliado pela análise histológica maior que 35%.

Analisando os efeitos da suplementação de vitamina D nas alterações morfológicas induzidas pelo infarto experimental, nossos resultados mostram que os animais infartados que receberam a suplementação, apresentaram aumento adicional da cavidade ventricular esquerda, avaliado pelas áreas e pelos diâmetros. Portanto, o conjunto de nossos dados sugere que, contrariamente à nossa hipótese, a suplementação de vitamina D intensificou o processo de remodelação após o infarto experimental, nesse modelo.

Em relação a variáveis funcionais, conforme citado anteriormente, o processo de remodelação está associado à piora progressiva da função ventricular. Nossos

dados estão em concordância com esse conceito já que os animais infartados, conjuntamente com as alterações morfológicas, apresentaram comprometimento de variáveis funcionais compatíveis com piora da função sistólica e diastólica. De forma relevante, houve redução adicional na fração de ejeção, na fração de variação de área e na velocidade de encurtamento da parede posterior nos animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D. Houve ainda aumento da onda E mitral, da E/E' média, da A' septal e diminuição da onda S septal. Portanto, podemos concluir que a intensificação da remodelação nos animais suplementados com vitamina D foi associada com piora adicional das funções sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo.

Aspecto relevante a ser considerado na interpretação de nossos resultados morfofuncionais é que a maioria dos nossos dados está baseada nos achados do estudo ecocardiográfico. Nesse sentido, cabe ressaltar que Martinez *et al* utilizando metodologia semelhante à empregada em nosso estudo, mostraram a acurácia do uso do estudo ecocardiográfico para analisar alterações morfológicas e funcionais cardíacas no modelo de ratos submetidos ao infarto experimental. Utilizando ratos infartados após 6 meses de observação, os autores mostraram alterações do ventrículo esquerdo compatíveis com insuficiência cardíaca. Adicionalmente, variáveis morfológicas e funcionais cardíacas estiveram associadas com achados clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca, como congestão pulmonar, hipertrofia ventricular direita, derrame pleuropericárdico e trombo em átrio esquerdo. Finalmente, achados ecocardiográficos como menor velocidade de encurtamento da parede posterior, menor relação E/A, maior tempo de desaceleração da onda E, maior tempo de relaxamento isovolumétrico e menor fração de ejeção foram fatores de predição de insuficiência cardíaca, nesse modelo⁶⁹.

Os efeitos da vitamina D em variáveis morfofuncionais cardíacas foram analisados em poucos estudos prévios. Em modelo experimental de hipertensão arterial com consequente hipertrofia ventricular esquerda, os animais suplementados com 8UI de paricalcitol intraperitoneal, um análogo da vitamina D, apresentaram menor peso cardíaco, menor tamanho do cardiomiócito, menor espessura da parede anterior e posterior e menor expressão do RNAm do peptídeo natriurético atrial e

cerebral, o que indicaria menor hipertrofia. Além disso, eles apresentaram maior fração de encurtamento, sugerindo melhora na função cardíaca³⁹. Outro estudo utilizando miócitos ventriculares de ratos que desenvolveram hipertrofia por tratamento com endotelina, mostrou que a suplementação com 10^{-8} M de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminuiu a hipertrofia celular e a expressão dos RNAs dos peptídeos natriuréticos atrial e cerebral de forma dose dependente⁷⁰. Assim, em diferentes modelos experimentais de hipertrofia, a suplementação de vitamina D resultou em redução do processo hipertrófico.

Em face dos resultados coletados de estudos prévios, nosso achado de intensificação do processo de remodelação com a suplementação de vitamina D caracteriza fato inédito. Por essa razão, a etapa seguinte do nosso experimento foi investigar potenciais mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse fenômeno.

Um dos possíveis mecanismos moduladores do processo de remodelação é a distribuição das cadeias pesadas da miosina. Essa proteína é composta de um par de cadeias pesadas (α e β) e dois pares de cadeias leves com isoenzimas diferentes (V1, V2 e V3) em espécies diferentes. Essas isoenzimas possuem os mesmos pares de cadeias leves, variando apenas em relação à composição das cadeias pesadas ($\alpha\alpha$ nas V1, $\alpha\beta$ nas V2 e $\beta\beta$ nas V3), o que determina a capacidade contrátil do miócito^{71, 72}. As cadeias pesadas tornam-se importantes, pois são nelas que se encontram sítios ativos responsáveis pela capacidade ATPásica, sendo que a cadeia α possui capacidade maior. Em geral, em corações normais há predomínio de cadeia α , associada a contrações mais rápidas⁷³. Entretanto, em algumas situações patológicas, pode ter aumento das cadeias β , como mostrado em animais SHR com obesidade induzida por dieta hipercalórica⁷⁴. Em nosso estudo, não houve diferença entre os grupos em relação à distribuição das cadeias pesadas da miosina. Assim, podemos deduzir que essa variável não participou dos efeitos deletérios induzidos pela suplementação de vitamina D.

Outro mecanismo potencial para explicar os efeitos da suplementação de vitamina D está relacionado à regulação da pressão arterial. Assim, Wu *et al*⁷⁵ mostraram que a suplementação de vitamina D pode reduzir a pressão sistólica, mas

não a diastólica, em populações normotensas e hipertensas. Acredita-se que dois mecanismos poderiam explicar esse achado: 1) Mecanismo envolvendo a vitamina D no metabolismo do cálcio. Nesse sentido, a vitamina D, juntamente com o paratormônio, tem papel fundamental na manutenção de níveis normais de cálcio. Por sua vez, o cálcio contribui para o funcionamento normal da musculatura lisa, ao mesmo tempo em que pode agir como inibidor dos canais de cálcio. 2) Mecanismo ligado à modulação via sistema renina-angiotensina (SRA). O SRA possui papel fundamental na regulação da pressão sanguínea. A 1,25(OH)₂D tem sido apontada por desempenhar papel importante na regulação do SRA, atuando como supressor da renina, que é importante regulador da pressão^{17, 76}. Importante ressaltar que em nosso estudo encontramos redução da pressão arterial nos animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D. No entanto, esses achados não explicam nossos resultados, pois com a diminuição da pressão arterial, esperaríamos menor remodelação cardíaca. Assim, nossos dados sugerem que a modificação da pressão arterial não é determinante para os efeitos da suplementação de vitamina D após o infarto.

O terceiro mecanismo que poderia explicar nossos resultados tem relação com o papel da vitamina D como reguladora da composição da matriz extracelular.

O interstício cardíaco é composto por diversas substâncias e tecido conectivo formado principalmente por colágeno (I a IV) e pequenas quantidades de fibronectina, laminina e elastina⁷⁷, periostina, fibromodulina e ácido hialurônico⁷⁸. O colágeno maduro depositado na matriz extracelular e com cross-link é bastante resistente à degradação e estável⁷⁷. No entanto, as metaloproteinases são enzimas que degradam colágeno e são secretadas na matriz extracelular sob a forma de pró-enzimas, que é sua forma latente. Sua ativação depende da sua clivagem. Inicialmente, o colágeno é degradado pela MMP-1 (colagenase) em fragmentos menores, que então, é degradado pelas MMP-2 e MMP-9 (gelatinases) e MMP-3 (stromelysin).⁶ Aceita-se que após o infarto, as MMP-2 e a MMP-9 têm fundamental importância no processo de remodelação. Esse fato pode ser observado porque as MMP aumentam após o IM, ao mesmo tempo em que estudos mostraram que sua inibição/deleção reduz o processo de remodelação.

Considerando o papel da vitamina D na regulação da matriz, Rahman *et al* utilizaram ratos knockout para o receptor de vitamina D e mostraram que a 1,25(OH)2D possui importante papel na regulação da expressão das metaloproteases. Nos animais knockout foi encontrado aumento da deposição de colágeno e aumento da atividade MMP-2 e MMP-9, associado com redução da expressão das TIMPS⁶⁷. Em nosso protocolo, a deposição de colágeno visualizado em cortes histológicos foi maior no grupo infartado que recebeu a vitamina D em relação ao controle, com diferença estatisticamente significativa para o fator vitamina. Porém não encontramos diferenças nas formas ativas em nenhum dos grupos estudados. As TIMPS são inibidoras das metaloproteinases, importantes na manutenção do equilíbrio e degradação do colágeno. Nos nossos resultados não foram observadas alterações no TIMP.

O quarto mecanismo que poderia explicar nossos resultados tem relação com a atividade inflamatória. Nesse sentido, a IL-10 pode ser utilizada como um biomarcador no infarto, sendo importante citocina inflamatória na regulação da resposta imune e é utilizada na prática clínica em situações como miocardite⁷⁹ e na fase aguda do infarto⁸⁰. Por outro lado, a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) é essencial para o influxo de células inflamatórias. Alguns estudos mostraram que há aumento da expressão de ICAM-1 em alguns modelos⁸¹, mas não em outros⁸². Do mesmo modo, a vitamina D interfere no sistema imunológico⁸³ e regula a expressão de citocinas pró e antiinflamatórias⁸⁴. Em nosso estudo, no entanto, não encontramos alterações de ICAM-1, IL-10, sugerindo que, provavelmente, essas variáveis não interferiram com os efeitos da vitamina D.

O quinto mecanismo sensível à atuação da vitamina D é o metabolismo energético cardíaco. Primeiramente, devemos considerar que a regulação do metabolismo de carboidratos no tecido cardíaco é processo complexo, dependente de diversos fatores como níveis séricos de hormônios e substratos, fluxo coronário, estado inotrópico e estado nutricional do tecido⁸⁵.

Em corações normais, os ácidos graxos por meio da β oxidação correspondem de 60 a 90% do substrato energético do músculo cardíaco, sendo a menor parte da energia proveniente da metabolização da glicose pela via glicolítica. No entanto, em

situações de injúria, essa prevalência usualmente pode se inverter⁸⁶⁻⁸⁹, conjuntamente com outras alterações da homeostase energética, como discutiremos a seguir.

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 dinucleotídeo (NADH) que entram em cadeia de transporte de elétrons gerando gradiente eletroquímico ao longo da membrana mitocondrial, permitindo a síntese de ATP. Este processo é denominado fosforilação oxidativa⁹⁰.

Em processos isquêmicos, o substrato metabólico é dependente da severidade da isquemia. Uma eliminação completa do fluxo de maneira rápida resulta em depleção de fosfatos de alta energia e acúmulo de lactato, que posteriormente, leva à necrose e ao infarto. Em contrapartida, reduções menores de fluxo podem levar a aumento do consumo de oxigênio, depleção de glicogênio e produção de lactato, com redução da utilização de ácidos graxos⁸⁵. Em corações normais há consumo de lactato em pequenas quantidades, porém, em algumas condições como isquemia e hipóxia, pode haver dessensibilização dos receptores de glicose (GLUT)⁹¹ e então, o coração passa a formar muito lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidrato e a atividade da LDH^{92, 93}. Em concordância com esse conceito, nosso estudo mostrou aumento da atividade da LDH, mas sem sofrer a interferência da vitamina D.

Além da alteração no substrato energético, aceita-se que a citrato sintase, enzima inicial do ciclo do ácido cítrico, pode estar diminuída na insuficiência cardíaca por incapacidade da mitocôndria em transportar elétrons e realizar a fosforilação oxidativa⁹⁴. Em nosso estudo, os animais infartados tiveram diminuição da citrato sintase em relação ao controle, mas sem interferência da vitamina D. Adicionalmente, a fosfofrutoquinase (PFK-1) é uma enzima extremamente importante na modulação do metabolismo energético. Ela é a responsável por catalisar a reação de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato, a terceira reação da via glicolítica^{86, 88}. Em nossos resultados, encontramos redução da PFK-1 nos animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D, o que indica redução na utilização do substrato energético. Portanto, alterações no metabolismo energético podem explicar, pelo

menos em parte, os efeitos deletérios apresentados com a suplementação de vitamina D.

O sexto mecanismo que poderia explicar os efeitos deletérios da suplementação de vitamina D refere-se ao estresse oxidativo. As espécies reativas (ERs) podem ser formadas no coração ou em outros tecidos por diversos mecanismos, provenientes, por exemplo, do sistema xantina oxidase, NADPH oxidases, citocromo P450, entre outros¹². Essas ERs podem interagir tanto na membrana celular quanto no núcleo, afetando estruturas como DNA e RNA, o que pode induzir a danos celulares e alteração na transcrição de proteínas, podendo alterar a síntese de proteínas como colágeno, proliferação de fibroblastos, ativação de metaloproteinases, apoptose, hipertrofia de miócitos e expressão de genes do período fetal^{11, 12}. Existem evidências do papel do estresse oxidativo e das ERs no processo de remodelação cardíaca em diferentes modelos de agressão. Em modelos experimentais de infarto do miocárdio e de isquemia-reperfusão já foi demonstrado aumento de ERs com consequente estresse oxidativo^{95, 96}. Em estudo realizado por Bolli *et al*, foi mostrada a associação entre ERs e a disfunção contrátil do músculo cardíaco após períodos de isquemia⁹⁷.

Em situações normais, as células possuem sistemas antioxidantes para conter a acumulação de ERs. Fazem parte desses complexos enzimas como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (SOD), além de antioxidantes não enzimáticos como a vitamina E, vitamina C, beta caroteno e ácido úrico^{12, 98}. A SOD converte o radical superóxido à peróxido de hidrogênio, e este, posteriormente é convertido em água pela catalase e glutathione peroxidase. Adicionalmente, fator importante na sinalização do estresse oxidativo é o fator nuclear eritróide 2, o Nrf-2. O Nrf-2 é um fator presente no citoplasma celular que atua na resposta primária à citotoxicidade e ao estresse oxidativo. Frente a agentes agressores, o Nrf-2 se dissocia da proteína Keap 1 e vai ao núcleo onde estimula a produção de proteínas antioxidantes, uma vez que se liga na região promotora de genes-alvo e então codifica proteínas como glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, NAD(P)H quinona-redutase-1, hemeoxigenase-1, glutathione redutase e tioredoxina⁹⁹⁻¹⁰¹. Depois de ligar-se ao núcleo, ele volta ao citoplasma onde é degradada^{99, 102}. De forma aguda, a ativação do Nrf-2 é benéfica^{103, 104}, porém, estudo mostrou que sua ativação crônica pode levar a

cardiomiopatia¹⁰⁵. Alguns estudos já mostraram que a vitamina D pode controlar sistemas responsáveis pela homeostase no balanço oxidativo. A vitamina D pode atuar nos tecidos como agente oxidante e também como antioxidante. Uma relação foi observada por González-Reimers *et al* em ratos com miopatia alcoólica entre a baixa concentração de vitamina D e alterações de enzimas antioxidantes no tecido muscular¹⁰⁶. Nossos resultados mostraram diminuição do Nrf-2 nos animais infartados, porém, sem interação com o fator vitamina D. Por outro lado, o infarto aumentou a atividade da superóxido dismutase, hidróperóxido de lipídio e reduziu a catalase, mas não houve interação desse fator com a vitamina D. Portanto, o estresse oxidativo provavelmente não explica os efeitos deletérios induzidos pela suplementação de vitamina D.

Outro importante mecanismo envolvido no processo de remodelação cardíaca é a morte celular. A apoptose ou morte celular programada, tem sido apontada como possível responsável pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca em corações remodelados. A apoptose pode levar a célula à morte, independentemente do processo inflamatório, diferente da necrose^{107,108}. Importantes moduladores no processo apoptótico são as caspases¹⁰⁹.

As caspases são uma família de enzimas efetoras da apoptose. Elas são proteases de cisteína que seletivamente clivam as proteínas em locais da porção C-terminal destinados aos resíduos de aspartato. As caspases têm alvos bem definidos nas células, como proteínas da lâmina nuclear e citoesqueleto¹¹⁰. No miócito, elas podem afetar de formas diferentes proteínas citoplasmáticas e nucleares. Também atuam em proteínas contráteis, podendo levar a declínio na função sistólica do ventrículo esquerdo¹¹¹. Outro fator a ser observado é que apesar de a apoptose não levar diretamente à fibrose do tecido, os espaços deixados pelas células mortas podem ser preenchidos por fluido intersticial, seguido de fibrose¹¹².

A caspase 3 é expressa nas células como precursor inativo, em duas subunidades, e a forma madura é encontrada durante o processo de apoptose. Acredita-se que caspase 3 seja o efetor final da apoptose, já que ela é o participante comum das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose¹¹³. Outro fator importante é uma família de proteínas chamada Bcl-2, localizada nas mitocôndrias, membranas nucleares e do retículo endoplasmático. Possuem ação antiapoptótica por diversos mecanismos,

entre eles, a inibição da caspase¹¹⁴ e sua atividade é estimulada por fatores apoptóticos¹¹⁵.

A capacidade da vitamina D em induzir apoptose tem sido demonstrada em alguns tipos de cânceres como de mama, cólon e próstata. Os mecanismos ainda não foram esclarecidos, mas acredita-se que ela pode desencadear uma via ligada as mitocôndrias levando à morte celular¹¹⁶. Ela também pode reduzir a expressão de fatores antiapoptóticos, como a bcl-2 e/ou aumentar a de pró-apoptóticos, levando a célula à morte¹¹⁷. Estudo utilizando cultura de células tumorais uterinas, tratadas com vitamina D por 48 horas, mostrou que a expressão da Bcl-2 diminuiu em contato com essa vitamina¹¹⁸.

No nosso estudo encontramos nos animais infartados que receberam a suplementação de vitamina D um aumento da expressão de caspase 3 e diminuição da bcl-2 em relação aos demais animais, o que sugere uma indução do processo de apoptose. Portanto, podemos inferir que os efeitos deletérios da vitamina D após o infarto possam ter sido modulados pela indução da apoptose.

8. Conclusão

8 Conclusão

Contrariamente à hipótese inicial, podemos concluir que:

1. A suplementação de vitamina D em ratos infartados intensifica o processo de remodelação cardíaca.
2. A intensificação do processo de remodelação pode ser explicada pela intensificação do processo de apoptose e pela diminuição da utilização de substrato energético pelo tecido cardíaco. Mas, não por alterações do estresse oxidativo, inflamação e cadeia pesada da miosina.

Referências

Referências

1. World Health Organization. Cardiovascular disease, 2012. Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
2. Ministério da Saúde. Datasus - Departamento de Informática do SUS, 2012. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.
3. 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;3:371-378.
4. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - Concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569-582.
5. Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: Conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol*. 2008;92:157-164.
6. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction : pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101:2981-2988.
7. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-1172.
8. Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79:215-262.
9. Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H. Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol*. 1997;192:87-93.
10. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*. 2002;90:520-530.
11. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 2007;49:241-248.
12. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115:500-508.
13. Ashrafian H, Frenneaux M, Opie L. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*. 2007;116:434-448.
14. Pilz S, Tomaschitz A, März W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, Cavalier E, Pieber TR, Lappe JM, Grant WB, Holick MF, Dekker JM. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clinical Endocrinology*. 2011;75: 575–584.

15. Lips P. Vitamin D physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006;92:4-8.
16. Zhou C, Assem M, Tay JC. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*. 2006;116:1703-1712
17. Covic A, Voroneanu L, Goldsmith D. The effects of vitamin D therapy on left ventricular structure and function – are these the underlying explanations for improved CKD patient survival? *Nephron Clin Pract* 2010;116:187-195.
18. Holick M. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2010;39:381-400.
19. Zitterman A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D insufficiency in congestive heart failure: why and what to do about it? *Heart Fail Rev*. 2006;11:25-33.
20. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D and solar ultraviolet. *Lancet*. 1989;2:1104-1105.
21. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin d in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:690-693.
22. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-281.
23. Millen AE, Bodnar LM. Vitamin D assessment in population-based studies: a review of the issues. *Am J Clin Nutr*. 2008;1102-1105.
24. Holick MF, Garabedian M. *Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications*. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006.
25. Lomonte C, Antonelli M, Vernaglone L, *al e*. Are low plasma levels of 25-(OH) vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism independent of calcitriol in renal transplanted patients? *J Nephrol*. 2005;18:96.
26. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr*. 2003;22:142-146.
27. Larsen E, Mosekilde L, Foldspang A. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based-3-year intervention study. *J Bone Miner Res* 2004;19:370-378.
28. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, DeLuca HF. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology*. 1983;113:1511-1518.

29. Scragg R. *Sunlight, vitamin D and cardiovascular disease*. In: Crass MF III, Avioli LV, eds. *Calcium-regulating hormones and cardiovascular function*. Boca Raton: CRC Press; 1995.
30. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Körfer R, Stehle PA. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Col Cardiol* 2003;41:105-112.
31. Assalin HB, Rafacho BPM, Santos PP, Ardisson LP, Fernandes AAH, Roscani MG, Minicucci MF, Azevedo PS, Zornoff LAM, Paiva SAR. Remodelação cardíaca induzida pela deficiência de vitamina D—modulação pelo estresse oxidativo e Nrf-2. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99:1-30.
32. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:350-359.
33. Grandi NC, Breitling LP, Brenner H. Vitamin D and cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Preventive Medicine*. 2010;51:228–233.
34. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition CoAN, Board on Agriculture, National Research Council. *Nutrient requirements of laboratory animals*. 4th ed. Washington D.C: National Academy Press; 1995.
35. Hrubec Z, Neel JV. The National Academy of Sciences-National Research Council Twin Registry: ten years of operation. *Prog Clin Biol Res*. 1978;24:153-172.
36. Morris GS, Zhou Q, Hegsted M, Keenan M. Maternal consumption of a low vitamin D diet retards metabolic and contractile development in the neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1245-1250.
37. Shepard RM, Deluca HF. Plasma concentrations of vitamin D3 and metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. *Arch Biochem Biophys*. 1980;202:43-53.
38. O'Connell TD, Giacherio DA, Jafvis AK, Simpson RU. Inhibition of cardiac myocyte maturation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology*. 1995;136:482-488.
39. Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)2-vitamin D3 actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 2007;103:533-537.
40. Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, Shivalingappa V, Ke Q, Chen YS, Rigor DL, Stillman I, Tamez H, Kroeger PE, Wu-Wong RR, Karumanchi SA, Thadhani R, Kang PM. Activated

- vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals. *PNAS*. 2007;104:16810-16815.
41. McGonigle RJ, Fowler MB, Timmis AB, Weston MJ, Parsons V. Uremic cardiomyopathy: potential role of vitamin D and parathyroid hormone. *Nephron*. 1984;36:94-100.
 42. Rafacho BPM, Santos P, Assalin HB, Ardisson LP, Roscani MG, Polegato BF, Chiuso-Minicucci F, Fernandes AAH, Azevedo PS, Minicucci MF, Zornoff LAM, Paiva S. Role of vitamin D in the cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Int J Cardiol*. 2012;155:472-473.
 43. Santos PP, Assalin HB, Rafacho BPM, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Roscani MG, Matsubara BB, Zornoff LAM, Paiva SAR. Influência da suplementação de diferentes doses de vitamina D no coração. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2011;21:123-123.
 44. Santos PP, Rafacho B, Ardisson L, Gonçalves AF, Pires V, Minicucci M, Azevedo P, Campana A, Fernandes AA, Zornoff L, Paiva S. Evaluation of oxidative stress and energy metabolism in the heart of rats supplemented with different vitamin D doses. *The FASEB Journal*. 2012;26:385-388.
 45. Heimbürger R. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946;52:677-689.
 46. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-512.
 47. Zornoff L, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*. 2000:208-214.
 48. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J. The Committee on M-Mode Standardization of the American Society of Echocardiography, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;58:1072-1083.
 49. Paiva S, Zornoff L, Okoshi M, Okoshi K, Cicogna A, Campana A. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol*. 2003:225-228.
 50. Zornoff L, Matsubara L, Matsubara B, Okoshi M, Okoshi K, Pai-Silva M, Carvalho R, Cicogna A, Padovani C, Novelli E, Novo R, Campana A, Paiva S. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco smoke exposure in rats. *Toxicol Sci*. 2006;90:259-266

51. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
52. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem.* 1993;26:191-198.
53. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem and Biophysics.* 1996;328:309-316.
54. Wilkinson JH. *Introducción al diagnóstico enzimático.* 3a ed. Buenos Aires: Ediciones Toray; 1965.
55. Bass A, Brdicka P, Eyer P, Hoefler S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969;10:198-206.
56. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and alpha-glycerophosphate dehydrogenase. *Methods of Biochemical Analysis.* 1984;32:123-175.
57. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RCA, Janssen AJM. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta.* 1985;153:23-36.
58. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys.* 1996;333:145-151.
59. Jiang ZY, Woolard A, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidative of Fe³ in the presence of xylenol orange. *Lipids.* 1991;26:853-856.
60. Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 1974;358:251-261.
61. Ewing JF, Janero D. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Annal Chem.* 1995;232:243-248.
62. Schulz R, Kandasamy AD, Chow AK, Alix MAM. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85:413-423.
63. Cohn JN, Ferrari R, N S. Cardiac remodeling - Concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:569-582.
64. Stumpf W, Dar M, DeLuca H. Sites of action of 1,25(OH)₂vitamin D₃ identified by thae-mount autoradiography. In: Cohn DV, Talmage RV, Matthews JL. Hormonal control of calcium metabolism. *Excerpta Medica, Amsterdam.* 1981:222-229.

65. O'Connell T, Simpson R. Immunochemical identification of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor protein in human heart. *Cell Biol Int.* 1996;20:621-624.
66. Witham MD, Dove FJ, Khlan F, Lang CC, Belch JF, Struthers AD. Effects of Vitamin D supplementation on markers of vascular function after myocardial infarction - A randomised controlled trial. *Int J Cardiol.* 2012;In press
67. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2007;103:416-419.
68. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SAR, Zornoff LAM. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol.* 2011;151:242-243.
69. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira Jr SA, Campos DH, Lima AR, Damatto RL, Cezar MD, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551.
70. Wu JJ, 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;97:1577-1588.
71. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2000;10:8-16.
72. Sampaio RO, Nigri M. Remodelação ventricular esquerda: aspectos de interesse clínico. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2003;3:312-316.
73. Rundell VL, Manaves V, Martin AF, Tombe PPD. Impact of beta-myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:896-903.
74. Junior SAO, Pai-Silva MD, Martinez PF, Lima-Leopoldo AP, Campos DHS, Leopoldo AS. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit.* 2010;16:367-373.
75. Wu SH, Ho SC, Zhong L. Effects of vitamin D supplementation on blood pressure. *Southern Medical Journal.* 2010;103:729-737.
76. Li Y. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2003;88:327-331.

77. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2006;30:604-610.
78. Zamilpa R, Lindsey ML. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: Causes and consequences. *Journal of molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48:558-563.
79. Izumi T, Nishii M. Diagnostic and prognostic biomarkers in acute myocarditis Interleukin-10. *Herz*. 2012;37:627-631.
80. Ammirati E, Cannistraci CV, Cristell NA, Vecchio V, Palini AG, Tornvall P, Paganoni AM, Miendlarzewska EA, Sangalli LM, Monello A, Pernow J, Björnstedt-Bennermo M, Marenzi G, Hu D, Uren NG, Cianflone D, Ravasi T, Manfredi AA, Maseri A. Identification and predictive value of interleukin-6+ interleukin-10+ and interleukin-6- interleukin-10+ cytokine patterns in ST-elevation acute myocardial infarction. *Circ Res*. 2012;111:1336-1348.
81. Kawamura A, Miura S, Murayama T, Iwata A, Nishikawa H, Matsuo Y, Tsuchiya Y, Matsuo K, Tsuji E, Saku K. Changes in the expression of leukocyte adhesion molecules throughout the acute phase of myocardial infarction. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11:29-34.
82. Santos PP, Nogueira BF, Rafacho BPM, Azevedo PS, Polegato BF, Chiuso-Minicucci F, Bonomo C, Roscani MG, Zorzella-Pezavento SFG, Tanni SE, Pereira EJ, Okoshi MP, Paiva SAR, Zornoff LAM, Minicucci MF. Aldosterone is not involved in the ventricular remodeling process induced by tobacco smoke exposure. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30:1191-1201.
83. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr*. 2004;80 suppl 2:1717–1720.
84. Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD. Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Ann Intern Med*. 2010;152:315-323.
85. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions: Potential for pharmacological interventions. *Card Res* 1997;33:243–257.
86. Kodde IF, Stok Jvd, Smolenski RT, Jong JWd. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol*. 2007;146:26-39.

87. Saks V, Favier R, Guzun R, Schlattner U, Wallimann T. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol*. 2006;577:769-777.
88. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005;85:1093-1029.
89. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF. Metabolic modulation : A means to mend a broken heart. *Circulation*. 2002;105:140-142.
90. Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut*. 2004;9:31-45.
91. Stanley WC, Rydén L. *The diabetic coronary patient*. 2nd edition ed: Science Press; 2003.
92. Nelly JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol*. 1974;36:413-459.
93. Wolfe CL, Sievers RE, Visserem FLJ, Donnelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation*. 1993;87:881-892.
94. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1360–1372.
95. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*. 1996;148:291–300.
96. Kinugawa S, Tsutsui H, S SH, Ide T, Suematsu N, Satoh S. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodelling and failure after experimental myocardial infarction in mice: Role of oxidative stress. *Circ Res*. 2000;87:392-398.
97. Bolli R, Jeroudi M, Patel B, Aruoma O, Halliwell B, Lai E. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial “stunning” is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res*. 1989;65:607-622.
98. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1287-1312.
99. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.
100. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis in critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:443-453.

101. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1199-1207.
102. Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, Fahl WE, Shugar D, Liu J, Qu W, Collins S, Waalkes MP. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med.* 2007;42:1797–1806.
103. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res.* 2009;105:365-374.
104. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:576–586.
105. Rajasekaran NS, Varadharaj S, Khanderao GD, Davidson CJ, Kannan S, Firpo MA, Zweier JL, Benjamin IJ. Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:957–971.
106. González-Reimers E, Durán-Castellón MC, López-Lirola A, Santolaria-Fernández F, Abreu-González P, Alvisa-Negrín J, Sánchez-Pérez MJ. Alcoholic myopathy: Vitamin D deficiency is related to muscle fibre atrophy in a murine model. *Alcohol & Alcoholism.* 2010;45:223-230.
107. Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, Martikainen P, Miettinen S, Pennanen P, Purmonen S, Syvä H, Vienonen A, Tuohimaa P. Antiproliferative action of Vitamin D. *Vitam Horm.* 2002;64:357.
108. Haendchen RV. Apoptose miocárdica. Um novo mecanismo de morte celular. *Arq Bras Cardiol.* 1998;70:65-68.
109. Empel VPMv, Bertrand ATA, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, Windt LJD. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular Research.* 2005; 67:21 – 29.
110. DeRobertis EMF, Hib J, Ponzio R. *Biologia celular e molecular:* Guanabara Koogan; 2003.
111. Communal C, Sumandea M, Tombe Pd, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *PNAS.* 2002;99(9):6252–6256.
112. Cittadini A, Isgaard J, Monti MG, Casaburi C, Gianni AD, Serpico R, Iaccarino G, Sacca L. Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;18:2154-2163.
113. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326:1-16.

114. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis : basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82:1111-1129.
115. Chan S-L, Yu VC. Proteins of the Bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:119–128.
116. Wolden-Kirk H, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Extraskeletal effects of vitamin D. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2012;41:571-594.
117. Kizildag S, Ates H, Kizildag S. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCL(XL), and p21. *Ann Hematol.* 2009;89:1–7.
118. Sharan C, Halder SK, Thota C, Jaleel T, Nair S, Al-Hendy A. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-o-methyltransferase. *Fertil Steril.* 2011;95:247.