

Patrícia Helena Corrêa Alegre

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA MART.*) NO MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM RATOS

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

Orientadora: Profa. Dra. *Bertha Furlan Polegato*

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Alegre, Patricia Helena Correa.

Influência da suplementação de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no modelo de isquemia-reperfusão em ratos /
Patricia Helena Correa Alegre. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Bertha Furlan Polegato

Capes: 40101100

1. Açaí - Uso terapêutico. 2. Metabolismo energético. 3. Stress oxidativo. 4. Coronariopatias. 5. Remodelação ventricular. 6. Reperfusão miocárdica.

Palavras-chave: Açaí; Estresse oxidativo; Função ventricular esquerda; Metabolismo energético.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização.”

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

Á DEUS por me guiar, proteger e por me dar essa conquista.

Aos meus pais WANDERLEY e HELENA, com todo o meu amor, por estarem ao meu lado durante todos os momentos, por tudo que fizeram por mim ao longo de todos os esses anos. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês, principalmente quanto à minha formação.

À minha irmã VITÓRIA, por me ajudar sempre que precisei e pelo carinho.

Ao meu namorado CLEITON pelo companheirismo, força, amor e apoio nos estudos e em todos os momentos da minha vida.

Ao meu avô AYRTON (*in memorian*) que certamente estaria orgulhoso de mim neste momento. Ao meu avô "INHO" (*in memorian*) e minhas avós HELENA e NADIR.

Amo vocês.

Agradecimento especial

A minha orientadora Profa. Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO, por me mostrar o verdadeiro significado de mestre, por ser essa professora brilhante, atenciosa, dedicada e amorosa. Por toda sua competência, ensinamentos, carinho, paciência, generosidade e calma. Agradeço pela oportunidade que me deu e por todo o apoio. Tenho muito orgulho de tê-la como orientadora. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do departamento de Clínica Médica, em especial ao Dr. SERGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA, Dr. MARCOS F. MINICUCCI, Dr. LEONARDO A. M. ZORNOFF, Dr.^a PAULA S. AZEVEDO GAIOLLA, pelas contribuições no decorrer de todo projeto.

Agradeço especialmente ao Prof. DR LEONARDO A. M. ZORNOFF e a pós-doutoranda Priscila pela incrível contribuição no exame geral de qualificação.

À professora Dr.^a. ANA ANGÉLICA H. FERNANDES do Instituto de Biociências - UNESP, pela realização das análises bioquímicas.

Aos amigos e companheiros de Laboratório ANA CAROLINA, ANDRÉA, ANGÉLICA, BRUNA CAMARGO, BRUNA LETÍCIA, BRUNA PAOLA, PAMELA, RENATA, VANESSA, RENAN e TATIANA pela troca de conhecimentos e por todo companheirismo. Em especial a ANGÉLICA, pela amizade, apoio e auxílio durante todo o curso, por ser minha dupla de laboratório e por me ajudar sempre que precisei. A TATIANA por todos os conselhos, por sempre me ouvir e por ser essa pessoa especial!

A minha amiga LÍVIA, que esta ao meu lado desde a graduação e que desde então se tornou inseparável, minha companheira de todos os momentos, bons e ruins, sempre me apoiando. Agradeço pela sua amizade.

Aos FUNCIONÁRIOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, Pós-Graduação, Departamento de Clínica Médica, Unidade de Pesquisa Experimental e Biblioteca por todo suporte prestado. Em especial ao funcionário ARLINDO da Unidade de Pesquisa Experimental, por me ajudar diariamente no manejo dos animais. Obrigada por tudo ARLINDO!

Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	5
Objetivo.....	11
Material e Método	13
Resultados	23
Discussão	26
Conclusão	35
Tabelas e Figuras	37
Referências	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Peso Corporal Inicial, Final E Consumo De Ração Diário.....	38
Tabela 2. Peso Dos Orgãos	38
Tabela 3. Atividade Das Enzimas Relacionadas Ao Estresse Oxidativo	38
Tabela 4. Metabolismo Energético	39
Tabela 5. Atividade Das Enzimas Da Cadeia Respiratória Mitocondrial	39
Tabela 6. Expressão Das Proteínas Da Via Do Estresse Oxidativo.....	39
Tabela 7. Análise histológica no miocárdio do VE	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área De Miocárdio Infartado	40
Figura 2. Estudo Do Coração Isolado	41
Figura 3. Relação Pressão Diastólica E Volume.....	42
Figura 4. Hidroperóxido de lipídio	43

LISTA DE ABREVIATURAS

A: suplementação de polpa de açaí
ASM: áreas seccionais transversas dos miócitos
ATP: adenosina trifosfato
 β -OH-acil CoA-DH: β -hidroxiacil-coenzimaA desidrogenase
C: controle
Ca²⁺: cálcio
CAT: catalase
CS: citrato sintase
DNA: ácido desoxirribonucléico
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
FADH₂: dinucleotídeo de flavina e adenina
FOXO1: proteína forkhead 1
FC: frequência cardíaca
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH-Px: glutaciona peroxidase
HL: hidroperóxido de lipídio
Keap1: Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
LDH: lactato desidrogenase
LDL: low-density lipoprotein
Na⁺/K⁺ ATPase: bomba de sódio e potássio
NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NF- κ B: fator nuclear- κ B
Nrf2: fator nuclear derivado de eritróide 2
NOS: oxido nítrico sintase
PSmáx: pressão sistólica máxima atingida
+ dP/dt: primeira derivada positiva de pressão
-dP/dt: primeira derivada negativa de pressão
PC: peso corporal final
PFK: fosfofrutoquinase
RIPA: radioimmunoprecipitation assay
SOD: superóxido dismutase
SIRT1: sirtuína 1
VD: ventrículo direito
VE: ventrículo esquerdo

RESUMO

Introdução: o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos de lesão durante e após a isquemia miocárdica. O açaí é um fruto que possui uma elevada capacidade antioxidante. O objetivo do estudo foi avaliar a influência do açaí no modelo de isquemia global-reperfusão em ratos.

Material e métodos: Foram utilizados 19 ratos Wistar machos, alocados em 2 grupos: Controle (receberam dieta padrão) e Açaí (receberam dieta padrão suplementada de açaí a 5%). Após seis semanas, os animais foram submetidos ao protocolo de isquemia global-reperfusão e estudo do coração isolado. Durante o protocolo, foi avaliada a função ventricular no período pós-isquemia e reperfusão. Os corações foram utilizados para análise da porcentagem de área isquêmica, avaliação do estresse oxidativo e metabolismo energético miocárdico.

Resultados: Não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao peso inicial, peso final, consumo diário de ração, área de infarto do miocárdio e na expressão das proteínas NF- κ B fosforilado e total, FOXO1 acetilada e total, SIRT1 e Nrf-2. A suplementação de açaí promoveu menor concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídio e observamos maior atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Observamos maior atividade da β -hidroxiacil-coenzimaA desidrogenase, piruvato desidrogenase e citrato sintase no miocárdio dos animais que receberam açaí e menor atividade das enzimas lactato desidrogenase e fosfofrutoquinase. Com relação à cadeia respiratória mitocondrial observamos maior atividade do complexo I, complexo II e ATP sintase no grupo suplementado com açaí. A função sistólica foi semelhante entre os grupos e os animais que receberam açaí apresentaram pior função diastólica quando comparados aos animais que não receberam. Não observamos diferença entre os grupos controle e açaí em relação à área seccional do miócito.

Conclusão: apesar de melhorar o metabolismo energético e atenuar o estresse oxidativo, a suplementação de açaí não diminuiu a área de infarto, bem como não melhorou a função ventricular esquerda no modelo de isquemia global/reperfusão.

Palavras-chave: Açaí; Estresse oxidativo; Metabolismo energético; Isquemia miocárdica; Reperfusão miocárdica.

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress is one of the main mechanisms of injury during and after myocardial ischemia. Açai is a fruit that has a high antioxidant capacity. The aim of the study was to evaluate the influence of açai in the global ischemia-reperfusion model in rats.

Material and methods: We used 19 male Wistar rats, allocated in 2 groups: Control (received standard diet) and Açai (received a standard diet supplemented with 5% açai). After six weeks, the animals were submitted to the global ischemia-reperfusion protocol and isolated heart study. During the protocol, the ventricular function in the post-ischemic and reperfusion period was evaluated. The hearts were used to analyze the percentage of ischemic area, evaluation of oxidative stress and myocardial energetic metabolism.

Results: There was no statistically significant difference between the groups in initial body weight, final body weight, daily feed intake, myocardial infarction area and expression of phosphorylated and total NF- κ B protein, acetylated and total FOXO1, SIRT1 and Nrf-2. Açai supplementation promoted a lower myocardial concentration of lipid hydroperoxide and we observed higher activity of the enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. We also observed increased activity of β -hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, and citrate synthase in the myocardium of animals that received açai, as well lower activity of the enzymes lactate dehydrogenase and phosphofructokinase. Regarding the mitochondrial respiratory chain, we observed higher activity of complex I, complex II and ATP synthase in the group supplemented with açai. The systolic function was similar between the groups and the animals that received açai presented worse diastolic function when compared to the animals that did not receive. We did not observe difference between the control and açai groups in relation to the sectional area of the myocyte.

Conclusion: despite improving energy metabolism and attenuating oxidative stress, açai supplementation did not decrease the infarcted area, nor did it improve left ventricular function in the global ischemia / reperfusion model.

Key words: Açai; oxidative stress; energy metabolism; myocardial ischemia; myocardial reperfusion.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são atualmente a principal causa de morte em todo o mundo. São responsáveis por cerca de 30% das mortes no planeta e no Brasil o cenário não é diferente. As doenças do aparelho circulatório representam a principal causa de morte em nosso país, sendo responsáveis por 32,17% dos óbitos registrados entre 1990 e 2011 (1). Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2012, representando 31% de todas as mortes globais. Destes óbitos, cerca de 7,4 milhões eram devidos a doença coronária e 6,7 milhões a acidentes vasculares cerebrais (2).

Em 2009, foram registradas 91.970 internações por doenças cardiovasculares, totalizando um custo de R\$165.461.644,33, segundo o Ministério da Saúde (DATASUS). Apesar da mortalidade atribuída às doenças isquêmicas do coração estar diminuindo em alguns países, ainda cursa com elevada morbidade, contribuindo para diminuição na qualidade de vida e também aumentando os gastos em saúde (1).

Os eventos isquêmicos cardíacos podem ser decorrentes de isquemia parcial ou total do tecido, cursando com disfunção miocárdica reversível ou irreversível e morte celular. Eventos isquêmicos cardíacos seguidos de reperfusão induzem disfunção miocárdica reversível, chamada de stunning (3,4). O stunning (miocárdio atordoado) está relacionado à disfunção sistólica e diastólica (5) e se caracteriza por depressão branda da função ventricular em presença de fluxo sanguíneo normal e ausência de marcadores de injúria irreversível (6,7).

A ocorrência de stunning é dependente da duração e intensidade do evento isquêmico. Estudos mostram que períodos de isquemia inferiores a 20 minutos induzem disfunção ventricular acompanhada de lesão miocárdica reversível, enquanto períodos isquêmicos superiores a 20 minutos causam lesão irreversível dos cardiomiócitos e incapacidade de recuperação funcional, mesmo com restauração do fluxo sanguíneo (3,6).

A injúria decorrente da reperfusão é um fenômeno fisiopatológico que vem chamando a atenção por suas evidentes e significativas repercussões na prática clínico-cardiológica e muito se têm estudado no intuito de definir a patogênese da lesão por isquemia-reperfusão. Os eventos relacionados à isquemia

são complexos e caracterizados por uma série de alterações metabólicas e bioquímicas abruptas no miocárdio que levam ao dano cardíaco (8,9).

Durante a isquemia, o suprimento de oxigênio destinado à mitocôndria cessa, interrompendo o ciclo de Krebs, assim, quase nenhuma energia é disponível a partir da fosforilação oxidativa. No intuito de suprir a demanda energética do miocárdio, o ATP celular é gerado pela glicólise. Essa alteração do metabolismo celular é acompanhada por um aumento nos níveis de lactato citosólico e redução do pH intracelular. Com isso, após 30 minutos de isquemia, a concentração iônica de hidrogênio no citosol aumenta e o pH celular pode chegar a 5,5 a 6,0 . Em paralelo, a redução nos níveis de ATP interrompe a atividade de bombas ativas importantes na homeostase iônica, como a bomba de Sódio e Potássio (Na^+/K^+ ATPase) e retículo sarcoplasmático cálcio ATPase. A inatividade dessas bombas resulta em sobrecarga adicional de Na^+ e Ca^{2+} , o que inviabiliza a repolarização celular, levando à disfunção contrátil (10).

Além disso, níveis elevados de Ca^{2+} no citosol ativam enzimas associadas à peroxidação lipídica, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), disfunção de proteínas contráteis, perda da função celular e, em última instância, morte celular (10).

Durante a reperfusão, os danos da isquemia são exacerbados, pois a restauração do fluxo de oxigênio gera uma descarga de EROs na mitocôndria (11). A produção de EROs e a sobrecarga de Ca^{2+} são os principais fatores contribuintes para os danos celulares induzidos pela isquemia-reperfusão, pois levam à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A abertura desse poro leva a perda do potencial de ação da membrana da mitocôndria, desacoplamento da fosforilação oxidativa, desencadeando depleção de ATP e morte celular (10).

Apesar de necessária para a reversão da isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo, portanto, pode, em última análise, ser mais deletéria que o próprio processo de isquemia (10).

Quando ocorre acúmulo desses radicais, principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio, estamos diante de uma situação denominada estresse oxidativo. Isso ocorre devido a um desequilíbrio entre a

produção e a remoção de agentes oxidantes no organismo. O excesso de radicais livres pode ocasionar arritmias, redução da função sistólica e alteração na permeabilidade da membrana dos miócitos (12). Estes eventos são decorrentes, ao menos em parte, do aumento da formação de compostos denominados radicais hidroperóxidos, gerados ao final do metabolismo oxidativo das células. Os radicais hidroperóxidos são removidos das células por sistemas de enzimas com funções antioxidantes, geralmente presentes no miocárdio. Esses sistemas de enzimas com ação antioxidante são responsáveis pela limitação do acúmulo intracelular de radicais livres durante o metabolismo normal, reduzindo o dano oxidativo sobre proteínas e lipídeos (13). As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas (12).

Um componente essencial na defesa antioxidante do organismo são as enzimas de segunda fase, que sequestram os radicais livres, e os chamados elementos da resposta antioxidante. O principal regulador da transcrição desses elementos é o Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2) tendo, portanto, um importante papel no processo de adaptação celular no combate ao estresse oxidativo (14). Além do Nrf2, a SIRT1 (sirtuína 1), histona desacetilase dependente de NAD, atua como um regulador crítico em resposta ao estresse oxidativo. A SIRT1 bloqueia a lesão do sistema cardiovascular através do antagonismo da lesão celular induzida pelo estresse oxidativo e da manutenção da homeostase metabólica no organismo (15). A SIRT1 também controla a acetilação do NF- κ B. Estudo com camundongos Knockout para a SIRT1 mostrou hiperacetilação do NF- κ B, o que levou ao aumento da transcrição de genes pró-inflamatórios em macrófagos (16).

Com relação ao efeito do Nrf2 no sistema cardiovascular, cardiomiócitos expostos a estímulo oxidativo aumentam rapidamente a expressão de Nrf2 (17), que é um importante regulador da expressão de enzimas antioxidantes. Estudos com modelos de isquemia miocárdica mostram que há aumento de Nrf2 após insulto isquêmico e que esta proteína tem importante papel na proteção miocárdica contra injúria induzida pelo estresse oxidativo (18,19). O efeito do açaí na expressão de Nrf2 foi verificado em estudo com

cultura de astrócitos de ratos, em que o açaí reduziu a expressão proteica de Nrf2 (20), mas não há estudos do efeito do açaí na expressão de Nrf2 no miocárdio.

O NF- κ B (nuclear factor kappa B) pertence à família de fatores de transcrição que são os principais mediadores da inflamação, estando aumentado em estados pró-inflamatórios. O aumento de inflamação está intimamente associado ao aumento do estresse oxidativo. Além disso, pode controlar a expressão gênica de angiotensinogênio, precursor da angiotensina II (21). Sabe-se que a ativação exacerbada do sistema renina-angiotensina-aldosterona está relacionada com a fisiopatologia de muitas doenças cardiovasculares (21).

Outro fator de transcrição com papel importante nas respostas celulares pertence à família das proteínas FOXO (forkhead) (22). O aumento da atividade transcricional de FOXO aumenta a expressão de catalase e superóxido dismutase e com isso, ocorre o aumento a detoxificação de EROs (23).

No intuito de melhorar a proteção miocárdica durante procedimentos que envolvam injúria de reperfusão, atenções voltaram-se para a pesquisa de drogas citoprotetoras com ação no metabolismo celular, utilizadas de forma isolada ou associadas, visando a redução ou prevenção do dano sobre as células cardíacas (13). Neste contexto, observamos grande interesse nas ações antioxidantes e antiinflamatórias de produtos naturais como fontes de compostos cardioprotetores, como por exemplo, o açaí (24).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é um fruto típico do norte do Brasil, extraído de palmeira amazônica da Família Aracaceae e que apresenta uma grande importância econômica para a região. Seu consumo vem crescendo no país e no mundo, sendo considerado por muitos um alimento funcional. Contém aproximadamente 13% de proteína, 48% de lipídios e 1,5% de carboidrato (25). Além disso, é rico em compostos fenólicos, ácidos graxos mono e poliinsaturados, fitoesteróis, fibra alimentar e é fonte de minerais e vitaminas (26).

O açaí vem se destacando nos últimos anos por sua elevada capacidade antioxidante. Diversos estudos já evidenciaram seu efeito antioxidante (27-32), que está relacionado à presença de alguns compostos, dentre os quais podemos destacar os ácidos fenólicos, os flavanóides e as antocianinas (11, 33).

Em humanos, o consumo de açaí reduziu a formação de espécies reativas de oxigênio em polimorfonucleares, reduziu a migração em direção a diferentes quimioatrativos pró-inflamatórios, inibiu a peroxidação lipídica e aumentou a proteção antioxidante nos eritrócitos (34).

Em estudos experimentais o consumo de açaí diminuiu os danos ao DNA induzidos por peróxido de hidrogênio, além de apresentar atividade anti-proliferativa e anti-carcinogênica em neoplasia de bexiga em camundongos (30). A suplementação de açaí em camundongos fumantes diminuiu significativamente o estresse oxidativo pulmonar e também preservou o sistema glutathiona nos animais que receberam a fruta (27). A suplementação dietética de açaí em ratos também reduziu a produção de EROs por neutrófilos e danos às proteínas, aumentou os níveis de glutathiona e ativou a expressão do gene da glutathiona peroxidase e da gamaglutamilcisteína-sintetase-1 no fígado (31). O pré-tratamento de células de tecido cerebral com açaí, reduziu os danos induzidos por peróxido de hidrogênio em proteínas e lipídios e retornou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) para níveis basais (35).

Com relação a estudos experimentais em modelos de agressão cardíaca, ratos submetidos a infarto do miocárdio por ligação da artéria descendente anterior, a administração do açaí por via oral foi capaz de atenuar a hipertrofia e a disfunção do ventrículo esquerdo (36), mas não há estudos sobre o efeito do açaí no modelo de isquemia global e tampouco sobre seu efeito na injúria de reperfusão.

Diante do exposto, formulamos a hipótese de que a suplementação prévia de açaí pode prevenir o aparecimento de disfunção ventricular e diminuir a área de infarto no modelo de isquemia global-reperfusão e que esses efeitos estão relacionados à sua capacidade antioxidante.

OBJETIVOS

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a área de infarto, a função ventricular esquerda, o estresse oxidativo e a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo energético miocárdico, no modelo de isquemia global/reperfusão em ratos após suplementação de açai.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Delineamento

O protocolo experimental deste trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEUA: 1111-2014), estando de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central do campus da UNESP de Botucatu, que foram alocados em 2 grupos: controle (C) e açaí (A). Houve perda de um animal do grupo controle devido problemas técnicos na execução do protocolo de isquemia e reperfusão. Deste modo, o grupo C foi constituído por 9 animais e o grupo A por 10 animais. Os animais foram mantidos em caixas individuais, com temperatura controlada (25°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. O grupo C recebeu dieta padrão e o grupo A recebeu dieta padrão suplementada com açaí a 5%. A suplementação foi iniciada quando os animais atingiram o peso de 250 a 300 g e foi fornecida durante seis semanas; a ingestão da dieta e o peso dos animais foram mensurados durante todo o período do estudo. Esse período de suplementação foi determinado a partir de estudos prévios que evidenciaram efeito biológico utilizando o mesmo período (37). Após o período de suplementação, todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (80 mg/Kg, IP) para a retirada do coração e realização do protocolo de isquemia global-reperfusão e estudo do coração isolado. Adicionalmente, foram coletados e pesados fígado e pulmão. Após o estudo do coração isolado os corações foram dissecados para separação dos ventrículos, foram pesados e os ventrículos esquerdos foram armazenados em freezer a -80°C para posteriores análises.

O número de animais necessários para o estudo foi baseado em outros estudos que utilizaram o mesmo modelo experimental (6, 38, 39).

2. Preparação da dieta suplementada com açaí

Foi utilizada a polpa comercializada de açaí (Icefruit®) para preparar a ração. A ração utilizada foi a Nuvilab (Nuvital®) farelada. A polpa foi

homogeneizada e estocada à temperatura de -80°C. No momento do preparo da ração, a polpa foi descongelada e, já em estado líquido, foi incorporada à ração-padrão triturada, misturada e peletizada em seguida. Depois de pronta, o armazenamento foi realizado em freezer a -20°C.

A dose utilizada no estudo foi de 5%, proposta por Fragoso e colaboradores, que estudaram a suplementação de açaí no modelo de carcinogênese de cólon ⁽⁴⁰⁾. O tratamento com a ração suplementada foi iniciado após o período de adaptação e continuou até o final do estudo.

3. Indução de isquemia global-reperfusão e avaliação da função cardíaca

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (80mg/kg, intraperitoneal), heparinizados (2000 UI, intraperitoneal) e submetidos à ventilação com pressão positiva e 100% de oxigênio. Em seguida, foi realizada esternotomia mediana e a aorta ascendente foi isolada e canulada com cânula metálica (23 x 1,5 mm) para perfusão retrógrada. A perfusão retrógrada do coração foi iniciada com solução filtrada de Krebs-Henseleit modificada, com a seguinte composição, em mmol/l: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,25 CaCl₂; 1,2 MgSO₄; 1,15 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11,0 glicose; 8,0 manitol ^(41,42). Em seguida, os corações foram removidos rapidamente e transferidos para aparato de perfusão de Langerdorff (Modelo 830 Hugo Sachs Elektronik, Germany) com pressão de perfusão mantida a 75 mmHg e temperatura de 37°C. A solução nutriente foi constantemente oxigenada com mistura gasosa de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Foi utilizado marca-passo para manter a frequência cardíaca controlada (250 bpm) durante o período de estabilização, reperfusão e análise da função.

O átrio esquerdo foi removido e o ventrículo esquerdo puncionado com agulha para drenar a cavidade ventricular, evitando assim o acúmulo de líquido em seu interior. Em seguida, um balão de látex foi inserido na cavidade ventricular esquerda, acoplado a transdutor de pressão (P23 XL) e a uma seringa, que permitiu a variação de volume do balão.

Após 10 minutos de estabilização os corações foram submetidos a período de 30 minutos de isquemia global seguida por 30 minutos de reperfusão.

A isquemia global foi induzida interrompendo-se totalmente o fluxo da solução de Krebs-Henseleit para o coração. Os tempos de isquemia e reperfusão foram determinados baseados em outro estudo, que avaliou o tempo de isquemia necessário para transição de lesão cardíaca isquêmica reversível para irreversível, observando que após 20 minutos de isquemia global passa a ocorrer lesão irreversível dos cardiomiócitos ⁽⁶⁾.

Após o período de isquemia e reperfusão, foi realizada avaliação da função ventricular esquerda. O volume no interior do balão foi aumentado progressivamente, permitindo uma variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo de 0 a 25 mmHg. Além disso, para cada incremento de volume ao balão, foi registrada a pressão sistólica. Nessas preparações, em que o coração opera em contrações isovolumétricas, a pressão sistólica é indicador da capacidade contrátil. Foram construídas curvas da relação pressão diastólica - volume e também foram registradas a derivada positiva de pressão (+dP/dt) e a derivada negativa (-dP/dt) máximas que foram consideradas parâmetros de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, respectivamente.

4. Análise da área de miocárdio infartado

Ao final do protocolo de isquemia-reperfusão, os corações foram removidos do aparato e dissecados. Os ventrículos foram pesados e o ventrículo direito foi descartado. Foi então realizada a secção transversal do ventrículo esquerdo, a 5 mm a partir do ápice, com espessura de 2 mm, que foi incubado em tampão fosfato pH 7,4 com cloreto de trifeniltetrazolio (Sigma Aldrich) a 1%, por 30 minutos a 37°C. Após, os cortes foram incubados em solução de formaldeído a 10% overnight. A seguir, as secções dos ventrículos foram posicionadas entre duas lâminas de vidro e digitalizadas em scanner para obtenção das imagens. A área de infarto foi mensurada através do programa Image J por planimetria e expressa em porcentagem de área infartada sobre o total de área ⁽⁴³⁾. Em células vivas o corante é reduzido por desidrogenases e aparece com uma coloração vermelha escura. Células mortas que não possuem as enzimas não são coradas ⁽⁴⁴⁾.

5. Análise das enzimas antioxidantes

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no tecido cardíaco. A oxidação foi medida por meio da determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo no tecido cardíaco. Amostras de aproximadamente 100mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugado por 30 minutos a -4°C , segundo descrito por Pereira et al. ⁽⁴⁵⁾. Em seguida, realizada quantificação de proteínas totais na amostra.

- Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-Px): a atividade da GSH-Px foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura et al., em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutathione reduzida e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metileno-tetrahidrofolato redutase (NADPH_2) a 340 nm na presença de glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada, foi determinada a atividade da GSH-Px, expressa em nmol/mg de tecido ⁽⁸⁾.

- Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD): a atividade da SOD foi determinada pela técnica de Crouch et al., tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de nitroblue-tetrazóico por radicais superóxido gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do nitroblue-tetrazóico para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra é adicionada, a velocidade de redução do nitroblue-tetrazóico é inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. A atividade foi expressa em nmol/mg de proteínas totais ⁽⁸⁾.

- Determinação da atividade da Catalase: a atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 240nm. Os resultados, expressos $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas totais ⁽⁴⁵⁾.

- Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo: medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe_2^+) medida por

hidroperóxido, com 100 µl da amostra e 900 µl de mistura reagente de sulfato ferroso (FeSO₄), 250 µM, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25 mM, xilenol orange 100 µM e butil-hidroxitolueno 4 mM em 90% (v/v) metanol. A intensidade da coloração da reação foi medida espectrofotometricamente. A concentração do hidroperóxido de lipídeo foi expressa em nmol/g de tecido ⁽⁹⁾.

6. Avaliação do metabolismo energético

Aproximadamente 100 mg de amostras do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,0) e centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas e a atividade das enzimas do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons foi determinada após ressuspensão e centrifugação do pellet com tampão fosfato de sódio (0,1 M) contendo 250 mM de sacarose e 2 mM de EDTA ⁽⁴⁶⁾. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca com controle por software. Todos os reagentes foram obtidos do laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

- Determinação da atividade da β-OH-acil CoA-DH: determinada na presença de tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,0), EDTA, acetoacetil-CoA e NADH ⁽⁴⁷⁾.

- Determinação da atividade da citrato sintase (CS): avaliada pela reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetato, reação catalisada pela CS, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA, oxaloacetato e dithiobis-2-nitrobenzoato em tampão fosfato Tris-HCl (50 mM; pH 8,0) ⁽⁴⁸⁾.

- Determinação da atividade do complexo I: a atividade do complexo I foi determinada em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio (80 mM; pH 7,4), EDTA e NADH, onde se monitorou a velocidade de oxidação do NADH ⁽⁴⁹⁾.

- Determinação da atividade do complexo II: a atividade enzimática do complexo II foi medida em meio com tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e 2,6-diclorofenolindofenol, o qual teve absorvância a 600 nm ⁽⁵⁰⁾.

- Determinação da atividade da ATP sintase: a atividade da ATP sintase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50 mM; pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, lactato desidrogenase e piruvato quinase ⁽⁵¹⁾.

- Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK): a atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50 mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂ ⁽⁵²⁾.

- Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH): a atividade da LDH foi determinada com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH₂, que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

- Determinação da atividade da piruvato desidrogenase (PDH): na presença de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4) foi determinada a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotreitól, MgCl₂, nitroblue tetrazolium, piruvato de sódio e fenasina metassulfato, onde mediu-se a conversão do piruvato em acetil coenzima A através da velocidade de redução do NAD ⁽⁴⁷⁾.

7. Avaliação da expressão proteica do NF-κB, SIRT-1, Nrf2 e FOXO1 por Western blot

A extração para a quantificação do NF-κB total e fosforilado, FOXO1 e SIRT1 foi realizada utilizando 80 mg do ventrículo esquerdo homogeneizados com 1 ml de tampão de extração–radioimmunoprecipitation assay (RIPA). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos por 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 4° C e 12.000 rpm para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, as quais foram armazenadas a -80°C.

A extração das proteínas do VE para quantificação do Nrf2 foi realizada com o Kit NE - PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce

Biotechnology), que permite a extração separadamente das proteínas citoplasmáticas e nucleares. A amostra congelada foi homogeneizada em tubo de Dounce com o tampão CER I do kit, de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. O CER I torna a célula túrgida, e causa estresse na membrana celular. Após incubação em gelo por 10 minutos, foi adicionado o tampão CER II, que atua promovendo a lise celular, e o produto dessa homogeneização foi centrifugado a 16.000 rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante, que corresponde ao extrato citoplasmático, foi transferido para tubos eppendorfs e armazenado em ultrafreezer a -80°C.

Os pellets que permaneceram nos eppendorfs foram ressuspensos com o tampão NER e incubados em gelo por 10 min. Após 4 ciclos de vortexização e incubação, os eppendorfs foram centrifugados a 16.000 rpm por 12 minutos a 4°C. O sobrenadante, que corresponde ao extrato nuclear, foi transferido para tubos eppendorfs e armazenado em ultrafreezera -80°C.

As concentrações de todas as proteínas dos extratos foram analisadas pelo método de Bradford, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) como padrão. Após a quantificação da concentração de proteína por método de Bradford, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli e congeladas a -80 °C.

Para cada proteína foram utilizadas temperaturas da amostra e tempos de aquecimentos diferentes (FOXO1 e Nrf2: 10 minutos a 60°C, SIRT1: 5 minutos a 100°C e NF-κB total e fosforilado: 10 minutos a 100°C). A concentração do gel de resolução foi de 8% para a SIRT1 e 10% para as demais proteínas, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida a 4°C (30min a 50 V e 2h a 120 V sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell®: Bio-Rad, Hercules, EUA).

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (sistema Mini Trans-Blot®: Bio-Rad, Hercules, EUA) em sistema de transferência úmido por 90min, a 120 V e a 4°C utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e Sódio dodecil sulfato 0,1%). A seguir, a membrana foi bloqueada em solução de leite em pó desnatado a 5% em temperatura ambiente por 2h para prevenir ligações inespecíficas com os

anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20, acrescentados os anticorpos primários e em seguida foram incubadas por uma noite a 4 °C sob constante agitação. No dia subsequente, após três lavagens com solução basal (Tris 1 M pH 8,0; NaCl 2,5 M e detergente Tween 20), as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente com os anticorpos secundários adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com as recomendações do fabricante e novamente lavadas três vezes em solução basal.

Como controle endógeno, foi utilizada a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A banda de interesse foi localizada por meio de marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA). O fotodocumentador utilizado foi ImageQuant LAS 4000 (General Eletrikcs) e as imagens geradas foram analisadas pelo programa Gel-Pro® 32 (Media Cybernetics, Rockville, EUA) onde as bandas foram quantificadas por densitometria. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH e um mesmo animal controle foi incluído em todas as eletroforeses para padronização entre os experimentos.

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- Nrf2, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 722), diluição 1:400.
- p- NF-κB p65, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 33020), diluição 1:200.
- NF-κB total, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 8008), diluição 1:200.
- Ac Foxo, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 49437), diluição 1:100
- Foxo, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 49437), diluição 1:100

- SIRT1, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 15404), diluição 1:200
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233), diluição 1:10.000.

Os Anticorpos secundários utilizados foram os seguintes:

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

8. Histologia

Após a dissecação do coração, foi realizado corte seccional adicional do ventrículo esquerdo a partir de 7 mm do ápice ventricular, que foi colocado em formol tamponado a 10% por 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram armazenados em álcool 70% e inclusos em blocos de parafina ^(52,53) para obtenção de cortes coronais para a análise histológica.

Foram realizados cortes histológicos de 3 μ m nos blocos de parafina e corados com solução Hematoxilina - Eosina para aferição das áreas seccionais transversas dos miócitos (ASM).

Utilizamos para esta análise o 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). Foram mensuradas de 30 a 50 células por ventrículo para a realização do cálculo da área.

9. Análise estatística

Os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão, no caso de variáveis com distribuição normal e mediana e percentis 25% e 75%, no caso das variáveis com distribuição não normal. As comparações entre os grupos foram efetuadas por teste *t* de Student, para variáveis com distribuição normal e teste de Mann-Whitney, para variáveis com distribuição não normal. O nível de significância adotado foi de 5% para todas as análises.

RESULTADOS

1. Características gerais e morfológicas

Os animais tiveram a ingestão da ração controlada diariamente e foram pesados semanalmente. O ganho de peso médio por grupo e consumo de ração estão representados na tabela 1.

Ambos os grupos apresentaram peso corporal semelhante no início do protocolo experimental e mantiveram ingestão de ração média diária semelhante desde o início do protocolo experimental.

Os dados morfométricos analisados estão apresentados na tabela 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas variáveis estudadas.

2. Análise da área de miocárdio infartado

A área de isquemia miocárdica esta representada na figura 1. Não observamos diferença estatisticamente significativa na área isquêmica do miocárdio entre os grupos controle e açaí.

3. Estresse oxidativo

A suplementação de açaí promoveu menor concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídio e observamos maior atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no miocárdio dos animais que receberam açaí (tabela 3).

4. Metabolismo energético e cadeia respiratória mitocondrial

Os dados referentes ao metabolismo energético e cadeia respiratória mitocondrial estão apresentados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

A suplementação de polpa de açaí promoveu menor atividade das enzimas lactato desidrogenase e fosfofrutoquinase; e maior atividade das enzimas β -hidroxiacil-coenzimaA desidrogenase, citrato sintase e piruvato desidrogenase.

Com relação à cadeia respiratória mitocondrial observamos maior atividade do complexo I, complexo II e ATP sintase no grupo suplementado com açaí.

5. Western blot

A expressão de proteínas envolvidas na via do estresse oxidativo está apresentada na tabela 6. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do NF- κ B total e fosforilado, FOXO1 total e acetilada, SIRT1 e Nrf-2. Bem como não observamos diferenças nas relações da NF- κ B fosforilado/total ou FOXO1 acetilada/total.

6. Estudo do coração isolado

A figura 2 representa o volume inicial do balão, a pressão sistólica máxima atingida e a derivada pressão-tempo negativa e positiva do grupo controle e açaí-depois da realização da isquemia/reperfusão. Não houve diferença entre os grupos no volume inicial do balão, na pressão sistólica máxima atingida e na função sistólica, representada pela derivada positiva.

Os animais que receberam açaí apresentaram pior função diastólica, representada pela derivada negativa, quando comparados aos animais que não receberam.

As áreas sob as curvas das relações pressão-volume diastólicas não diferiram entre os grupos como mostra a Figura 3.

7. Histologia

A avaliação histológica do tecido cardíaco esta apresentada na tabela 7.

Não observamos diferença entre os grupos controle e açaí em relação a área seccional do miócito.

DISCUSSÃO

Neste estudo sobre influência da suplementação de polpa de açaí no modelo experimental de isquemia global-reperfusão miocárdica em ratos pudemos observar que a suplementação de açaí melhorou o estresse oxidativo e o metabolismo energético miocárdico. No entanto, a suplementação de açaí piorou a função diastólica do ventrículo esquerdo e não interferiu na função ventricular esquerda sistólica e nem na porcentagem de área infartada.

A lesão por isquemia-reperfusão miocárdica é uma das principais causas de morte em todo o mundo e continua sendo uma doença para a qual as terapias clínicas atuais são surpreendentemente deficientes. Embora a produção de espécies reativas de oxigênio seja um fator de danos nos tecidos após a reperfusão, os mecanismos precisos subjacentes à produção de EROs permanecem indefinidos (54).

A lesão irreversível do miocárdio progride com o aumento da duração da isquemia, portanto, a restauração rápida do fluxo sanguíneo para a área isquêmica, por meio de intervenção coronariana percutânea primária ou trombólise, é essencial para salvar o miocárdio viável. A reperfusão, no entanto, pode induzir a morte de cardiomiócitos independentemente do episódio isquêmico por um processo conhecido como lesão de reperfusão (54). A diminuição da lesão de reperfusão é, portanto, um alvo-chave na batalha para preservar a função cardíaca em pacientes com Infarto agudo do miocárdio. Apesar desta clara necessidade, não há atualmente nenhuma terapia eficaz para a prevenção da lesão de reperfusão disponível (55-57).

Durante a isquemia-reperfusão ocorrem alterações no metabolismo celular como, por exemplo, a liberação de citocinas, interação entre leucócitos e células endoteliais e produção de radicais livres (54). A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons; ativação de genes; fertilização do óvulo e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. No entanto, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (58).

As espécies reativas, incluindo os radicais livres, são gerados a partir de várias fontes exógenas, como tabagismo, poluentes, drogas, dietas

excessivamente calóricas, excesso de exercícios físicos, pesticidas e solventes industriais; e fontes endógenas, como a inflamação. Porém, o metabolismo energético (mais precisamente a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons) constitui uma das fontes mais importantes de geração desses radicais (59).

De maneira geral, as alterações metabólicas na remodelação cardíaca levam a uma diminuição na produção de energia, menor utilização de ácidos graxos livres e maior utilização de glicose, além de alterações funcionais da mitocôndria, associadas à progressão da insuficiência cardíaca (60,61). Durante o período de isquemia, além da utilização de glicose como fonte de energia, o coração passa a produzir muito lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidratos e a atividade da LDH (62,63).

Em condições normais, os ácidos graxos correspondem a 60-90% do substrato utilizado para produção de energia no miocárdio. Porém, frente a uma agressão, a utilização preferencial de ácidos graxos pode se inverter pela utilização de glicose (64-66). Os ácidos graxos necessitam de mais oxigênio do que a glicose para gerar a mesma quantidade de ATP e a oxidação de ácidos graxos produz calor ao invés de ATP, e nesses casos de agressão, o aumento da oxidação dos ácidos graxos pode levar a um desperdício de oxigênio por gerar menos ATP por molécula de oxigênio, agravando ainda mais os danos ao coração (67).

A β -OH-acil CoA-DH é uma das principais enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos em acetil-CoA, que no ciclo do citrato irá formar ácido cítrico pela citrato sintase, e gerar NADH e FADH₂ para a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Quando há um comprometimento da cadeia de transporte de elétrons, ocorre um acúmulo de elétrons não-pareados, geração de espécies reativas de oxigênio e consequente aumento do estresse oxidativo, sendo a geração de ATP mitocondrial uma fonte importante de espécies reativas de oxigênio (41,68).

Neste estudo, os animais suplementados com açaí apresentaram menor atividade das enzimas lactato desidrogenase e fosfofrutoquinase e maior atividade das enzimas β -OH-acil CoA-DH, piruvato desidrogenase e citrato sintase. Com relação à cadeia respiratória mitocondrial observamos maior atividade do complexo I, complexo II e ATP sintase no grupo suplementado com açaí, o que

mostra uma melhora do metabolismo energético e da cadeia respiratória mitocondrial. Assim, a suplementação de açaí parece melhorar o metabolismo energético, com a observação do aumento da oxidação de ácidos graxos, do ciclo do citrato e diminuição da glicólise. Além da maior oxidação de ácidos graxos como substrato energético, também observamos menor atividade da fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase, que sugere menor utilização de glicose pelos miócitos, todas essas características de corações sem agressão. Estudo experimental realizado em modelo de lesão renal por isquemia-reperfusão em ratos também mostrou melhora do metabolismo energético com o uso de açaí (69).

Além disso, houve melhor funcionamento dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial nos animais suplementados com açaí, o que pode ter contribuído para a diminuição do estresse oxidativo. No presente estudo, a concentração de hidroperóxido de lipídeo foi avaliada como marcador de dano oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes como marcador de defesa antioxidante. Os animais suplementados com açaí não apresentaram aumento das concentrações miocárdicas de hidroperóxido de lipídeo em comparação com o grupo controle que recebeu dieta padrão. Desta forma, podemos afirmar que a administração de açaí atenuou o estresse oxidativo.

Estudos experimentais mostraram que o estresse oxidativo pode induzir remodelação cardíaca, afetando a matriz extracelular e proteínas contráteis por meio da lipoperoxidação, de danos ao DNA celular e da oxidação de proteínas (70). A lesão oxidativa dos lipídeos de membrana promove a formação de hidroperóxido de lipídeo. Isso tem como consequência o surgimento de transtornos da permeabilidade e alteração do fluxo iônico e do fluxo de outras substâncias, gerando perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular, pois o excesso de lipídio no interior da célula também faz com que ele penetre no endotélio arterial e se ligue à matriz extracelular (71).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, cujo objetivo é limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes e é dividido em enzimático e não-enzimático (12,13).

O sistema de defesa não-enzimático inclui os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. A avaliação do potencial antioxidante in vivo dos compostos não-enzimáticos depende de algumas variáveis: absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas; concentração plasmática ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; tipos de radicais livres gerados no processo oxidativo; como e em qual compartimento celular foram gerados. Os flavonóides são capazes de agir como antioxidantes, inativando radicais livres em ambos os compartimentos celulares, hidrofílico e lipofílico (58).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (72,73) e a atividade antioxidante do açaí é relacionada com compostos bioativos, como a vitamina C, carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos, presentes em sua composição. Estudos in vitro e in vivo mostram que as antocianinas podem atenuar o estresse oxidativo envolvido no processo aterosclerótico, sendo que vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo, como a capacidade das antocianinas de inibir a oxidação do LDL e reduzir a injúria oxidativa das células endoteliais vasculares (74).

Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das espécies reativas podem ser prevenidos pelo sistema enzimático (75). Dentre as enzimas antioxidantes, podemos destacar a CAT, a SOD, a GSH-Px. A GSH-Px é uma enzima antioxidante que catalisa a redução do H₂O₂ e hidroperóxidos e também previne a formação de outros radicais tóxicos (76,77). A SOD converte o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que posteriormente é convertido em água pela CAT e GSH-Px, e é considerada a primeira linha de defesa para proteger a mitocôndria contra os efeitos deletérios dos radicais superóxido em condições fisiológicas e patológicas (78). Durante a isquemia ocorre redução das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Assim como ocorre aumento da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), xantina oxidase, citocromo P450 e ciclooxigenase (79), os quais também são sistemas geradores de EROs e nitrogênio, que contribuem para o aumento do estresse oxidativo no infarto do miocárdio.

Logo, o estresse oxidativo pode ser um mecanismo importante no processo de remodelação cardíaca (15,75,80), pois pode levar a alterações no metabolismo energético, lipoperoxidação e consequente mudança na membrana celular, além de poder participar de vias de sinalização celular como as de hipertrofia e de apoptose (81). Em relação às proteínas envolvidas na regulação da via do estresse oxidativo, os mecanismos pelos quais compostos dietéticos fenólicos atuam na prevenção de patologias degenerativas já foram, parcialmente, estudados. As complexas interações entre estas moléculas dietéticas e seus alvos moleculares ativam vias de sinalização da resposta celular, entre elas a via de sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B), a proteína ativadora 1, enzimas de detoxificação de fase 2 e Nrf2, além da via de sinalização das MAPKs (82).

O NF- κ B é considerado um importante fator transcricional relacionado tanto ao estresse oxidativo quanto ao processo inflamatório. Estudo realizado com células endoteliais humanas, mostra que a administração de licopeno reduziu a ativação do NF- κ B e a expressão da molécula de adesão intercelular 1 via redução de TNF- α (83). Em relação ao açaí, o tratamento com esse fruto inibiu a expressão de moléculas de adesão e a ativação do fator NF- κ B após indução de inflamação por lipopolissacarídeo (84).

É importante ressaltarmos que o Nrf2 é um dos mais importantes reguladores da produção de enzimas antioxidantes. O Nrf2 é um fator presente no citoplasma celular que atua na resposta primária à citotoxicidade e ao estresse oxidativo. Ele se liga ao elemento de resposta antioxidante no DNA estimulando a transcrição de diversas enzimas antioxidantes, entre elas a superóxido dismutase, a catalase e a tiorredoxina. Frente à agressão, o Nrf2 se dissocia da proteína Keap1 e vai até o núcleo onde estimula a produção de proteínas antioxidantes e então codifica proteínas como glutatona, glutatona peroxidase e tiorredoxina. Depois de atuar no núcleo, ele volta ao citoplasma onde é degradado (70,85).

Um outro regulador do equilíbrio celular é a proteína SIRT1 que pode atuar em várias funções celulares, incluindo apoptose, biogênese mitocondrial, inflamação, metabolismo de glicose/lipídios, autofagia e adaptações ao estresse celular, através da desacetilação das proteínas alvo. A forma desfosforilada da FOXO1, distribuída no núcleo, é desacetilada pela SIRT1, aumentando a expressão de genes gliconeogênicos (86). A FOXO é um fator de transcrição conhecido por seu papel nas respostas celulares ao estresse ambiental e fisiológico. A condição de estresse oxidativo na célula induz várias respostas fisiológicas e patológicas. Estas respostas, em última análise, causam mudanças no perfil transcricional de forma a influenciar o destino da célula e a progressão de uma doença. A atividade das proteínas FOXO é regulada por modificação pós-transcricional, incluindo a fosforilação. O aumento da atividade transcricional de FOXO aumenta a expressão gênica de catalase e superóxido dismutase aumentando a detoxificação de EROs (87).

Apesar das alterações observadas nas enzimas antioxidantes, a suplementação de açaí não influenciou a expressão miocárdica do fator transcricional Nrf2, da FOXO1, NF- κ B e SIRT1. Talvez esse resultado possa ser explicado devido ao protocolo utilizado neste estudo, em que a isquemia e a reperfusão são analisadas de forma aguda e, assim, não houve tempo suficiente para o insulto isquêmico e de reperfusão estimular a transcrição proteica. Além disso, as vias de regulação dessas proteínas são múltiplas e complexas, e também podem ser cíclicas, e a expressão proteica pode variar a depender do órgão a ser estudado e do momento em que o mesmo é estudado (21). Cabe também considerar que o fato da suplementação ter ocorrido de forma preventiva, e como o açaí fornece elementos antioxidantes em abundância, não houve necessidade de aumentar a transcrição enzimática neste grupo.

Com relação à área infartada, uma isquemia de curta duração seguida de reperfusão acarreta atordoamento miocárdico. Se a oclusão coronariana tem duração superior a 20 minutos, com o passar do tempo, uma frente de onda de necrose progride desde o subendocárdico até o subpericárdico (88). Conforme o esperado para período de 30 minutos de isquemia, observamos grande área infartada em nosso estudo, sendo de aproximadamente 50% em

ambos os grupos. Contrariando nossa hipótese, a suplementação de açaí não foi capaz de reduzir o tamanho do infarto.

Importantes implicações clínicas relacionadas à disfunção miocárdica podem ocorrer pela duração da isquemia ou pelo coração atordado, que ocorre quando a isquemia não resulta em morte celular. Quando a duração da isquemia miocárdica aumenta, a disfunção contrátil pode ser o resultado de combinações de processos reversíveis e irreversíveis, como a morte celular. Uma série de processos metabólicos e enzimáticos são afetados, as reservas de ATP são rapidamente depletadas, ocorre um acúmulo de lactato, o pH da célula torna-se ácido e são ativadas proteases intracelulares. A apoptose é um processo ativo cuja marca é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases que quando ativadas comprometem a integridade do citoesqueleto, provocando colapso da estrutura celular. Além disso, o aumento da permeabilidade capilar causa edema tissular (13,38).

O aumento do estresse oxidativo leva a uma alteração na permeabilidade da membrana plasmática dos miócitos, redução da função sistólica, mudança na atividade de bombas iônicas na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático e também a alteração trânsito intracelular de cálcio (13,38). O cálcio é fator essencial para a contração muscular e qualquer alteração em seu trânsito pode levar a déficits contráteis. A reperfusão pode resultar em maior lesão tecidual, o que é mediado principalmente pelas espécies reativas de oxigênio (89). O estresse oxidativo no sistema cardiovascular predispõe a lesões graves nos cardiomiócitos e vasos cardíacos, alterando os mecanismos de contração e relaxamento, tendo como consequência sua desadaptação e déficit de função (90).

Em nosso estudo foi utilizado o método de estudo do coração isolado, descrito por Langendorff, para avaliação da função cardíaca. Dentre as variáveis avaliadas por esse método encontra-se a derivada pressão-tempo negativa que está relacionada à função diastólica, e a derivada pressão-tempo positiva que se relaciona com a função sistólica. Diferentemente da nossa hipótese, neste estudo observamos que a suplementação de açaí não interferiu com a função sistólica e piorou a função diastólica dos corações submetidos à

isquemia global-reperfusão. Apesar da suplementação do açaí diminuir o estresse oxidativo quando comparado ao grupo não suplementado, essa melhoria não resultou em melhora de função. Este resultado é bastante surpreendente já que vários estudos anteriores relacionam a deterioração da função cardíaca neste modelo ao aumento do estresse oxidativo. Isso nos leva a inferir que a disfunção ventricular observada nesse modelo depende de outros mecanismos que não o dano oxidativo.

Não conseguimos explicar o motivo pelo qual a suplementação de açaí piorou a função diastólica em nosso estudo, no entanto, as mudanças no metabolismo energético podem ter contribuído para esse resultado. A mudança do metabolismo energético que ocorre em situações de estresse tem um papel protetor no miocárdico. O fato da suplementação de açaí impedir o uso da glicose e favorecer a manutenção do metabolismo miocárdico próximo ao normal pode ter interferido negativamente com esse mecanismo adaptativo protetor. Outro potencial mecanismo que pode estar envolvido na regulação da função cardíaca é o trânsito de cálcio. O cálcio é importante para o relaxamento miocárdico; nas situações de isquemia, há disfunção dessas proteínas, levando à diminuição da concentração de cálcio e conseqüente piora da função cardíaca. O fato de não termos estudado o trânsito de cálcio é uma das limitações de nosso estudo.

Outro ponto a ser destacado é que, apesar da popularidade do uso de preparações de coração isolado de ratos para estudos de lesão de isquemia-reperfusão, muitos protocolos diferentes têm sido empregados com variações na duração da isquemia e do grau do distúrbio metabólico provocado, o que torna difícil comparar a gravidade dos protocolos (88).

Dessa forma, apesar da suplementação de açaí atenuar o estresse oxidativo e melhorar o metabolismo energético cardíaco, não houve diminuição da área infartada, nem tampouco observamos melhora da função cardíaca com a suplementação de açaí, o que nos leva a crer que o estresse oxidativo e o metabolismo energético não são os principais mecanismos envolvidos na disfunção ventricular neste modelo estudado.

CONCLUSÃO

A suplementação de açaí não foi capaz de diminuir a área infartada ou melhorar a função ventricular esquerda no modelo de isquemia global/reperfusão, apesar de melhorar o metabolismo energético cardíaco e atenuar o estresse oxidativo miocárdico, sugerindo que esses mecanismos podem não ser os principais determinantes da disfunção cardíaca observada durante a isquemia e reperfusão.

TABELAS E FIGURAS

TABELAS

Tabela 1. Peso corporal inicial, final e consumo de ração diário.

	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
Peso inicial (g)	274 ± 14,6	281 ± 11,2	0,274
Peso final (g)	468 ± 28,8	448 ± 39,6	0,225
Consumo de ração/dia (g)	26,1 ± 2,15	26,6 ± 1,77	0,246

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valor de p: teste t.

Tabela 2. Peso dos órgãos

	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
VE (g)	1,03 ± 0,09	1,02 ± 0,07	0,934
VD (g)	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,431
Fígado (g)	14,4 ± 1,60	12,9 ± 2,57	0,154
Pulmão (g)	1,62 ± 0,18	1,54 ± 0,18	0,359

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valor de p: teste t.

Tabela 3. Atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
CAT (µmol/g tecido)	58,5 ± 6,42	70,0 ± 8,85	0,005
SOD (nmol/mg proteína)	5,68 ± 0,39	8,09 ± 0,71	<0,001
GSH-Px (nmol/mg tecido)	20,2 ± 3,32	32,8 ± 4,66	<0,001

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutatona peroxidase. Valor de p: teste t.

Tabela 4. Metabolismo energético

Variáveis	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
β-OH-acil CoA-DH (nmol/mgPt)	19,8 ± 3,25	49,8 ± 6,98	<0,001*
Fosfofrutoquinase (nmol/gtecido)	181 (160 - 228)	72,9 (67,3 - 81,9)	<0,001#
Lactato desidrogenase (nmol/mgPt)	147 (145 - 167)	69,6 (64,8 - 76,6)	<0,001#
Piruvato Desidrogenase (nmol/gtecido)	114 ± 10,9	176 ± 18,9	<0,001*
Citrato sintase (nmol/mgPt)	30,4 (30,1-36,7)	99,8 (80,7-117)	<0,001#

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25%-75%. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valor de p: *teste t ou #Mann-Whitney.

Tabela 5. Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
ATP Sintase (nmol/mgPt)	22,0 ± 3,88	44,5 ± 6,59	<0,001
Complexo 1 (nmol/mgPt)	3,73 ± 0,95	7,96 ± 1,74	<0,001
Complexo 2 (nmol/mgPt)	2,10 ± 0,61	3,52 ± 0,46	<0,001

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valor de p: teste t.

Tabela 6. Expressão das proteínas da via do estresse oxidativo

	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
FOXO1 acetilada	82,0 ± 9,03	84,6 ± 8,81	0,522
FOXO1 total	87,6 ± 4,76	85,5 ± 3,25	0,287
FOXO1 total\acetilada	1,19 ± 0,23	1,19 ± 0,21	0,974
NF-κB fosforilado	76,6 ± 10,7	80,5 ± 10,9	0,446
NF-κB total	0,99 (0,95 - 1,03)	0,96 (0,63 - 1,04)	0,540
NF-κB total\fosforilado	1,160 ± 0,343	1,039 ± 0,366	0,470
Nrf-2	1,00 (1,00 - 1,01)	1,00 (0,99 - 1,00)	0,131
SIRT1	93,8 ± 1,47	92,6 ± 1,94	0,151

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. FOXO1:proteína forkhead 1; SIRT1:sirtuína 1; NF-κB: nuclear factor kappa B. Valor expresso em unidade arbitrária. Nrf-2: fator nuclear eritróide 2. Valor de p: teste t e mann-whitney

Tabela 7. Análise histológica no miocárdio do VE

	Grupo Controle (n= 9)	Grupo Açai (n=10)	p
Área seccional dos miócitos	48395 ± 6679,4	46232 ± 5663,5	0,455

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valor de p: teste t.

FIGURAS

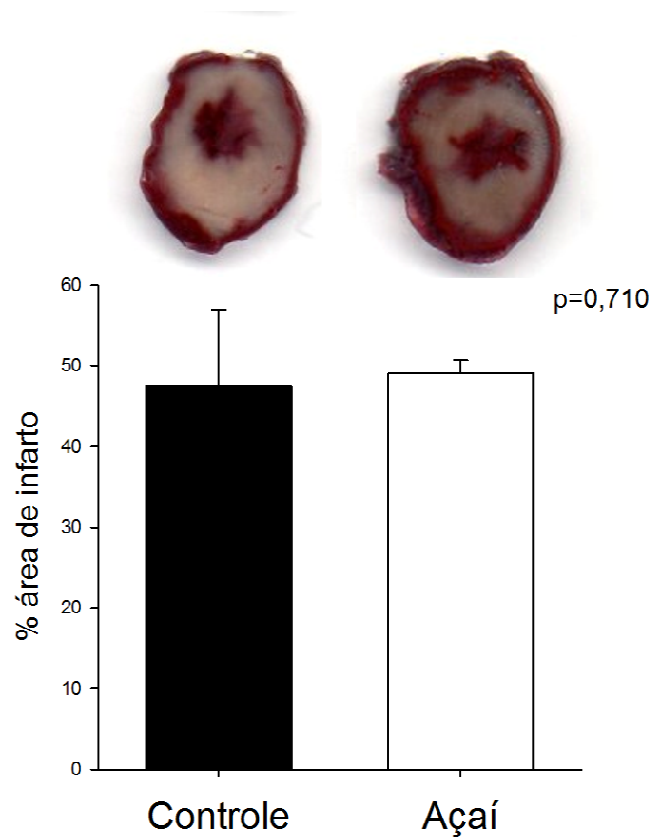


Figura 1. Área de miocárdio infartado

A figura mostra cortes seccionais do ventrículo esquerdo corados com cloreto de trifêniltetrazólio. A área corada em vermelho representa o miocárdio viável e a área não corada (branca) corresponde à área infartada. A área de miocárdio infartado esta apresentada em porcentagem da área total de miocárdio à planimetria. Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valor de p: teste t.

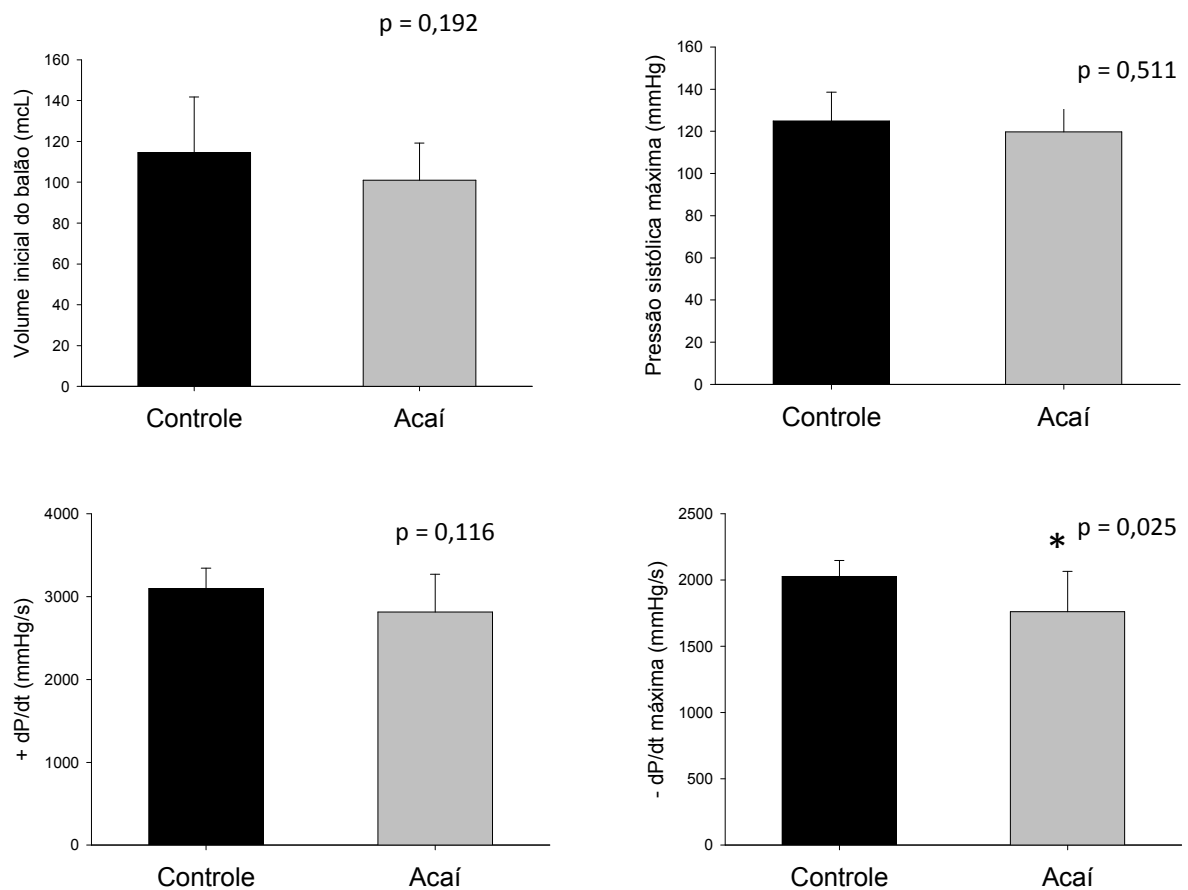


Figura 2. Estudo do coração isolado

Grupo controle: consumo de ração padrão; Grupo açaí: consumo de ração padrão acrescida de açaí 5%; -dP/dt (derivada negativa máxima): representa a função diastólica; +dP/dt (derivada positiva máxima): representa a função sistólica. Valores de p: teste t; *representa diferença estatisticamente significante entre os grupos.

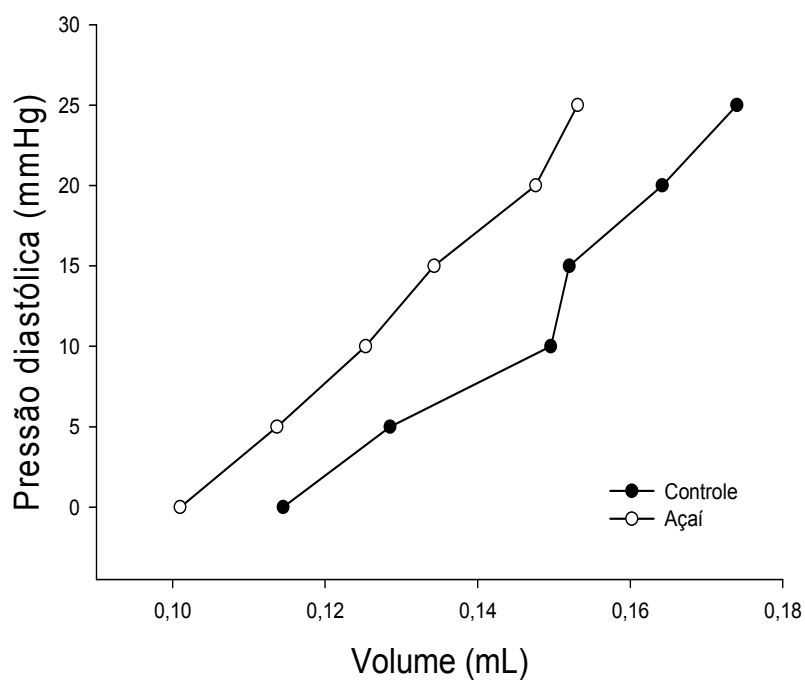


Figura 3. Relação Pressão diastólica e volume

Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Foram analisadas as inclinações das curvas e calculadas as áreas sob as curvas para realização das análises. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para ambas as análises.

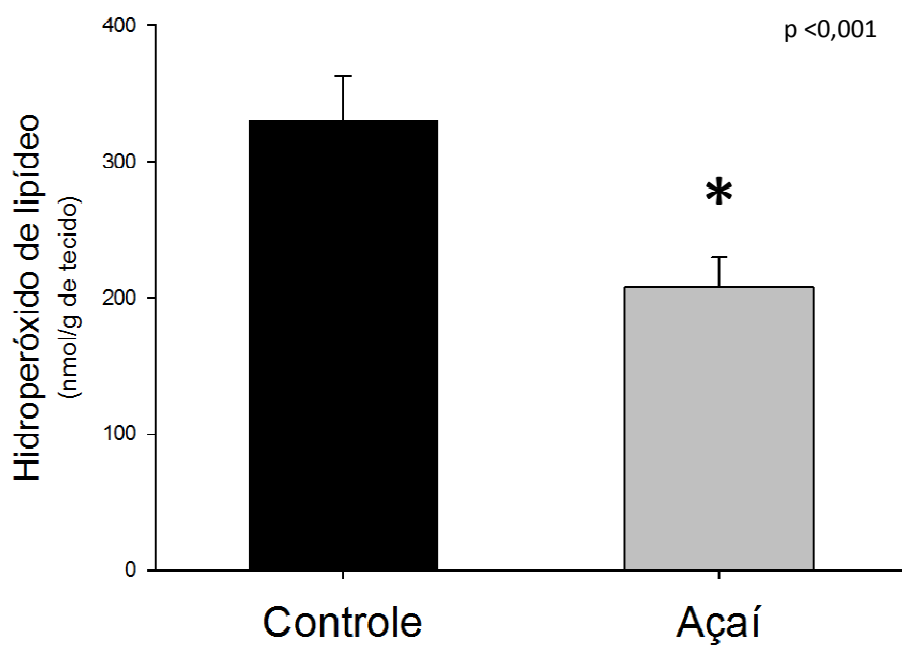


Figura 4. Hidroperóxido de lipídio

Grupo controle: consumo de ração padrão. Grupo açai: consumo de ração padrão acrescida de açai 5%. Valores de p: teste t.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde, Secretaria Executiva. DATASUS. Informações de saúde. Morbidade e informações epidemiológicas. [Acesso em 2017 jan 03]. Disponível em: www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203.
2. Organization. WH. Cardiovascular disease. 2013; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
3. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66(6):1146-1149.
4. Kals J, Starkopf J, Zilmer M, et al. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. *Int J Cardiol*. 2008;125(1):133-135.
5. Castella M, Buckberg GD, Saleh S. Diastolic dysfunction in stunned myocardium: a state of abnormal excitation-contraction coupling that is limited by Na⁺-H⁺ exchange inhibition. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;29(1):107-114.
6. Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T, et al. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation*. 2004;62(1):97-106.
7. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*. 1999;79(2):609-634.
8. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 1981;30(3):235-241.
9. Diniz YS, Rocha KK, Souza GA, et al. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;543(1-3):151-157.
10. Borges JP, Lessa MA. Mecanismos Envolvidos na Cardioproteção Induzida pelo Exercício Físico: Uma Revisão Sistemática. *Arq Bras Cardiol*. 2015; 105(1):71-81.
11. Rodrigues RB, Lichtenthaler R, Zimmermann BF, et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (acai) seeds and identification

- of their polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2006;54(12):4162-4167.
12. Martins GF, Siqueira Filho AG, Santos JBF et al. Trimetazidine on ischemia and reperfusion in CABG. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 97(3): 209-216.
 13. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201-1206.
 14. Howden R. Nrf2 and cardiovascular defense. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013: 1-10.
 15. Chong ZZ, Wang S, Shang YC, Maiese K. Targeting Cardiovascular Disease with Novel SIRT1 Pathways. *Future Cardiol.* 2012; 8(1):89-100.
 16. Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling.* 2011; 9(11):1-8.
 17. Purdom-Dickinson SE, Lin Y, Dedek M, et al. Induction of antioxidant and detoxification response by oxidants in cardiomyocytes: evidence from gene expression profiling and activation of Nrf2 transcription factor. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(1):159-176.
 18. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, et al. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(4):576-586.
 19. Xu B, Zhang J, Strom J, et al. Myocardial ischemic reperfusion induces de novo Nrf2 protein translation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(9):1638-1647.
 20. da Silva Santos V, Bisen-Hersh E, Yu Y, et al. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(7):390-404.

21. Kumar R, Yong QC, Thomas CM. Do multiple nuclear factor kappa B activation mechanisms explain its varied effects in the heart? *Ochsner J.* 2013;13(1):157-165.
22. Kitamura T, Kitamura YI, Funahashi Y. A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2477-2485.
23. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature.* 2002;419(6904):316-321.
24. Zhu YZ, Huang SH, Tan BK, et al. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Natural product reports.* 2004;21(4):478-489.
25. Schauss AG, Wu X, Prior RL, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem.* 2006;54(22):8598-8603.
26. Schauss AG, Wu X, Prior RL, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem.* 2006;54(22):8604-8610.
27. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine.* 2012;19(3-4):262-269.
28. Souza MO, Silva M, Silva ME, et al. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2010;26(7-8):804-810.
29. Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, et al. Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(4):855-863.

30. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, et al. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by acai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012;67(3):235-241.
31. Guerra JF, Magalhaes CL, Costa DC, et al. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49(3):188-194.
32. Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):2928-2935.
33. Santos GM, Maia GA, Sousa PH, et al. Correlation between antioxidant activity and bioactive compounds of acai (*Euterpe oleracea* Mart) comercial pulps. *Arch Latinoam Nutr.* 2008;58(2):187-192.
34. Wu X, Schauss AG. Mitigation of inflammation with foods. *J Agric Food Chem.* 2012;60(27):6703-6717.
35. Spada PD, Dani C, Bortolini GV, et al. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *J Med Food.* 2009; 12(5):1084-1088.
36. Zapata SG, Silva JS, Pereira SL, et al. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (acai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14(1):227.
37. Silva TLTB, Mota MM, Fontes MT, et al. Suplementação com L-arginina associada ao exercício resistido melhora a força muscular e impede o aumento da glicemia de ratos diabéticos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 2013; 12(1):89-93.
38. Chen WP, Su MJ, Hung LM. In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. *Eur J Pharmacol.* 2007;554(2-3):196-204.

39. Varadi J, Lekli I, Juhasz B, et al. Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sci.* 2007;80(17):1619-1626.
40. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2013;58:68-76.
41. Carvalho PB, Gonçalves AF, Alegre PHC, et al. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 40 (3-4): 431-442.
42. Zornoff LAM, Tornero MTT, Carvalho MSS, et al. Influência do acréscimo de manitol à solução nutriente no desempenho mecânico e no grau de edema miocárdico de corações isolados de ratos. *Arq Bras Cardiol.* 1995;64(3):225-229.
43. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):940-950.
44. Almeida EA, Ozaki MR, Souza ML. Inibidores da enzima de conversão da angiotensina e infarto agudo do miocárdio. Estudo experimental em ratos. *Rev Bras Clin Med.* 2009;7:393-397.
45. Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, et al. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenalectomized rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(6):827-833.
46. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1996;328(2):309-316.

47. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, et al. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *European journal of biochemistry/FEBS*. 1969;10(2):198-206.
48. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alphaslycerophosphate dehydrogenases. *Methods of biochemical analysis*. 1974;22:123-175.
49. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985;153(1):23-36.
50. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, et al. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;333(1):145-151.
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. Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *European journal of heart failure*. 2006;8(8):784-789.
53. Castardeli EPS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84:320-324.
54. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C, et al. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 2016; 111: 134-141.
55. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, et al. The Na⁺/H⁺ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the Evaluation of the Safety and Cardioprotective Effects of Eniporide in Acute Myocardial Infarction (ESCAMI) Trial. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1645-1650.

56. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men. *JAMA*. 2008;300:2123-2133.
57. Najjar SS, Rao SV, Melloni C, et al. Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011;305:1863-1872.
58. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios *Rev. Nutr.* 2010; 23(4):629-643.
59. Martinelli FN, Franco FM. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc. Cult.* [online]. 2014;66(3):54-57.
60. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *The American journal of medicine.* 2001;110(7):37-46.
61. Mei Z, Wang X, Liu W, et al. Mitochondrial adaptations during myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic constriction. *Cardiovascular pathology:the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* 2014;23(5):283-288.
62. Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology.* 1974;36:413-459.
63. Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FL. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation.* 1993;87(3):881-892.
64. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF. Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation.* 2002;105(2):140-142.
65. Saks V, Favier R, Guzun R, et al. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *The Journal of physiology.* 2006;577(3):769-777.
66. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews.* 2005;85(3):1093-1129.

67. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, et al. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiology in review*. 2013;21(3):135-140.
68. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VC, Polegato BF, et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. *PloS one*. 2014;9(12):1137-1139.
69. Morsy EM, Ahmed MA, Ahmed AA. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by acai extract preconditioning in a rat model. *Life sciences*. 2015;123:35-42.
70. Rajasekaran NS, Varadharaj S, Khanderao GD, et al. 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(6):957-971.
71. Pi J, Bai Y, Reece JM, et al. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:1797-1806.
72. Xie C, Kang J, Li Z, et al. The acai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF-alpha and IL-6 production through inhibiting NF-kappaB activation and MAPK pathway. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(9):1184-1191.
73. Pozo DI, Percival SS, Talcott ST. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(4):1222-1229.
74. Cardoso M, Leite JPV, Peluzio MCG. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*. 2011; 40(1): 116-138.
75. Deel ED, Lu Z, Xu X, et al. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(7):1305-1313.

76. Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, et al. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Heart Lung Circ.* 2004;13(2):132-138.
77. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *AJP Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):2181-2190.
78. Das KC, Muniyappa H. Age-dependent mitochondrial energy dynamics in the mice heart: role of superoxide dismutase-2. *Experimental gerontology.* 2013;48(9):947-959.
79. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & therapeutics.* 2012;133(2):230-255.
80. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free radical biology & medicine.* 2013;61:473-501.
81. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, et al. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2002;34(4):379-388.
82. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009; 26(8):1001-1043.
83. Hung CF, Huang TF, Chen BH, et al. Lycopene inhibits TNF- α -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur J Pharmacol.* 2008;586(1-3):275-282.
84. Noratto GD, Morales AG, Talcott ST, et al. Polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 (14):7999-8012.

85. Bai H, Wang Z, Cui J, et al. Synergistic Radiation Protective Effect of Purified *Auricularia auricular-judae* Polysaccharide (AAP IV) with Grape Seed Procyanidins. *Molecules*. 2014;19(12):20675-20694.
86. Albertoni G, Schor N. Resveratrol desempenha importante papel no mecanismo de proteção na doença renal - mini-revisão. *J Bras Nefrol* 2015;37(1):106-114
87. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 125:376-393.
88. Robbins e Cotran: *Patologia - Bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.
89. Oliveira UO, Oliveira AR, Kucharski LC, et al . Efeitos da angiotensina-I e isquemia na recuperação funcional em corações isolados. *Arq Bras Cardiol* 2011;97(5):390-396.
90. Cantor EJ, Mancini EV, Seth R, et al. Oxidative stress and heart disease: cardiac dysfunction, nutrition, and gene therapy. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5(3):215-220.