

Priscila Portugal dos Santos

**Influência da Suplementação de Dieta com
Diferentes Doses de Vitamina D sobre Variáveis
Cardíacas em Ratos**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Alberto Rupp de Paiva

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo A. M. Zornoff

Botucatu

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu -
UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB
8/4716

Santos, Priscila Portugal dos.

Influência da suplementação de dieta com diferentes doses
de vitamina D sobre variáveis cardíacas em ratos / Priscila
Portugal dos Santos. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva

Co-orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Capes: 40501000

1. Vitamina D - Efeito fisiológico. 2. Coração - Efeito das
drogas.

Palavras-chave: Citocinas; Coração; Ratos; Remodelação
Cardíaca; Vitamina D

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

À toda minha família

Que soube compreender todos os momentos em que estive ausente. Obrigada pelos constantes incentivos e torcida pelo meu futuro.

Vocês são essenciais!

Aos meus pais Cássia e Osvaldo

Por toda minha formação. Obrigada por terem me incentivado seguir este caminho e nunca desistir.

Amor eterno!

Aos meus irmãos Lucas e Carolina

Por toda amizade carinho e apoio!

Ao meu namorado Ricardo

Que faz com que meus dias sejam como sempre sonhei e a quem agradeço todo carinho e incentivo

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A ***Deus***, por minha vida, pela saúde, oportunidades e pelo convívio com pessoas sensacionais!

Ao meu orientador ***Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva***, pela oportunidade, pelo conhecimento e pelos preciosos ensinamentos, incentivo, carinho e por nunca deixar de acreditar que tudo iria dar certo.

Ao meu co-orientador ***Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff*** e aos amigos do grupo de pesquisa ***Paula, Marcos, Bertha e Meliza*** pela disponibilidade e ensinamentos.

Às amigas de jornada ***Heloisa, Bruna e Lidiane***, que compartilharam das mesmas dificuldades e expectativas.

Aos técnicos do laboratório experimental ***Corina e Mário***, por toda ajuda e colaboração.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do laboratório *Adriana, Aline, Beatriz, Camila Bonomo, Cmila Rosa, Carlos, Daniele, Danielle, Diego, Dijon, Juliana, Loreta, Marcelo, Maria Tereza, Miriane, Paula, Paulinha e Regiane*, por todos os momentos juntos.

Ao amigo *Hélio* pelos seus ensinamentos, por me fazer entender e gostar de estatística e pelo carinho.

À *Jacira, Rafael, Juninho e Felipe* por terem me acolhido como parte da família.

Aos funcionários *Fernanda, Sandrinha, Márcia e Sueli Garcia* por toda ajuda e amizade.

À *Siumere, Bardela e Fernanda Minicucci* pela colaboração neste trabalho.

Às professoras: *Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi e Dra. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli* por todo conhecimento, paciência e exemplo profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica: *Alexandre Luís Loureiro, Ana Maria Mengue, Bruno José Fajiolli, Elisangela Aparecida da Silva, Laura Andrade Câmara, Mario Augusto Dallaqua e Renato Borges Pereira*, pela atenção e disponibilidade em todo auxílio requisitado.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: *Andréa Paula Longo Devidé, Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Lílian Cristina Nadal Bianchi Nunes, Nathanael Pinheiro Salles e Regina Célia Spadin* pela atenção e por todo auxílio.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental: *José Carlos Georgete, Camila, De Lalla, Elenize, José Aparecido, Ângelo, Rogério, Sueli Clara, Marta e Vitor* pelo bom relacionamento ao longo destes anos.

Aos Professores: *Dr. Katashi Okoshi, Dra. Marina Politi Okoshi, Dr. Luiz Shiguero, Dra. Beatriz Bojikian Matsubara, Dr. Antônio Carlos Cicogna e Dra. Ana angélica Henrique Fernandes* pela colaboração profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (processo 2008/56489-0), viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que fizeram parte da minha vida, contribuindo para minha formação profissional e pessoal.

Muito Obrigada!

Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.
Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
e o outro vê uma prova para sua paciência...
Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do
companheiro...
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.
"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

Resumo	12
Abstract.....	15
Introdução	18
Material e Métodos	31
Resultados	40
Discussão	66
Conclusão	74
Referências	76

RESUMO

A frequência de hipovitaminose D é alta na população. A deficiência de vitamina D tem sido considerada problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Além disso, a deficiência dessa vitamina está associada com o aumento do risco de várias doenças crônicas. Assim, está ocorrendo uso indiscriminado de vitamina D sem conhecer ao certo seus efeitos adversos. Estudos mostraram que essa vitamina é importante para o desenvolvimento e funcionamento adequado do coração. A deficiência de vitamina D provoca remodelação cardíaca enquanto que a suplementação de vitamina D, em modelos de agressão, atenua a remodelação. Porém pouco se sabe sobre sua influência no coração normal. O objetivo foi verificar se a suplementação com diferentes doses de vitamina D₃ na dieta promove remodelação cardíaca com alterações na estrutura, na função, no metabolismo energético e nos moduladores inflamatórios do coração normal de ratos Wistar. Para isso foram utilizados 86 ratos machos, alocados em quatro grupos: Controle (C, n=21) recebeu dieta padrão; 3D (n=22), 5D (n=22) e 10D (n=21) receberam 3.000, 5.000 e 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta respectivamente. Após dois meses foi realizada a pressão arterial caudal e o estudo ecocardiográfico. Os animais foram eutanasiados, o soro e o ventrículo esquerdo foram utilizados para análises bioquímicas. Para análise estatística foi realizado ANOVA de 1 via e pós teste de Tukey ou Kruskal Wallis e pós teste de Dunn. Para avaliar a resposta dose dependente foi utilizado o teste de tendência (correlação de Spearman). As concentrações séricas de cálcio e fósforo foram maiores no grupo 5D e 10D em relação ao C. A pressão caudal foi maior nos grupos 3D e 10D em relação ao C e apresentou aumento dose dependente. A concentração sérica de 25 (OH) D₃ foi maior no grupo 5D em relação aos outros grupos e foi maior no grupo 10D em relação ao controle. Não houve diferenças em variáveis ecocardiográficas de morfologia e de função cardíaca. Em relação às enzimas do metabolismo energético cardíaco, a atividade da enzima β hidroxil Coenzima A desidrogenase foi menor nos grupos 5D e

10D em relação aos outros grupos e a atividade da enzima lactato desidrogenase foi menor no grupo 5D em relação ao grupo controle e foi maior no grupo 10D em relação aos outros grupos. A diminuição da atividade da β hidroxilacil Coenzima A desidrogenase foi dose dependente. Os mediadores inflamatórios TNF- α , INF- γ , IL-10 e ICAM-1 foram maiores no grupo 10D em relação aos outros grupos e o aumento desses mediadores inflamatórios foi dose dependente. Assim, podemos concluir que ratos normais suplementados com vitamina D₃ não apresentam remodelação cardíaca, porém apresentam maiores valores de pressão sistólica, maiores valores de mediadores inflamatórios no coração e alteração na utilização de substrato energético cardíaco. A perpetuação desses achados pode acarretar alterações estruturais e funcionais no coração. A maior parte das alterações observadas é dose dependente.

ABSTRACT

Frequency of hypovitaminosis D in population is high and vitamin D deficiency has been considered a public health problem. Moreover, Vitamin D deficiency is associated with increased risk of many chronic diseases. Thus, it is widespread use of vitamin D without knowing its adverse effects. Studies have shown that this vitamin is important for cardiac development and functioning. Vitamin D deficiency results in cardiac remodeling and vitamin D supplementation in cardiac aggression models attenuates cardiac remodeling. However, influence of vitamin D supplementation in normal rats is not completely known. The aim of this study was to evaluate whether supplementation with vitamin D₃ results in cardiac remodeling with changes in structure, function, energy metabolism and inflammatory mediators in the heart of normal rats. We used 86 male rats allocated into four groups: control (C, n = 11) received standard diet; 3D (n = 12), 5D (n = 13) and 10D (n = 11) received 3000, 5000 and 10,000 IU of cholecalciferol / kg diet. After two months the animals were submitted to functional study, morphometric, and biochemical. For the statistical analysis was used the ANOVA test of variance complemented by Tukey, the test Kruskal Wallis complemented by Dunn. To evaluate the dose response was used the Spearman correlation. Serum calcium and phosphorus were higher in the 5D and 10D in relation to the group C. The blood pressure was higher in the groups 3D and 10D in relation to the group C. The increase in blood pressure was dose dependent. Serum 25 (OH) D₃ was higher in the group 5D in relation to the other groups and it was higher in the group 10D in relation to the group C. There were no differences in echocardiographic variables of morphology and function. The activity of the enzyme β hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase was smaller in the groups 5D and 10D in relation to other groups. The decrease in activity of the enzyme β hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase was dose dependent. The activity of the enzyme lactate dehydrogenase was smaller in the group 5D in relation to the group C and it was higher in the group 10D in

relation to the other groups. The inflammatory mediators $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, IL-10 and ICAM-1 were higher in the 10D compared to other groups. The increase in inflammatory mediators was dose dependent. Thus, we conclude that normal rats supplemented with vitamin D_3 did not show cardiac remodeling, but have higher values of blood pressure, higher values of inflammatory mediators and changes in cardiac energy substrate utilization. The perpetuation of these findings may lead to structural and functional changes in the heart. Most of the observed changes are dose dependent.

INTRODUÇÃO

Importância do estudo

A vitamina D é bastante conhecida pela sua função no desenvolvimento e na manutenção do tecido ósseo, bem como pela manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo. É bem estabelecido que a deficiência de vitamina D causa raquitismo e osteomalácia⁽¹⁾. Adicionalmente, estudos observacionais mostraram forte associação entre deficiência de vitamina D e aumento do risco de síndrome metabólica, neoplasias, doenças imunológicas, infecciosas e cardiovasculares⁽²⁻⁸⁾.

James (2008) relatou que um bilhão de indivíduos em todo mundo apresentam deficiência de vitamina D⁽⁹⁾. Estudo realizado no estado de São Paulo mostrou prevalência de 60% de hipovitaminose D em adolescentes saudáveis de 16 a 20 anos de idade moradores da zona rural⁽¹⁰⁾. Estudo em idosos saudáveis moradores da cidade de São Paulo mostrou prevalência de hipovitaminose D de 43,8%⁽¹¹⁾. Em idosos institucionalizados a prevalência de hipovitaminose D foi de 71,2% na cidade de São Paulo⁽¹¹⁾ e de 85,7% no Rio Grande do Sul⁽¹²⁾. Em pacientes ambulatoriais, com idade entre 14 e 91 anos, moradores de Belo Horizonte, a prevalência de hipovitaminose D foi de 42,4%⁽¹³⁾. Pacientes internados em enfermarias de medicina interna em Porto Alegre, com média de idade de 59,8 anos, apresentaram prevalência de hipovitaminose D de 78%⁽¹⁴⁾. Assim, a deficiência de vitamina D tem sido considerada, no Brasil e no mundo, problema de saúde pública⁽¹⁵⁾.

A possível explicação para esta situação é que a maioria dos habitantes de centros urbanos desenvolvidos não se expõe por tempo suficiente a luz solar para produzir quantidades adequadas de vitamina D⁽¹⁶⁾. São lembrados o uso de protetores solar, a cor da pele e localização geográfica como determinantes da síntese de vitamina D₂⁽¹⁷⁻²⁰⁾. Além disso, a ocorrência natural desta vitamina nos alimentos é pequena e a suplementação de alimentos com esta vitamina não é feita de modo universal^(1,16,21).

A ingestão diária de vitamina D recomendada pelo Ministério da Saúde (2010) é de 400 UI, que deve ser iniciada com dois meses de vida até a adolescência, para prevenção de deficiência de vitamina D⁽²²⁾. Esta dose é suficiente para prevenir o aparecimento de raquitismo e osteomalácia⁽²³⁾. No entanto, alguns estudos mostraram que a dose de 400 UI/dia não é suficiente para prevenir outras patologias⁽²⁴⁻²⁵⁾. Adicionalmente, estudos epidemiológicos mostraram que doses maiores que 400 UI/dia estavam associadas com diminuição no aparecimento de alguns tipos de câncer⁽²⁶⁾ e de doenças auto-imunes⁽²⁷⁻²⁹⁾, e melhora da saúde cardiovascular⁽³⁰⁾.

O limite superior tolerável de ingestão diária de vitamina D, recentemente recomendado pelo Institute of Medicine (2010), é de 4.000 IU⁽³¹⁾. Os efeitos a longo prazo da suplementação com doses acima de 4.000 UI por dia não são bem conhecidos, e os riscos não podem ser descartados, embora os efeitos adversos da suplementação de vitamina D sejam raros⁽³²⁾. Eles podem ocorrer principalmente por hipercalcemia aguda, que normalmente resulta de doses que excedem 10.000 UI por dia⁽³³⁾, ou por ação direta da vitamina D sobre os ossos, o fígado, o sistema nervoso central e o coração⁽³⁴⁾. Parfitt (1977) encontrou que consumo médio de 2.100 mg (84.000 UI)/dia de vitamina D durante 5 anos foi associado com função renal diminuída, nefrolitíase e nefrocalcinose. Esses eventos não foram associados com hipercalcemia nesses pacientes⁽³⁵⁾.

A alta frequência de hipovitaminose D na população e a associação de sua deficiência com o aparecimento de doenças crônicas têm incentivado pesquisadores a recomendar maior exposição solar, fortificação alimentar e suplementação medicamentosa de vitamina D, tanto para pessoas com maior risco como para população em geral⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Entretanto, Rosen (2010), preocupado com o uso indiscriminado da vitamina D, acredita que ensaios clínicos controlados casualizados são necessários para avaliar os efeitos de diferentes doses de vitamina D sobre a saúde⁽³²⁾.

Vitamina D: metabolismo e função

A vitamina D é um composto lipossolúvel cujas principais formas são a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a vitamina D₃ (colecalfiferol)⁽³⁶⁾. Tanto a vitamina D₂ como a vitamina D₃ podem ser adquiridas a partir da dieta, porém são poucos os alimentos que contêm quantidades substanciais destas vitaminas^(1,16). Dentre eles estão alguns tipos de peixes como, salmão, sardinha e atum, ovos, fígado bovino e óleo de fígado de bacalhau⁽³⁷⁾. Fontes alimentares respondem por apenas 10 a 20% da vitamina D necessária para seres humanos, sendo o restante obtido pela síntese cutânea e/ou uso de suplementos⁽⁴⁾.

O ergocalciferol é produzido por plantas e leveduras a partir do ergosterol, após exposição à radiação ultravioleta B⁽⁴⁾. O colescalfiferol é formado na pele, de humanos e de outros mamíferos, a partir do 7-diidroxicolesterol formando a pré vitamina D₃ que é rapidamente convertida à vitamina D₃. Esta reação ocorre sob exposição à radiação ultravioleta B de comprimento de onda entre 290 e 315 nm e é a maior fonte de vitamina D para o ser humano. Após a síntese cutânea, a vitamina D₃ entra na circulação sanguínea e é transportada para o fígado, unida à proteína ligante da vitamina D. No fígado, a vitamina sintetizada na pele juntamente com a vitamina absorvida da dieta, sofre a primeira hidroxilação pela enzima 25-hidroxilase (CYP27A1), formando o 25 hidroxicolecalciferol [25 (OH) D₃], também chamado de calcifediol⁽³⁸⁾. Este metabólito entra novamente na circulação sanguínea e nos rins é metabolizado pela enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1) formando o 1,25 diidroxicolecalciferol [1,25 (OH)₂ D₃] também chamado de calcitriol⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. O calcitriol é a forma biologicamente ativa da vitamina D. Sua produção é controlada principalmente pela concentração sérica de paratormônio (PTH), de cálcio e de fósforo⁽⁴¹⁻⁴²⁾. A diminuição de cálcio sérico aumenta a concentração de PTH, o que estimula a síntese de calcitriol. Redução dos níveis de fósforo sérico também pode aumentar a produção de calcitriol⁽⁴³⁻⁴⁴⁾.

O calcitriol atua nas células alvo ligando-se ao receptor de vitamina D (VDR). O VDR é membro da superfamília de receptores nucleares para hormônios esteróides⁽⁴⁵⁾. Ele age como fator de transcrição nuclear capaz de se ligar diretamente a regiões específicas do DNA⁽⁴⁶⁾. A ligação do 1,25 (OH)₂ D₃ ao VDR pode ocorrer no núcleo, no citoplasma ou na face interna da membrana celular externa⁽⁴⁷⁾. No núcleo das células, o calcitriol associado ao VDR se liga ao receptor rexinóide (RXR), formando heterodímeros. Este complexo liga-se às regiões promotoras de genes-alvo, conhecidas como elementos resposta de vitamina D, e interagem com proteínas nucleares desencadeando a ativação ou a desativação de genes^(46,48). Estima-se que o VDR possa regular cerca de 3% do genoma humano⁽⁴⁹⁾. Esta via de ação da vitamina D é chamada de resposta genômica^(46,48).

Além do papel do 1,25 (OH)₂ D₃ na regulação da transcrição de genes, estudos mostraram que algumas respostas biológicas ao calcitriol são mediadas por receptores de membrana⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾. Esses receptores são VDRs clássicos presentes na membrana plasmática. A ligação do 1,25 (OH)₂ D₃ a esses receptores pode desencadear diversas respostas como: ativação da via da fosfolipase C⁽⁵²⁾, ativação da via da guanilato ciclase⁽⁵³⁾, ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase⁽⁵⁴⁾, ativação de AMP cíclico e MAP quinase⁽⁴⁵⁾, abertura de canais de cálcio e de cloro voltagem dependentes⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾ e mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático⁽⁵⁷⁾. Esta ação da vitamina D é chamada de resposta rápida ou não genômica^(50,58).

Diversos tipos celulares expressam o VDR e, portanto, podem sofrer ação da vitamina D. Alguns tipos celulares expressam também a enzima 1 α -hidroxilase, tais como: neurônios, células musculares esqueléticas, adipócitos, células do sistema imune, entre outras. Essas células têm capacidade de formar 1,25 (OH)₂ D₃ e responder a ele com seus respectivos VDRs. Sendo assim, a vitamina D é um hormônio de ação parácrina, autócrina, e intrácrina^(48,59-61).

Classicamente a ação da vitamina D é manter a homeostase do cálcio e do fósforo. Entretanto, esta vitamina possui também ações não clássicas agindo: no sistema renina angiotensina⁽⁶²⁻⁶⁴⁾, na musculatura esquelética⁽⁶⁵⁾, no sistema nervoso⁽⁶⁶⁾ no sistema imune⁽⁶⁷⁾ e no coração⁽⁶⁸⁻⁷⁹⁾. A vitamina D tem efeito imunomodulador importante. A identificação de VDR em células mononucleares do sangue periférico e a associação da deficiência de vitamina D com doenças auto-imunes despertou o interesse de pesquisadores sobre o papel da vitamina D como um regulador do sistema imunológico⁽⁷¹⁻⁷²⁾.

Vitamina D e coração

A vitamina D parece desempenhar papel importante na saúde cardiovascular. Vários estudos epidemiológicos mostraram forte associação entre o estado nutricional relacionado à vitamina D e eventos cardiovasculares como a hipertensão^(73,74), insuficiência cardíaca⁽⁷⁵⁾, doença coronariana⁽⁷⁶⁾, infarto do miocárdio⁽⁸⁾, aterosclerose e doença arterial periférica⁽⁷⁷⁾. Da mesma forma, alguns estudos mostraram que a suplementação de vitamina D diminuiu a pressão arterial⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾, reduziu o risco de doença cardiovascular em pacientes renais crônicos⁽⁸¹⁾, além de diminuir a hipertrofia cardíaca e melhorar a função ventricular^(69,82).

Esta vitamina pode agir de forma direta no coração, uma vez que células do músculo cardíaco expressam a enzima 1 α -hidroxilase, tendo capacidade local para ativar vitamina D, e o VDR é amplamente distribuídos nessas células⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾. De fato, estudos têm mostrado vários efeitos biológicos da vitamina D no coração. Diferentes estudos realizados com cardiomiócitos de ratos neonatais mostraram a participação desta vitamina na proliferação, maturação e expressão de proteínas importantes para o desenvolvimento cardíaco^(68,83-84).

Adicionalmente a estes estudos com cardiomiócitos neonatais, estudos com modelos de deficiência de vitamina D confirmaram sua importante participação para o

funcionamento adequado do coração. Ratos mantidos com dieta deficiente em vitamina D apresentaram hipertrofia, fibrose com aumento de colágeno⁽⁸⁵⁻⁸⁶⁾, alteração da contratilidade cardíaca^(85,87) e do metabolismo energético cardíaco⁽⁸⁸⁾.

Da mesma forma, estudos com diferentes modelos experimentais de agressão cardíaca e com suplementação vitamina D mostraram efeito cardioprotetor^(69,89-93). Estudo com miócitos tratados com endotelina mostrou que a suplementação com o 1,25(OH)₂D₃ preveniu o desenvolvimento de hipertrofia⁽⁸⁹⁾. Ratos submetidos à nefrectomia e suplementados com vitamina D apresentaram redução da hipertrofia e da fibrose cardíaca⁽⁹²⁻⁹³⁾. Em modelos de sobrecarga de pressão, ratos sensíveis a sal (Dahl salt-sensitive)⁽⁶⁹⁾ e ratos espontaneamente hipertensos (SHR)⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾ apresentaram diminuição da hipertrofia e da fibrose cardíaca e melhora da função ventricular com suplementação de vitamina D. Portanto, é possível observar que a vitamina D é importante para o desenvolvimento cardíaco e o bom funcionamento do coração. Sua deficiência causa remodelação cardíaca, enquanto a suplementação de vitamina D atenua o processo de remodelação cardíaca, decorrente de diferentes condições patológicas, exercendo efeito cardioprotetor. Entretanto, suplementação da vitamina D em estudos experimentais nem sempre geram resultados concordantes. Por exemplo, trabalho realizado com células da musculatura lisa vascular mostrou que as respostas à vitamina D dependem das condições em que essas células foram cultivadas. Quando elas se encontravam em estado quiescente, a vitamina D estimulava sua proliferação e potencializava a ação de outros fatores de crescimento. Porém, quando as células estavam em estado não quiescente, a vitamina D não estimulava a proliferação e inibia a ação de outros fatores de crescimento⁽⁹⁴⁾.

Há poucos estudos analisando a importância da vitamina D no coração ou miócitos em condições normais, sem nenhum tipo de agressão. Nibbelink e colaboradores (2007) analisaram o efeito do tratamento com 1,25 (OH)₂ D₃ em linhagem celular de miócitos

cardíacos adultos (HL-1). Os autores observaram a aumento do tamanho celular e alteração da morfologia dos cardiomiócitos de forma dose dependente. Além disso, o tratamento com 1,25 (OH)₂ D₃ aumentou a expressão de miotropina e diminuiu a expressão do peptídeo natriurético atrial e do proto oncogene c-myc⁽⁷⁰⁾. A miotropina participa do processo de hipertrofia cardíaca, estimulando a expressão de proteínas como o PNA e o proto oncogene c-myc⁽⁹⁵⁻⁹⁶⁾. O PNA é usado como marcadores do estresse cardíaco e da hipertrofia cardíaca⁽⁹⁷⁾. Em outro estudo realizado com miócito cardíaco de rato adulto, os autores mostraram acelerada taxa relaxamento muscular cardíaco, de forma dose dependente, em resposta a administração aguda e crônica de 1,25 (OH)₂ D₃. Este achado pode ser importante fator para a manutenção ou melhora da função diastólica⁽⁹⁸⁾. Assim, adição de vitamina D em culturas de cardiomiócitos pode acarretar estímulo à hipertrofia e melhora da função cardíaca.

A remodelação cardíaca é caracterizada por variações celulares, intersticiais, moleculares cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração em resposta a um estímulo⁽⁹⁹⁾. O processo de remodelação pode ocorrer em situações fisiológicas, tais como: o desenvolvimento normal do coração até a vida adulta, resposta ao exercício físico e à gravidez. Embora, esse termo seja mais utilizado para descrever alterações cardíacas patológicas⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾.

Em geral, na remodelação cardíaca fisiológica, as alterações cardíacas são hipertrofia sem aparecimento de fibrose e a função cardíaca permanece normal ou aumentada, o coração metaboliza mais ácidos graxos que glicose⁽¹⁰²⁻¹⁰³⁾. Na remodelação cardíaca patológica, geralmente, as alterações cardíacas são hipertrofia com aparecimento de fibrose e a função cardíaca está diminuída, o coração metaboliza mais glicose que ácidos graxos^{(102,104-}

105).

Suplementação de vitamina D na dieta para ratos

Informações sobre as necessidades de vitamina D em ratos são limitadas. O colecalciferol é sintetizado na pele desses animais quando expostos à luz ultravioleta de comprimento de onda entre 280 e 320 nm⁽¹⁰⁶⁾. Na ausência de dados adicionais o National Research Council (1978) recomendou a quantidade de 1.000 UI de vitamina D/kg de dieta para ratos⁽¹⁰⁷⁾. No estudo realizado por Morris e colaboradores (1995), os animais para o estudo metabolismo e a contratilidade cardíaca, como grupo controle, foram suplementados com 3.000 UI/kg de dieta⁽¹⁰⁸⁾. Shepard e DeLuca (1980) mostraram que ratos suplementados com doses maiores que 1.000 UI de vitamina D₃/dia (~30.000 UI/kg de dieta) começaram a apresentar sinais de toxicidade como diarreia, perda de peso, hipercalcemia e calcificação dos rins⁽¹⁰⁹⁾.

[illegible]

Pelo exposto acima é possível levantar a hipótese de que a suplementação com diferentes doses de vitamina D₃ em ratos Wistar resulta em remodelação cardíaca com alterações na estrutura, na função, no metabolismo energético e nos mediadores inflamatórios do coração, e que essas alterações serão dose dependentes.

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são: verificar se a suplementação com vitamina D₃ promove remodelação cardíaca com alterações na estrutura, na função, no metabolismo energético e nos mediadores inflamatórios do coração normal de ratos Wistar e se os efeitos encontrados são dose dependente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal de nossa instituição, estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 86 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200 g a 250 g acondicionados no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu. Os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12h, à temperatura ambiente de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e a ingestão alimentar foi controlada diariamente. O peso corporal (PC) foi medido semanalmente. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: 1) Grupo controle (C) – formado por 21 animais que receberam a dieta usual do laboratório; 2) Grupo 3D – formado por 22 animais que receberam suplementação de 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 3) Grupo 5D - formado por 22 animais que receberam suplementação de 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; e 4) Grupo 10D – formado por 21 animais que receberam suplementação de 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta. Os animais foram observados por período de dois meses. A vitamina D utilizada foi colecalciferol D₃ (Sigma St. Louis, MO, USA).

Avaliação da pressão sistólica caudal

A pressão sistólica caudal foi avaliada uma semana antes do término do estudo. O registro gráfico da pressão sistólica caudal foi realizado indiretamente por pletismografia de cauda. Foi utilizando polígrafo (Byo-Sistem PE 300, NARCO), sensor e

eletroesfigmomanômetro, Este método não permite avaliar a pressão diastólica. Os animais foram colocados em caixa aquecida a 40°C, durante cinco minutos, com a finalidade de produzir vasodilatação na artéria caudal. 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, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em esfigmomanômetro Narco Bio-System[®], modelo 709-0610 (International Biomedical, USA).

Estudo ecocardiográfico

Após receberem as dietas durante dois meses, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) via intramuscular. Em seguida foi feita raspagem da pelagem no tórax dos animais, que prontos foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do ecocardiograma. O ecocardiógrafo utilizado foi do modelo HDI-5000 SonoCT da Philips, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-12 MHz. As estruturas cardíacas foram medidas em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos, obtendo-se a média aritmética em seguida⁽¹¹⁰⁾.

A imagem da cavidade ventricular esquerda e da espessura da parede posterior (EPP) foram obtidas posicionando-se o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral, entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com cursor de modo-M passando pela valva aórtica.

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a EPP foram medidos no momento correspondente ao seu diâmetro máximo. Já, o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima de sua parede posterior.

As medidas do diâmetro do átrio esquerdo (AE) e da aorta (AO) foram realizadas, especificamente, no final da sístole e diástole ventricular.

O diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo (VSVE) foi medido na posição paraesternal eixo maior, na sístole ventricular.

Os fluxos diastólico transmitral e sistólico pela VSVE foram obtidos com o transdutor colocado nas posições apicais quatro a cinco câmaras, permitindo as medidas da onda E, onda A e velocidade máxima na VSVE. A frequência cardíaca (FC) foi estimada pelo tempo entre dois batimentos cardíacos consecutivos.

O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o final do fluxo sistólico pela VSVE e o início da fluxo diastólico transmitral.

As outras variáveis foram derivadas das formulações descritas a seguir:

- ✓ Massa do ventrículo esquerdo (MVE) = $[1,04 \times (DDVE + 2 \times EPP)^3 - (DDVE)^3]$, em que 1,04 representa a gravidade específica do miocárdio
- ✓ Índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) = MVE/PC
- ✓ Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) = $(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3$
- ✓ Porcentagem de encurtamento (Enc) = $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$
- ✓ Volume sistólico (VS) = $[VTI \times \pi \times (VSVE/2)^2]$, sendo VTI a integral da velocidade/tempo do fluxo sistólico na VSVE
- ✓ Débito cardíaco (DC) = $VS \times FC$
- ✓ Índice cardíaco (IC) = DC/PC

Algumas variáveis ecocardiográficas e morfométricas foram normalizadas pelo peso corporal, pelo comprimento da tíbia⁽¹¹⁾ e pelo diâmetro da aorta.

Coleta de material biológico

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e foram coletados sangue, coração, fígado e o pulmão. O sangue contido nos ventrículos foi coletado por punção. Em seguida foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O soro obtido foi congelado a -80°C para posterior dosagens de cálcio, fósforo e 25 (OH) D₃.

O fígado, o pulmão e o coração de cada animal foi colocado em soro fisiológico para retirada do sangue. Os ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD), e os átrios (A) foram dissecados e pesados. Fragmentos do fígado e do pulmão também foram separados e pesados, correspondendo ao peso úmido. Em seguida, VD, A e fragmentos de fígado e de pulmão foram colocados em estufa a 80°C por 48 h. Após este período, foram novamente pesados, obtendo-se assim o peso seco, o que permitiu determinar o percentual da água desses tecidos por meio da fórmula:

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

O VE foi dividido sendo um fragmento fixado em solução de formol a 10% por período de 48 horas⁽¹¹²⁻¹¹³⁾. O restante do VE foi guardado em freezer a -80°C para posteriores dosagens.

Microscopia Óptica do Músculo Cardíaco

Amostras do VE foram fixadas em solução de formol a 10% por período de 48 horas, segundo relato prévio⁽¹¹²⁻¹¹³⁾. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes histológicos coronais de quatro µm. Os cortes histológicos

foram corados em lâmina com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição de áreas da secção seccional transversa dos miócitos (ASM), empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo utilizando objetiva de 40 vezes. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentavam forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localização na camada subendocárdica da parede muscular do VE. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de seis μm e corados pela técnica de *Picro Sirius red*, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do VE. A leitura foi realizada utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo utilizando objetiva de 40 vezes. Os campos escolhidos estavam afastados da região perivascular⁽¹¹²⁻¹¹³⁾.

Dosagem plasmática de 25 (OH) D₃

As concentrações de 25 (OH) D₃ no plasma foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O aparelho empregado foi cromatógrafo Waters 2695, com detector Waters 2996-fotodiodo. A análise foi feita por coluna C18 de fase reversa para todas as amostras. A fase móvel foi composta por água e metanol (85:15, v/v).

O comprimento do detector de onda ultravioleta (UV) será fixado em 265 nm e com fluxo de 0,5 ml/min.

A extração de 25 (OH) D₃ foi feita em alíquotas de 500 µl de plasma. O plasma foi colocado em tubo, adicionado 500 µl de metanol-isopropanol (90:10, v/v), e agitado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, foi adicionado 1,5 ml de n-hexano, agitado em vórtex por 60 segundos e centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos, a 4°C. Foi coletado o sobrenadante, colocado em outro tubo e evaporado com fluxo de nitrogênio. As amostras foram redissolvidas em 125 µl de metanol. Foi injetado no HPLC 50 µl de amostra. Após corrida de 20 minutos, foi aguardado estabilização da coluna que foi lavada com metanol 100% para leitura de nova amostra⁽¹¹⁴⁾.

Dosagem sérica de Cálcio e Fósforo

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 (teste kit Laborlab, Laborlab Produtos para Laboratório, SP, Brasil). 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. O arsenito/citrato 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.

Metabolismo Energético Cardíaco

Para avaliação do metabolismo energético cardíaco foi medida a atividade das enzimas β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (OHADH) e lactato desidrogenase (LDH).

A atividade da OHADH (E.C.1.1.1.35.) foi determinada em meio contendo acetoacetil coenzima A e NADH⁽¹¹⁵⁾. A oxidação do NADH foi determinada em 3 minutos, sendo realizadas leituras à 340 nm em intervalos de 1 minuto.

A atividade da LDH (E.C. 1.1.1.27.) foi determinada no coração pela velocidade de oxidação do NADH, medida a 340 nm, tendo como substrato o piruvato⁽¹¹⁶⁾.

Mediadores inflamatórios

Fragmentos congelados do VE (60 mg) foram homogeneizadas em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA) com tampão de extração hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0; sucrose 0,3 M; ditioneitol (DTT) 0,5 mM; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM pH 8,0; fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,3 mM; fluoreto de sódio (NaF) 10 mM; e inibidor de protease (0,1 mg/ml). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C, durante 20 minutos. A alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação de proteína total, segundo o método de Bradford (1976), utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão⁽¹¹⁷⁾. As concentrações do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), interleucina-10 (IL-10) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) citocinas em homogeneizado cardíaco foram avaliados por ELISA de acordo com as instruções do

fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Análise Estatística

Os valores obtidos são apresentados como média $\pm$ erro padrão (para distribuição normal) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal). As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) de uma via, complementadas com o teste de Tukey, quando os dados apresentaram distribuição normal. Quando os dados não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado com o teste de Dunn. Para avaliar a resposta dose dependente foi utilizado o teste de tendência (correlação de Spearman). A associação entre as variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson, quando as duas variáveis apresentavam distribuição normal, e teste de correlação de Spearman, quando uma ou as duas variáveis apresentavam distribuição não normal.

Considerando-se que a concentração de cálcio sérico variou de 8,2 a 9,8 mg/dl, e devido ao fato de cálcio sérico influenciar na pressão arterial, foi realizado o teste de análise de covariância (ANCOVA). Na ANCOVA, além dos grupos com diferentes doses de vitamina D, a covariável concentração de cálcio sérico foi acrescentada com a finalidade de ajustar os valores da pressão arterial de modo a anular a influência da diferença da concentração de cálcio sérico. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

RESULTADOS

Mortalidade dos animais

Em relação à mortalidade dos animais nos grupos experimentais houve a morte de quatro animais, dois pertencentes ao grupo controle e um ao grupo 3D e um ao grupo 5D. As mortes ocorreram imediatamente após a realização do estudo ecocardiográfico.

Peso corporal, comprimento da tíbia e pressão sistólica caudal

Os animais não apresentaram diferença significativa entre os grupos em relação ao peso corporal inicial, peso corporal final e comprimento da tíbia (Tabela 1).

Como apresentada na Figura 1, os grupos 3D e 10D apresentaram maior pressão sistólica caudal comparado ao grupo controle ($C = 118 \pm 2,49$ mmHg; $3D = 131 \pm 3,10$ mmHg; $5D = 123 \pm 1,90$ mmHg; $10D = 134 \pm 3,54$ mmHg; $p < 0,001$). A pressão sistólica caudal apresentou diferença entre os grupos quando normalizada pela concentração sérica de cálcio, por meio do teste da análise de covariância ($C = 117 \pm 5,9$ mmHg; $3D = 130 \pm 4,5$ mmHg; $5D = 122 \pm 4,8$ mmHg; $10D = 136 \pm 4,8$ mmHg; $p = 0,049$) (Figura 2).

Tabela 1. Peso corporal, comprimento da tíbia e pressão sistólica caudal.

Variável	C (n=21)	3D (n=22)	5D (n=22)	10D (n=21)	p*	r	p**
Peso inicial (g)	261±4,25	260±4,44	259±4,83	260±4,94	0,98	-0,01	0,93
Peso final (g)	422±5,85	429±7,58	426±7,51	421±6,92	0,83	0,01	0,96
Tíbia (cm)#	4,15 (4,00-4,20)	4,10 (4,00-4,20)	4,10 (3,90-4,13)	4,05 (3,98-4,16)	0,73	-0,10	0,39
PS (mmHg)	118±2,49 ^a	131±3,10 ^b	123±1,90 ^{ab}	134±3,54 ^b	<0,001	0,28	0,009

Valores expressos em média ± erro padrão ou mediana com percentil 25 e 75; n: número de ratos; C: animais controle; 3D: animais tratados com 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; PS: pressão sistólica caudal. #Para a variável comprimento da tíbia o valor de n é de 19 animais para o grupo controle, 21 animais para o grupo 3D e de 21 animais para o grupo 5D. *ANOVA de 1 via/Kruskal Wallis e ** Correlação de Spearman. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

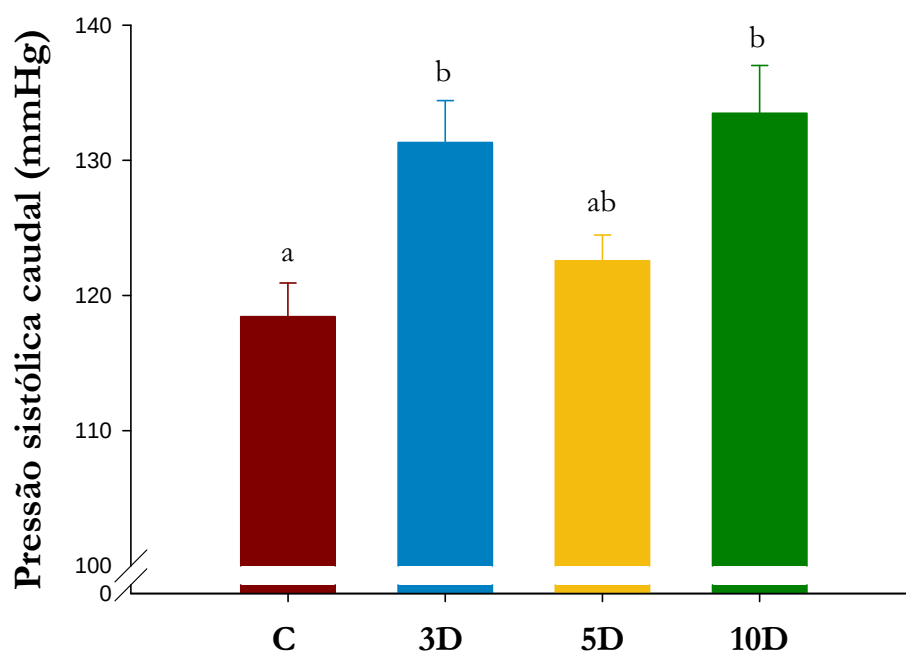


Figura 1. Pressão sistólica caudal. C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significante. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

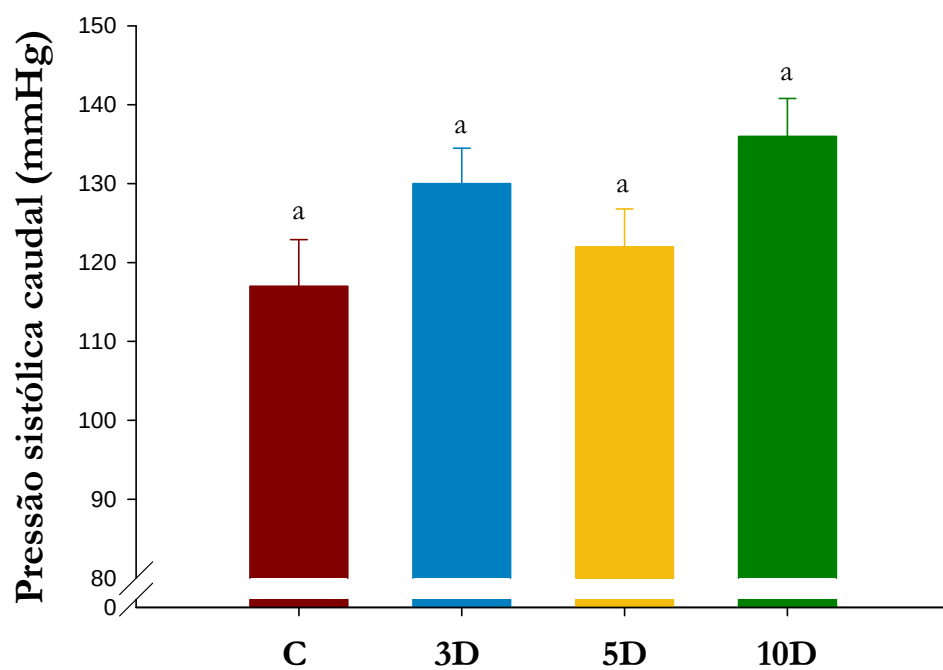


Figura 2. Pressão sistólica caudal ajustada para concentração sérica de cálcio. C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. ANCOVA, $p = 0,049$

Variáveis relacionadas à vitamina D

As variáveis relacionadas à vitamina D estão apresentadas na Tabela 2. Em relação ao consumo médio diário de ração não houve diferença significativa entre os grupos. A mediana de ingestão diária de colecalciferol foi de 45,5 UI/dia para o grupo controle, 123 UI/dia para o grupo 3D, 171 UI/dia para o grupo 5D e 290 UI/dia para o grupo 10D. A ingestão diária de colecalciferol foi estatisticamente diferente entre todos os grupos.

Os grupos 5D e 10D apresentaram maiores concentrações séricas de cálcio e fósforo comparados ao grupo controle e este aumento foi dose dependente. A concentração sérica de cálcio apresentou correlação positiva com a concentração sérica de fósforo ($r = 0,58$ e $p < 0,001$) (Figura 3). Entre concentração sérica de cálcio e pressão sistólica caudal não houve correlação ($r = 0,05$ e $p = 0,77$) (Figura 4).

Em relação à concentração plasmática de 25 (OH) D₃, o grupo 5D apresentou maiores valores de 25 (OH) D₃ comparado aos demais grupos. O grupo 10D apresentou maiores concentrações de 25 (OH) D₃ quando comparado ao controle e menores concentrações quando comparado ao grupo 5D. O aumento da concentração sérica de 25 (OH) D₃ foi dose dependente.

Tabela 2. Variáveis relacionadas à vitamina D

Variável	C (n=21)	3D (n=22)	5D (n=22)	10D (n=21)	p*	r	p**
Consumo médio diário de ração (g/dia)	25,7±0,34	25,9±0,41	25,3±0,45	24,9±0,43	0,32	-0,19	0,09
Consumo diário de vitamina D (UI/dia)	45,5 (44,8-48,1) ^a	123 (118-128) ^b	171 (165-181) ^c	290 (283-310) ^d	<0,001	0,97	<0,001
Cálcio sérico (mg/dl)#	8,24±0,36 ^a	9,32±0,32 ^{ab}	9,81±0,28 ^b	9,44±0,15 ^b	0,005	0,40	0,01
Fósforo sérico (mg/dl)#	5,90 (5,65-6,10) ^a	6,80 (6,35-8,00) ^{ab}	7,65 (7,30-8,60) ^b	7,60 (6,95-8,78) ^b	<0,001	0,58	<0,001
25 (OH) D ₃ plasmático (ng/ml)##	17,6±3,9 ^a	31,2±7,3 ^{ab}	75,0±4,0 ^c	37,6±2,2 ^b	<0,001	0,64	0,002

Valores expressos em média ± erro padrão ou mediana com percentil 25 e 75; n: número de ratos; C: animais tratados com 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta. #Para as variáveis cálcio sérico e fósforo sérico o valor de n é de 9 animais para o grupo controle, 12 animais para o grupo 3D, 12 animais para o grupo 5D e 11 animais para o grupo 10D. ##Para a variável 25 (OH) D₃ plasmático o valor de n é de 5 animais em cada grupo. *ANOVA de 1 via/Kruskal Wallis e ** Correlação de Spearman. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

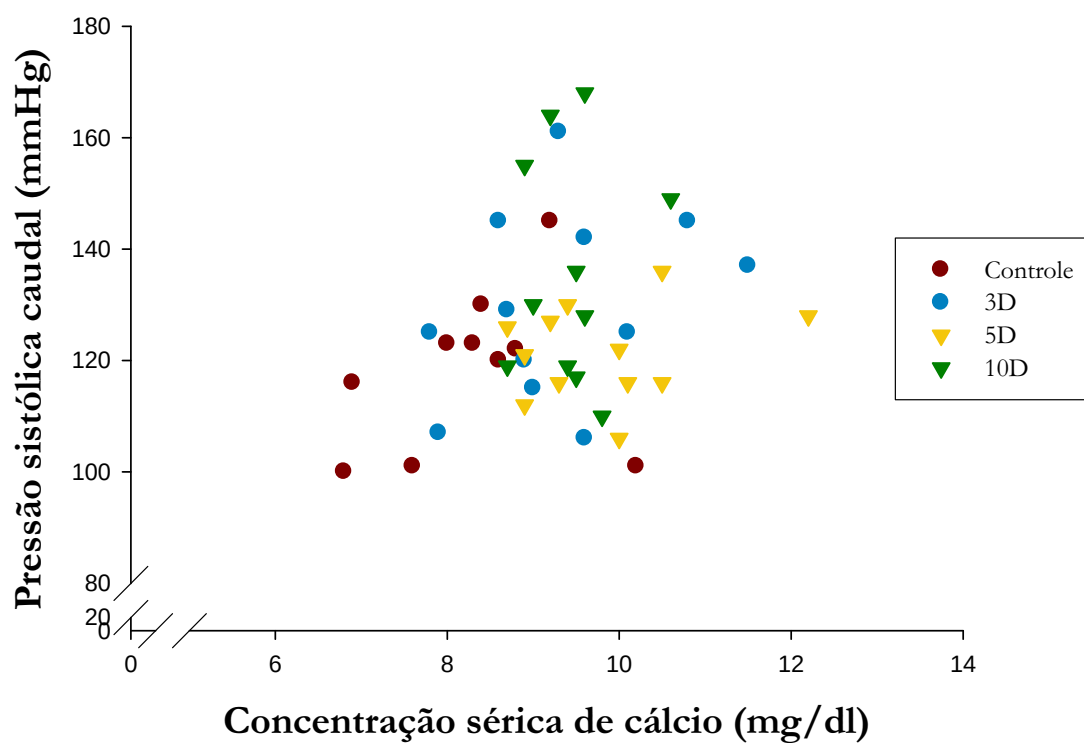


Figura 4. Correlação de Pearson entre concentração sérica de cálcio e pressão sistólica caudal, $p = 0,77$ e $r = 0,05$.

Estudo ecocardiográfico

Os dados relativos às análises ecocardiográficas estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Considerando os dados morfológicos, não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis.

Para as variáveis de função sistólica e diastólica também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3. Variáveis morfológicas do ecocardiograma.

Variável	C (n=21)	3D (n=22)	5D (n=22)	10D (n=21)	p*	r	p**
AE (mm)	4,19±0,11	4,26±0,14	4,31±0,12	4,01±0,11	0,33	-0,09	0,42
AE/túbia (mm/cm)	1,01±0,03	1,05±0,04	1,08±0,03	0,99±0,03	0,17	-0,03	0,83
AE/PC (mm/kg)	9,92±0,23	9,94±0,32	10,19±0,36	9,57±0,30	0,57	-0,06	0,61
AO (mm)	3,50 (3,50-3,70)	3,60 (3,30-3,70)	3,50 (3,40-3,60)	3,60 (3,38-3,70)	0,79	-0,09	0,39
AE/AO	1,14 (1,06-1,22)	1,21 (1,03-1,35)	1,26 (1,06-1,35)	1,15 (1,04-1,21)	0,25	-0,02	0,89
DDVE (mm)	7,22±0,11	7,30±0,12	7,20±0,10	7,31±0,10	0,86	-0,03	0,77
DDVE/túbia (mm/cm)	1,73 (1,61-1,88)	1,77 (1,68-1,91)	1,80 (1,68-1,84)	1,81 (1,69-1,92)	0,64	0,13	0,26
DDVE/PC (mm/kg)	16,8 (16,3-18,0)	16,8 (15,9-18,1)	16,4 (15,6-18,7)	17,0 (16,5-18,3)	0,51	-0,04	0,70
DSVE (mm)	3,00±0,14	3,11±0,12	2,90±0,10	3,12±0,11	0,56	-0,02	0,85
DSVE/túbia	0,72±0,04	0,75±0,03	0,71±0,03	0,77±0,03	0,53	0,06	0,61
DSVE/PC (mm/kg)	7,10±0,33	7,26±0,29	6,87±0,31	7,43±0,29	0,61	-0,03	0,79
EPP (mm)	1,35±0,04	1,41±0,05	1,38±0,03	1,44±0,04	0,49	0,14	0,20
2xEPP/DDVE	0,38±0,01	0,39±0,02	0,38±0,01	0,39±0,01	0,73	0,14	0,20
VSVE (cm)	0,25 (0,23-0,26)	0,24 (0,22-0,26)	0,25 (0,25-0,26)	0,25 (0,23-0,26)	0,60	0,06	0,56
MVE (mg)	651±32,9	696±35,3	661±29,2	723±40,1	0,44	0,08	0,47
IMVE (mg/g)	1,54±0,07	1,62±0,08	1,56±0,07	1,72±0,08	0,41	0,13	0,23

Valores expressos em média ± erro padrão ou mediana com percentil 25 e 75; n: número de ratos; C: animais controle; 3D: animais tratados 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; PC: peso corporal do animal; AO: diâmetro da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP: espessura diastólica da parede posterior; VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo; MVE: massa do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo. *ANOVA de 1 via/Kruskal Wallis e ** Correlação de Spearman.

Tabela 4. Variáveis funcionais do ecocardiograma.

Variável	C (n=21)	3D (n=22)	5D (n=22)	10D (n=21)	p*	r	p**
FC (bpm)	303 (284-333)	292 (274-313)	286 (262-314)	282 (263-293)	0,06	-0,30	0,01
VS (ml)	0,28±0,02	0,27±0,02	0,29±0,01	0,30±0,01	0,32	0,20	0,08
DC (ml/min)	79,9±5,86	78±4,47	85,9±4,13	84,4±3,84	0,59	0,12	0,26
IC (ml/min/g)	0,18 (0,16-0,24)	0,17 (0,15-0,21)	0,18 (0,17-0,24)	0,18 (0,17-0,23)	0,43	0,08	0,44
Onda E (cm/s)	81,4±3,12	83,7±2,11	83,6±2,56	79,3±3,41	0,65	-0,02	0,88
Onda A (cm/s)	57,8±2,54	53,9±2,21	54,3±3,34	56,3±2,90	0,74	-0,03	0,78
E/A	1,45 (1,31-1,59)	1,57 (1,39-1,68)	154 (1,32-1,74)	1,47 (1,22-1,80)	0,49	0,01	0,90
TRIV (ms)	21,0 (18,8-24,0)	24,0 (21,0-25,5)	24,0 (21,8-27,0)	24,0 (22,5-27,0)	0,13	0,27	0,02
Vao (cm/s)	100 (95,3-110)	110 (93,0-120)	110 (92,8-110)	100 (94,5-120)	0,99	-0,02	0,84
FE	0,92±0,01	0,92±0,01	0,93±0,01	0,92±0,01	0,53	-0,003	0,98
Enc (%)	58,5±1,81	57,6±1,32	59,8±1,09	57,4±1,49	0,63	-0,003	0,98
TDE (ms)	50,1±2,02	49,8±1,33	47,7±1,93	49,8±1,63	0,73	-0,09	0,47

Valores em média ± erro padrão ou mediana com percentil 25 e 75; n: número de ratos; C: animais tratados com 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; FC: frequência cardíaca; VS: volume sistólico; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; E/A: relação entre as ondas E e A; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; Vao: velocidade do sangue na via de saída do ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; Enc: porcentagem de encurtamento; TDE: tempo de desaceleração da onda E. *ANOVA de 1 via/Kruskal Wallis e ** Correlação de Spearman.

Estudo morfométrico

Os dados relativos às análises morfométricas estão apresentados na Tabela 5. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para o peso do ventrículo esquerdo, peso do ventrículo direito e peso dos átrios, mesmo quando ajustado pelo comprimento da tíbia e pelo peso corporal dos animais. Quanto ao teor de água, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o teor de água no ventrículo direito, átrios, pulmão e fígado.

Tabela 5. Variáveis morfométricas.

Variável	C (n=21)	3D (n=22)	5D (n=22)	10D (n=21)	p*	r	p**
PVE (mg)	838±19,6	815±17,6	815±15,1	843±19,8	0,56	0,03	0,81
PVE/tíbia (mg/cm)	201 (188-218)	198 (193-207)	199 (188-212)	206 (192-225)	0,68	0,08	0,50
PVE/PC (mg/g)	1,95 (1,88-2,05)	1,91 (1,82-2,00)	1,91 (1,80-1,96)	2,02 (1,86-2,11)	0,13	0,12	0,27
PVD (mg)	223±8,26	231±8,11	221±7,54	231±7,72	0,72	0,01	0,93
PVD/tíbia (mg/cm)	54,6±2,11	56,5±1,92	54,5±1,89	56,7±1,88	0,78	0,03	0,80
PVD/PC (mg/g)	0,53±0,02	0,54±0,01	0,51±0,02	0,55±0,01	0,41	0,03	0,78
A (mg)	35,5±2,88	42,2±2,80	46,0±4,20	40,6±3,09	0,18	0,19	0,36
A/tíbia (mg/cm)	8,71±0,72	10,4±0,74	11,5±1,10	10,0±0,79	0,17	0,11	0,34
A/PC (mg/g)	0,08±0,01	0,10±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01	0,25	0,11	0,31
Teor de água no VD (%)	76 (75-77)	76 (75-77)	76 (75-77)	76 (75-76)	0,99	-0,01	0,95
Teor de água nos átrios (%)	80 (78-81)	79 (78-85)	81 (78-83)	79 (77-84)	0,93	0,04	0,73
Teor de água no pulmão (%)	78 (77-78)	77 (75-78)	78 (77-79)	77 (76-79)	0,27	0,09	0,42
Teor de água no fígado (%)	69 (68-70)	69 (68-70)	70 (69-71)	69 (68-70)	0,20	0,13	0,26

Valores em média ± erro padrão ou mediana com percentil 25 e 75; n: número de ratos; C: animais controle; 3D: animais tratados com 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PVE/tíbia: relação entre peso do ventrículo esquerdo e o comprimento da tíbia; PC: peso corporal do animal; PVD: peso do ventrículo direito; PVD/tíbia: relação entre peso do ventrículo direito e o comprimento da tíbia; A: peso dos átrios; A/tíbia: relação entre peso dos átrios e o comprimento da tíbia. *ANOVA de 1 via/Kruskal Wallis e **Correlação de Spearman.

Microscopia óptica

Os dados relativos à área seccional do cardiomiócito e porcentagem de colágeno estão apresentados na Tabela 6, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6. Área seccional dos cardiomiócitos e porcentagem de colágeno

Variável	C (n=7)	3D (n=6)	5D (n=7)	10D (n=6)	p*	r	p**
ASM (μm^2)	226 $\pm$ 8,10	218 $\pm$ 6,84	229 $\pm$ 6,10	228 $\pm$ 5,90	0,68	0,17	0,40
% Colágeno	2,35 $\pm$ 0,36	2,69 $\pm$ 0,48	3,38 $\pm$ 0,73	2,10 $\pm$ 0,65	0,12	-0,08	0,69

Valores em média $\pm$ erro padrão; n: número de ratos; C: animais controle; 3D: animais tratados com 3.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com 5.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalciferol/kg de dieta; ASM: área seccional dos cardiomiócitos. *ANOVA de 1 via e ** Correlação de Spearman.

Metabolismo Energético Cardíaco

Os dados relativos às enzimas do metabolismo energético cardíaco estão apresentados na Tabela 7. A atividade da enzima β hidroxil Coenzima A desidrogenase foi menor nos grupos 5D e 10D em relação aos outros grupos (Figura 5). A atividade da enzima β hidroxil Coenzima A desidrogenase foi dose dependente. A atividade da enzima lactato desidrogenase foi menor no grupo 5D em relação ao grupo controle e foi maior no grupo 10D em relação aos outros grupos (Figura 6).

Tabela 7. Enzimas do metabolismo energético cardíaco

Variável	C (n=8)	3D (n=8)	5D (n=8)	10D (n=8)	p*	r	p**
OHADH (nmol/mg)	69,9 ± 3,83 ^b	65,8 ± 4,64 ^b	44,7 ± 3,27 ^a	34,4 ± 1,82 ^a	p < 0,001	-0,085	p < 0,001
LDH (nmol/mg)	220 ± 6,44 ^c	209 ± 3,55 ^{ac}	199 ± 4,14 ^a	256 ± 3,40 ^b	p < 0,001	0,33	0,07

Valores em média ± desvio padrão; n: número de ratos; C: animais controle; 3D: animais tratados com 3.000 UI de colestiferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com 5.000 UI de colestiferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colestiferol/kg de dieta; OHADH: β-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase. *ANOVA de 1 via e ** Correlação de Spearman

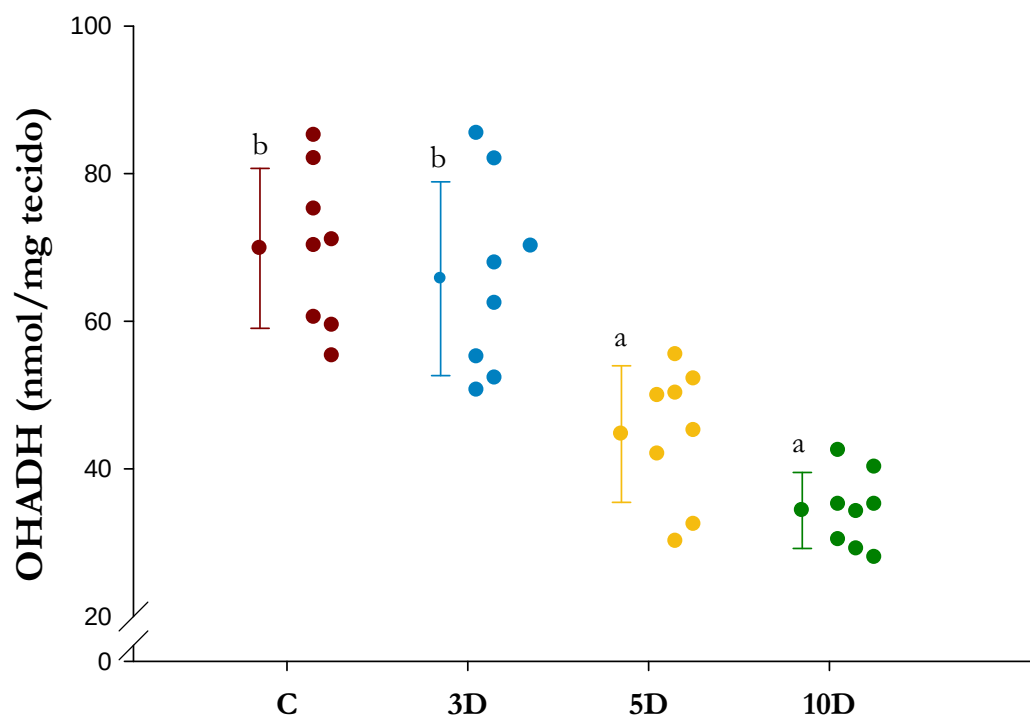


Figura 5. Atividade da enzima β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase. C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

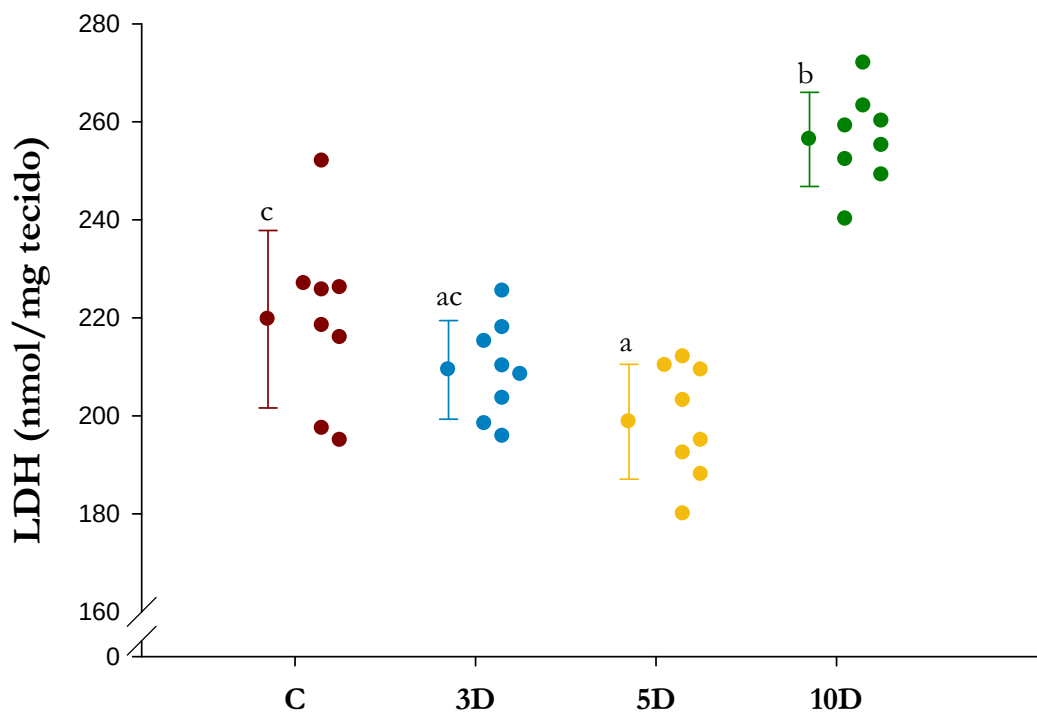


Figura 6. Atividade da enzima lactato desidrogenase. C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

Mediadores inflamatórios

Os dados relativos aos moduladores inflamatórios estão apresentados na Tabela 8.

As citocinas inflamatórias, TNF- α e INF- γ foram maiores no grupo 10D em relação aos outros grupos. O aumento das citocinas inflamatórias foi dose dependente.

A citocina antiinflamatória, IL-10 e a molécula de adesão também foram maiores no grupo 10D em relação aos outros grupo. O aumento da IL-10 e da ICAM-1 foi dose dependente.

Tabela 8. Moduladores inflamatórios

Variável	C (n=6)	3D (n=7)	5D (n=7)	10D (n=7)	p*	r	p**
TNF- α (pg/ mg proteína)	4,33 $\pm$ 0,40 ^a	4,52 $\pm$ 0,29 ^a	5,77 $\pm$ 0,58 ^a	8,67 $\pm$ 45 ^b	p<0,001	0,77	p<0,001
INF- γ (pg/mg proteína)	7,61 $\pm$ 0,66 ^a	7,75 $\pm$ 0,56 ^a	10,4 $\pm$ 1,06 ^a	15,0 $\pm$ 0,86 ^b	p<0,001	0,74	p<0,001
IL-10 (pg/mg proteína)	12,3 $\pm$ 1,37 ^a	14,8 $\pm$ 1,45 ^a	18,5 $\pm$ 1,44 ^a	31,0 $\pm$ 3,87 ^b	p<0,001	0,81	p<0,001
ICAM-1 (pg/mg proteína)	67,6 $\pm$ 3,60 ^a	65,8 $\pm$ 3,48 ^a	85,1 $\pm$ 5,77 ^a	106 $\pm$ 10,4 ^b	p<0,001	0,72	p<0,001

Valores em média $\pm$ desvio padrão; n: número de ratos; C: animais controle; 3D: animais tratados com 3.000 UI de colecalfiferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com 5.000 UI de colecalfiferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com 10.000 UI de colecalfiferol/kg de dieta; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; INF- γ : interferon- γ ; IL-10: interleucina-10; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1. *ANOVA de 1 via e ** Correlação de Spearman

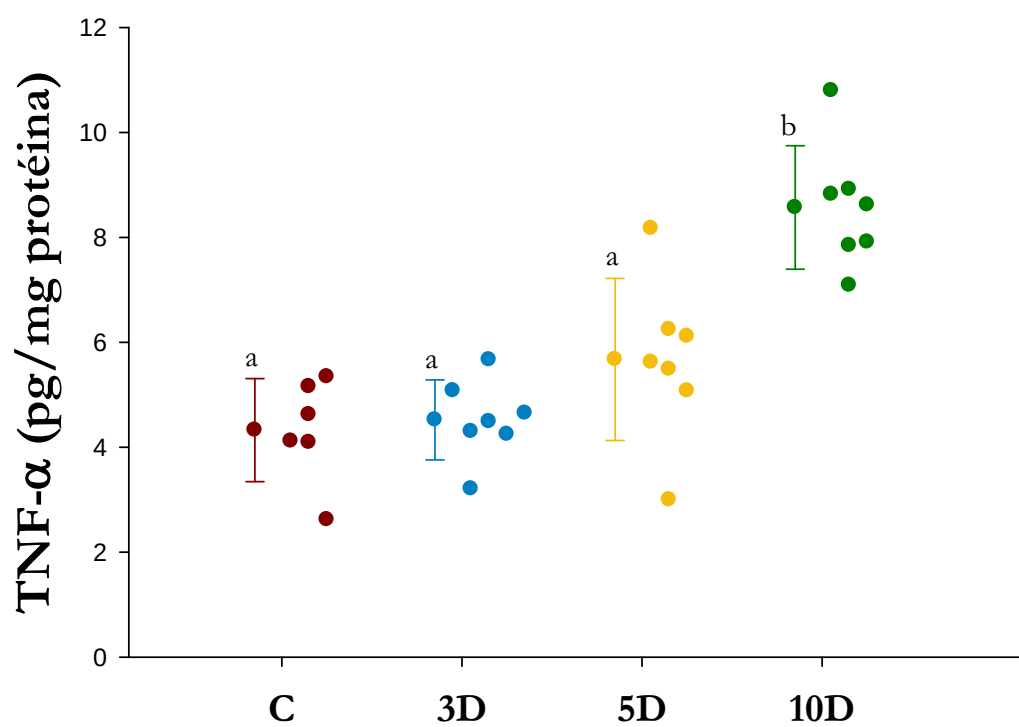


Figura 7. Fator de necrose tumoral- α . C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significante. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

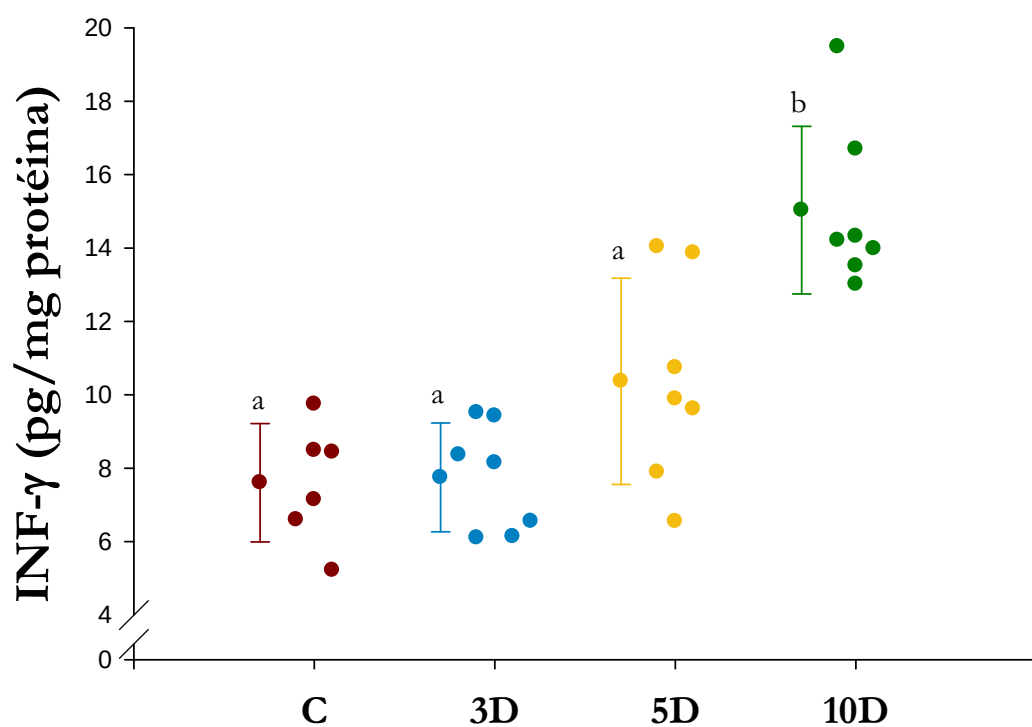


Figura 8. Interferon- γ . C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

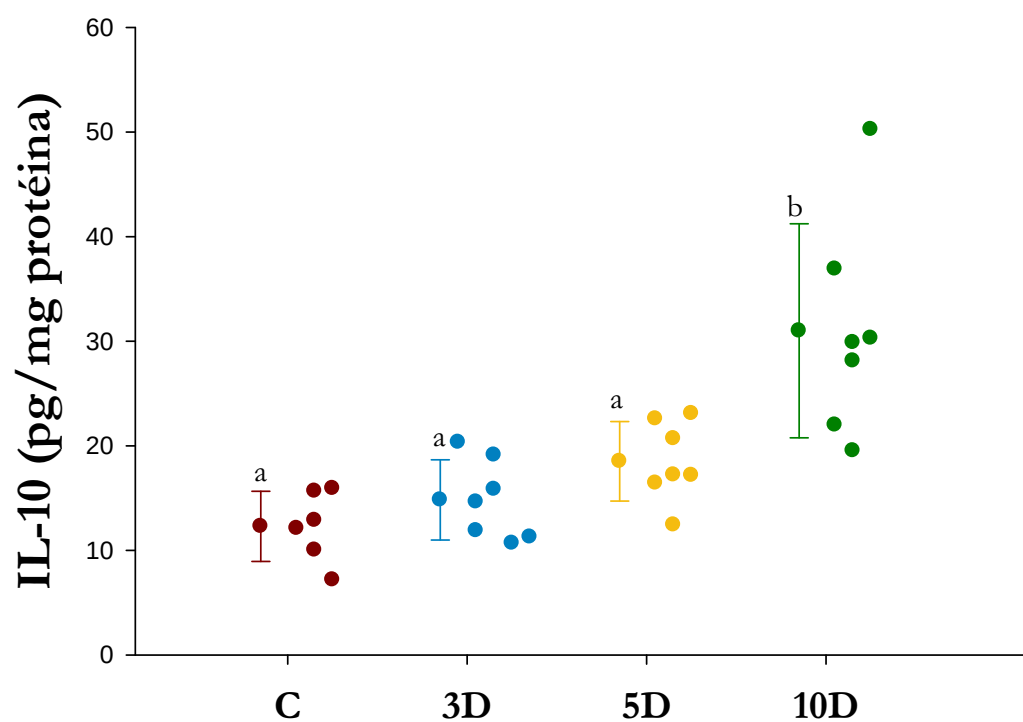


Figura 9. Interleucina-10. C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

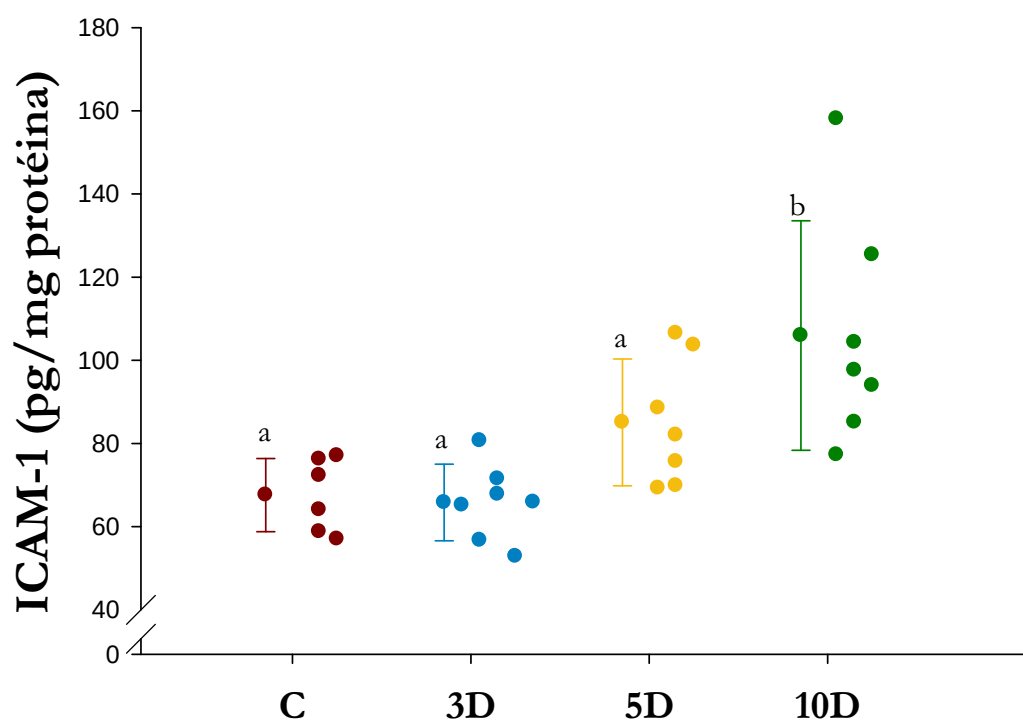


Figura 10. Molécula de adesão intercelular-1. C: animais controle; 3D: animais tratados com vitamina D 3.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 5D: animais tratados com vitamina D 5.000 UI de colicalciferol/kg de dieta; 10D: animais tratados com vitamina D 10.000 UI de colicalciferol/kg de dieta. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA de uma via, $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação da dieta com vitamina D₃ promoveria remodelação cardíaca causando alterações na estrutura, na função, no metabolismo energético e nos moduladores inflamatórios do coração normal de ratos, e se este efeito seria dose dependente. O conjunto de nossos resultados mostrou que ratos normais suplementados com vitamina D₃ apresentaram maior concentração sérica de cálcio, maiores valores de pressão arterial, maiores valores de mediadores inflamatórios no coração e alterou a utilização de substrato energético cardíaco. A perpetuação destes achados pode acarretar alterações na estrutura e função cardíaca.

O estado nutricional relativo à vitamina D é mensurado por meio da concentração sérica do metabólito 25 (OH) D₃ e não pela forma biologicamente ativa da vitamina D (1,25 (OH)₂ D₃). O 1,25 (OH)₂ D₃ não é indicado para esse propósito devido às seguintes razões: 1) as concentrações séricas de 1,25 (OH)₂ D₃ são mantidas pelo organismo dentro de faixa normal; 2) as concentrações séricas de 25 (OH) D₃ são aproximadamente cem vezes maiores que as de 1,25 (OH)₂ D₃; e 3) a meia-vida do 1,25 (OH)₂ D₃ é de aproximadamente seis horas, enquanto a do 25 (OH) D₃, é de duas a três semanas^(41-42,118-121).

Em nosso estudo os animais suplementados com vitamina D₃ apresentaram aumento dose dependente das concentrações plasmáticas de 25 (OH) D₃. No entanto, a concentração plasmática de 25 (OH) D₃ foi menor no grupo suplementado com 10.000 UI diárias de vitamina D comparado ao grupo suplementado com 5.000 UI diárias de vitamina D. Estudo mostrou que o aumento da concentração sérica de 1,25 (OH)₂ D₃ aumentou a atividade e a expressão da enzima 24-hidroxilase de forma dose dependente⁽¹²²⁾. Esta enzima é responsável por transformar o metabólito 25 (OH) D₃ em 24,25 (OH)₂ D₃. Sendo assim, a menor concentração de 25 (OH) D₃ encontrada nos animais do grupo 10D poderia ser explicada pela formação do metabólito 24,25 (OH)₂ D₃.

As concentrações séricas de fósforo e de cálcio foram maiores nos grupos 5D e 10D em relação ao controle, sendo o aumento na concentração sérica destes minerais dose dependente. Embora tenha aumentado a concentração do cálcio sérico, o maior valor encontrado em média, no grupo 5D, está dentro dos limites de normocalcemia para ratos, encontrados na literatura^(68,87,109,123).

A vitamina D tem papel crucial na homeostasia do cálcio e do fósforo. O 1,25 (OH)₂ D₃ estimula: a absorção intestinal de cálcio e de fósforo, a mobilização de cálcio dos ossos, e a reabsorção renal de cálcio. Assim, a vitamina D mantém a concentração sérica de cálcio e de fósforo controladas⁽¹²⁴⁾.

Hipertensão arterial

A concentração de cálcio é dependente da ingestão deste nutriente e também da atuação de hormônios calcinotrópicos como a calcitonina e o hormônio paratireóide⁽¹²⁵⁾. Inadequada regulação desses hormônios e da vitamina D podem contribuir para a fisiopatologia da hipertensão⁽¹²⁶⁾. Estudos mostraram que hipercalcemias agudas e crônicas são associadas com aumento dos valores da pressão arterial⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾.

Em nosso estudo, os animais suplementados com as doses de 3.000 e 10.000 UI diárias de vitamina D₃ apresentaram maiores valores de pressão sistólica caudal. Mudanças na concentração de cálcio sérico podem afetar a pressão arterial por meio de mudança primária no débito cardíaco e/ou na resistência vascular periférica. Estudos *in vitro* mostraram que o cálcio aumenta contratilidade cardíaca, velocidade de encurtamento da fibra miocárdica e induz contração da musculatura lisa, aumentando débito cardíaco e resistência vascular periférica⁽¹³⁰⁻¹³¹⁾. Além disso, o cálcio regula a síntese e liberação de hormônios vasoconstritores⁽¹³²⁻¹⁴¹⁾ e melhora sua ação vascular⁽¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾.

As maiores concentrações séricas de cálcio encontradas no grupo 10D, em relação ao controle, poderiam explicar o aumento da pressão sistólica nesses animais. Porém, quando realizamos o teste estatístico correlação de Pearson, não encontramos associação entre as concentrações séricas de cálcio e pressão sistólica. Além disso, quando a pressão sistólica é ajustada pela concentração sérica de cálcio na análise de co-variância (ANCOVA), este ajuste não é estatisticamente significante, e os valores da pressão arterial entre os grupos continuam apresentando diferença significativa. Este achado mostra que apenas as alterações nas concentrações séricas de cálcio não explicam as alterações na pressão sistólica. Além disso, estudo realizado por Haffner e colaboradores (2005) em ratos normais, tratados com 0,25 µg/kg de peso corporal por dia de calcitriol, apresentaram aumento da pressão arterial sem aumento nas concentrações séricas de cálcio⁽¹⁴⁵⁾. Outro mecanismo, seria o de alterações na função sistólica. Entretanto, estas variáveis não apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos pelo ecocardiograma. Logo, pode estar ocorrendo o efeito direto da vitamina D₃ sobre o vasculatura com repercussões sobre a pressão arterial. Alguns estudos experimentais mostraram o aumento da pressão arterial em ratos normais tratados com metabólito ativo da vitamina D⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁶⁾.

Sabe-se que a vitamina D exerce diferentes ações biológicas sobre os vasos. Uma das ações da vitamina D é a de regulador negativo do sistema renina angiotensina⁽¹⁴⁷⁾. Em pacientes hipertensos, ou com cardiopatias, ou com doença renal, e ou em animais de experimentação a exacerbação do sistema renina angiotensina faz com que se tenha elevação dos níveis pressóricos e retenção hídrica. A diminuição da síntese de renina pela vitamina D pode ocasionar o controle da pressão arterial⁽¹⁴⁸⁻¹⁵¹⁾. No presente estudo, não seria este o principal mecanismo de ação da vitamina D. O animal utilizado em nosso estudo não tem nenhum motivo para ter aumento no sistema renina angiotensina, e ao

contrário, observamos aumento dos valores da pressão arterial.

Outra ação da vitamina D é agir sobre as células da musculatura lisa vascular (CMLV), e as células endoteliais⁽¹⁵²⁻¹⁵⁵⁾. Estudos mostraram que a administração de 1,25 (OH)₂ D₃ aumentou a reatividade vascular e a força contrátil de grandes artérias⁽¹⁵⁶⁻¹⁶³⁾. Além deste efeito, a vitamina D pode também aumentar a proliferação^(156,161-163) e a migração de CMLV⁽¹⁶⁴⁾ e pode causar calcificação vascular^(161,165-168). Assim, os maiores valores de pressão sistólica observados nos animais suplementados com 3.000 e 10.000 UI diárias de vitamina D podem ser resultado da atuação da vitamina D sobre a vasculatura, aumentando a pressão arterial nesses animais.

Remodelação cardíaca

Em nosso estudo, a suplementação com diferentes doses de vitamina D, não promoveu remodelação cardíaca. Não foram observadas alterações morfológicas e funcionais pelo ecocardiograma, nem alteração de fibrose avaliada histologicamente pela porcentagem de colágeno.

A hipertensão arterial é causa de alterações estruturais cardíacas como hipertrofia ventricular esquerda e fibrose miocárdica⁽¹⁶⁹⁾. Esse processo de remodelação é heterogêneo e os eventos que ocorrem são dependentes do modelo, da gravidade da hipertensão e do tempo de estudo⁽¹⁷⁰⁾.

Em ratos SHR, que apresentavam pressão sistólica média acima de 178 mmHg, foi possível observar hipertrofia ventricular esquerda após 13 semanas, porém o aumento da espessura da parede posterior e fibrose cardíaca só foram significantes após 52 semanas⁽¹⁷¹⁾. Em nosso estudo, os animais que apresentaram maiores valores da pressão sistólica caudal, não apresentaram alterações de morfologia e função cardíaca nem de fibrose intersticial, o

que pode ser explicado pelos níveis não muito elevado de pressão arterial e o tempo em que esses animais ficaram expostos à suplementação de vitamina D.

Metabolismo energético do coração

A regulação do metabolismo cardíaco é complexa e esta associada a vários fatores, tais como, substratos provenientes do plasma, níveis hormonais, fluxo sanguíneo e fornecimento de nutrientes ao tecido⁽¹⁷²⁾. No coração normal os ácidos graxos são os substratos preferidos do miocárdio, contribuindo com 60 a 80% da energia para a síntese do trifosfato de adenosina (ATP). Em situações de estresse cardíaco, a glicose passa a ser a principal fonte de energia⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾. Estudos em humanos e animais mostram que durante a remodelação cardíaca fisiológica, o coração metaboliza mais ácidos graxos, havendo aumento na expressão de genes cardíacos que codificam as enzimas da via da β -oxidação nas mitocôndrias⁽¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾. Enquanto que em situações patológicas, o coração passa a ter preferência em oxidar glicose e lactato, em vez dos ácidos graxos, mostrando características do metabolismo fetal⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾.

Em nosso estudo, animais do grupo 10D apresentaram menores valores da atividade da enzima β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase e aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase em relação ao controle, mostrando mudança na utilização do substrato energético cardíaco compatível com situações patológicas. Tem sido observado que alterações dos substratos do metabolismo contribuem para disfunção do mecanismo de contração e remodelamento do ventrículo esquerdo⁽¹⁰⁵⁾.

Mediadores inflamatórios

Em nosso estudo, animais suplementados com a maior dose de vitamina D₃ apresentaram maiores valores de moduladores inflamatórios no tecido cardíaco. Houve aumento tanto das citocinas pró inflamatórias TNF- α e INF- γ , como da citocina antiinflamatória IL-10, além de aumento na molécula de adesão intercelular 1.

Foi observada em alguns estudos com pacientes com insuficiência cardíaca a elevação de citocinas pró e antiinflamatórias⁽¹⁷⁶⁾. Não é bem conhecido o papel deste aumento de citocinas pró e antiinflamatórias no coração⁽¹⁷⁶⁾. Por outro lado, a vitamina D tem ação no sistema imunológico⁽⁶⁷⁾ regulando a expressão de citocinas pró e antiinflamatórias⁽¹⁷⁷⁾. Assim, o encontro de aumento tanto das citocinas pró inflamatórias TNF- α e INF- γ , como da citocina antiinflamatória IL-10 pode ser a resposta imuno modulatória da vitamina D no coração.

Diferentes patologias cardíacas apresentaram aumento da expressão de citocinas em seu estágio inicial⁽¹⁷⁸⁾. Estudos mostraram que essas citocinas modulam as alterações estruturais e funcionais cardíacas que ocorrem nessas doenças, contribuindo para a remodelação cardíaca⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾. As citocinas podem estimular: 1) a síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO), 2) a degranulação de elastases e proteases, e 3) a liberação de metabólitos do ácido araquidônico e fatores ativadores de plaquetas⁽¹⁸²⁻¹⁸⁵⁾. As EROs podem participar como segundos mensageiros iniciando cascata de sinalização que induz hipertrofia celular e apoptose⁽¹⁸⁶⁻¹⁸⁷⁾. Além disso, as citocinas diminuem o desempenho ventricular esquerdo por meio da alteração da contratilidade miocárdica⁽¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾. Cronicamente, a persistência de valores altos de citocinas, promoveriam a ativação de metaloproteinases, que por sua vez modificariam a matriz intersticial e intensificariam o processo de remodelação cardíaca.

A observação do aumento da expressão de moléculas de adesão, entre elas a ICAM-1, pode significar falência cardíaca⁽¹⁷⁶⁾. Esta molécula proporciona sinalização para auxiliar na infiltração de leucócitos no miocárdio⁽¹⁹¹⁻¹⁹²⁾. Assim, o encontro de maiores valores de ICAM-1 no coração de ratos suplementados com 10.000 UI de vitamina D pode ser representativo de inflamação vascular ou de processo específico de sinalização de lesão miocárdica^(176,193). Sendo assim, o aumento destes mediadores inflamatórios e do ICAM-1 no coração dos animais suplementados com vitamina D₃ pode ocasionar efeitos deletérios no tecido cardíaco se persistirem os valores elevados.

Em resumo, o encontro de alta frequência de hipovitaminose D na população e o conhecimento de que a deficiência desta vitamina está associada com o aparecimento de várias doenças crônicas e que a suplementação controla ou previne doenças. Sendo assim, está ocorrendo uso indiscriminado da vitamina D sem conhecer ao certo os efeitos adversos da vitamina D. Assim, no presente estudo, a suplementação com vitamina D causou alterações que se mantidas podem levar à remodelação cardíaca. Desta forma, outros experimentos de maior duração são necessários para elucidar se vitamina D causa remodelação no coração saudável.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso trabalho mostrou que ratos normais suplementados com vitamina D₃ não apresentam remodelação cardíaca, porém apresentam maiores valores de pressão sistólica, maiores valores de mediadores inflamatórios no coração e alteração na utilização de substrato energético cardíaco. A perpetuação desses achados podem acarretar alterações estruturais e funcionais no coração. A maior parte das alterações observadas são dose dependente.

REFERÊNCIAS

1. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D intake: a global perspective of current status. *J Nutr.* 2005;135:310–6.
2. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ.* 2003;326:469.
3. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:451-9.
4. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266–81.
5. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson- Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2017-29.
6. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008;168:1340-9.
7. Hewison M. Vitamin D and innate immunity. *Curr Opin Investig Drugs* 2008;9:485-90.
8. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-11.
9. James WP. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. *Nut Rev.* 2008;66(5):286-90.
10. Peters BSM, Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. *Ann Nutr Metab.* 2009;54:15–21
11. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Vieira JG, Maeda SS, Borba VZC, Kunii I, Hayashi LF, Lazaretti-Castro M. Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of Sao Paulo, Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;;51(3):437-42.
12. Scalco R, Premaor MO, Froehlich PE, Furlanetto TW. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine.* 2008;33(1):95-100
13. Silva BC, Camargos BM, Fujii JB, Dias EP, Soares MM. Prevalence of vitamin D deficiency and its correlation with PTH, biochemical bone turnover markers and bone

- mineral density, among patients from ambulatories. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(3):482-8.
14. Premaor MO, Alves GV, Crossetti LB, Furlanetto TW. Hyperparathyroidism secondary to hypovitaminosis D in hypoalbuminemic is less intense than in normoalbuminemic patients: a prevalence study in medical inpatients in southern Brazil. *Endocrine.* 2004;24(1):47-53.
 15. Kimball S, Fuleihan GEH, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(4):339-414.
 16. Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:49-59.
 17. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet.* 1982;1:74-6.
 18. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64:1165-8.
 19. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67:373-8.
 20. Ladizesky M, Lu Z, Oliveri B, San Roman N, Diaz S, Holick MF, Mautalen C. Solar ultraviolet B radiation and photoproduction of vitamin D3 in central and southern areas of Argentina. *J Bone Miner Res.* 1995;10:545-9.
 21. Vieth R. What is the optimal vitamin D status for health? *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:26-32.
 22. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Raquitismo e Osteomalácia Calcitriol, 2010 [Capturado em: 20 jan. 2011]. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_raquitismo_e_osteomalacia_.pdf.
 23. Aloia JF, Talwar SA, Pollack S, Feuerman M, Yeh JK. Optimal vitamin D status and serum parathyroid hormone concentrations in African American women. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:602-9.
 24. Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, Margolis KL, Ockene JK, Phillips L, Pottern L. Calcium plus Vitamin D Supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2006;354:684-96.

25. Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, Wactawski-Wende J, Rohan T, Rossouw J, Lane D, O'Sullivan MJ, Yasmeen S, Hiatt RA, Shikany JM, 26. Vitolins M, Khandekar J, Hubbell FA. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;100:1581–91.
26. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:1586–91.
27. McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, Rush D, Wilson PWF, Jacques P. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1996;125:353-9.
28. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 2004;50:72-7.
29. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;62:60-5.
30. Bischoff-Ferrari HA, Shao A, Dawson-Hughes B, Hathcock J, Giovannucci E, Willett WC. Benefit–risk assessment of vitamin D supplementation. *Osteoporos Int.* 2010;21:1121–32
31. IOM report on calcium and vitamin D. Washington, DC: Institute of Medicine, 2010 [Capturado em: 20 jan. 2011]. Disponível em: (<http://www.iom.edu/vitaminD>).
32. Rosen CJ. Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med.* 2011;364:248-54.
33. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:582S-6S.
34. Holmes RP, Kummerow FA. The relationship of adequate and excessive intake of vitamin D to health and disease. *J Am Coll Nutr.* 1983;2:173–99.
35. Parfitt AM. Metacarpal cortical dimensions in hypoparathyroidism, primary hyperparathyroidism and chronic renal failure. *Calcif Tiss Res Suppl.* 1977;22:329–31.
36. Fieser LF, Fieser M. Vitamin D. In: *Steroids*. New York: Reinhold. 1985;90–168.
37. Borradale D, Kimlin M. Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the 'sunshine vitamin'. *Nutr Res Rev.* 2009;22(2):118-36.
38. DeLuca HF. The metabolism, physiology, and function of vitamin D. In: Kumar R, ed. *Vitamin D: Basic and Clinical Aspects*. Boston: M. Nijhoff Publishers, 1984.
39. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol,

- a form of vitamin D₃ metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68:803–4.
40. Lawson DE, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature* 1971;230:228–30.
41. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92:4–8.
42. Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamin D and endocrine diseases. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53:625–33.
43. 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; 2006:129–37.
44. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001:1009–28.
45. Feldman D, Pike JW, Glorieux FH. *Vitamin D*. 2aed. London: Elsevier Academic Press; 2005.
46. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal*. 2009;16;2(75):re4.
47. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 2006;147(12):5542–8.
48. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):491S–9S.
49. Bouillon, R, Carmeliet G, Verlinden L, Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr. Rev*. 2008;29:726–76.
50. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Trends Endocrinol Metab*. 1998;9:419–27.
51. Norman AW. Receptors for 1,25(OH)₂D₃: past, present, and future. *J Bone Miner Res*. 1998;13:1360–9.
52. Civitelli R, Kim YS, Gunsten SL, Fujimori A, Huskey M, Avioli LV, Hruska KA. Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in

- osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1990;127:2253–62
53. Massheimer V, Boland R, de Boland AR. Rapid 1,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMP-dependent pathway. *Cell Signal*. 1994;6:299–304.
54. Boyan BD, Sylvia VL, Curry D, Chang Z, Dean DD, Schwartz Z. Arachidonic acid is an autocoid mediator of the differential action of 1, 25-(OH)₂D₃ and 24, 25-(OH)₂D₃ on growth plate chondrocytes. *J. Cell. Physiol*. 1998;176:516–24.
55. Zanello LP, Norman, AW. Stimulation by 1,25(OH)₂- vitamin D₃ of whole cell chloride currents in osteoblastic ROS 17/2.8 cells: a structure-function study. *J. Biol. Chem*. 1997;272:22617–22.
56. Caffrey JM., Farach-Carson MC. Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem*. 1989;264:20265–74.
57. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C_α and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem*. 1997;272:11902–7.
58. Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 1981;115:1476–83.
59. Verhave G, Siegert CE. Role of vitamin D in cardiovascular disease. *Neth J Med*. 2010;68(3):113-8.
60. Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63(12):1377-86.
61. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D₃-1α-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3-5):316-21.
62. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110:229-38.
63. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem*. 2003;88:327–31.
64. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li YC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol*

- Chem. 2007;282(41):29821-30.
65. Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T. Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*. 2003;144:5138–44.
 66. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smirolto S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol*. 2001;167:1945–53.
 67. 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 2:1717S–20S.
 68. O'Connell TD, Giacherio DA, Jafvis AK, Simpson RU. Inhibition of cardiac myocyte maturation by 1,25 dihydroxivitamin D3. *Endocrinology*. 1995;136(2):482-8.
 69. 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;104:16810-5.
 70. 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 Mol Biol*. 2007;103(3-5):533-7.
 71. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;57:1308–10.
 72. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 1983;221:1181–3.
 73. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension*. 2007;49:1063-9.
 74. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens*. 2007;20:713-9.
 75. Pilz S, März W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, Boehm

- BO, Dobnig H. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3927-35.
76. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med.* 2008;168:1174-80.
 77. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med.* 2008;168:1629-37.
 78. Lind L, Wengle B, Ljunghall S. Blood pressure is lowered by vitamin D (alphacalcidol) during long-term treatment of patients with intermittent hypercalcaemia. A double-blind, placebo controlled study. *Acta Med Scand.* 1987;222:423-7.
 79. Kimura Y, Kawamura M, Owada M, Oshima T, Murooka M, Fujiwara T, Hiramori K. Effectiveness of 1,25-dihydroxyvitamin D supplementation on blood pressure reduction in a pseudo hypoparathyroidism patient with high renin activity. *Intern Med.* 1999;38:31-5.
 80. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1633-7.
 81. Sugiura S, Inaguma D, Kitagawa A, Murata M, Kamimura Y, Sendo S, Hamaguchi K, Nagaya H, Tatematsu M, Kurata K, Yuzawa Y, Matsuo S. Administration of alfacalcidol for patients with predialysis chronic kidney disease may reduce cardiovascular disease events. *Clin Exp Nephrol.* 2010;14(1):43-50.
 82. McGonigle RJ, Fowler MB, Timmis AB, Weston MJ, Parsons V. Uremic cardiomyopathy: potential role of vitamin D and parathyroid hormone. *Nephron.* 1984;36(2):94-100.
 83. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1997;H1751-8.
 84. O'Connell TD, Weishaar RE, Simpson RU. Regulation of myosin isozyme expression by vitamin D3 deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the rat heart. *Endocrinology.* 1994;134(2):899-905.
 85. Weishaar RE, Kim SN, Saunders DE, Simpson RU. Involvement of vitamin D3 with cardiovascular function. III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol.* 1990;258(1 Pt 1):E134-42.

86. O'Connell TD, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of myocardial growth and c-myc levels in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;4;213(1):59-65.
87. Weishar RE, Simpson R. Vitamin D3 and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest.* 1987; 79(6):1706-12.
88. Stio, M., Lunghi, B., Iantomasi, T., Vincenzini, M. T., Treves, C., Effect of vitamin D deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on rat heart metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994;26:1421–8.
89. Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25 (OH) 2 vitamin D3 and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1996;97(7):1577–88.
90. Mancuso P, Rahman A, Hershey SD, Dandu L, Nibbelink KA, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 treatment reduces cardiac hypertrophy and left ventricular diameter in spontaneously hypertensive heart failure-prone (cp/+) rats independent of changes in serum leptin. *Cardiovasc Pharmacol.* 2008;51(6):559–64.
91. Kong J, Kim GH, Wei M, Sun T, Li G, Liu SQ, Li X, Bhan I, Zhao Q, Thadhani R, Li YC. Therapeutic effects of vitamin D analogs on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Pathol.* 2010;177:622–31.
92. Mizobuchi M, Nakamura H, Tokumoto M, Fincha J, Morrissey J, Liapis H, Slatopolsky E. Myocardial effects of VDR activators in renal failure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):188–92.
93. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Gross ML. Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotally nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:778–87.
94. Mitsuhashi T, Morris RC, Ives HR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Modulates Growth of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Clin. Invest.* 1991;87:1889-5.
95. Fairman MP. DNA polymerase delta/PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci.* 1990;95(Pt 1):1-4.
96. Schneider MD, Perryman MB, Payne PA, Spizz G, Roberts R, Olson EN. Autonomous expression of c-myc in BC3H1 cells partially inhibits but does not prevent myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.* 1987;7(5):1973–7.
97. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive

- physiologic response. *FASEB J.* 1991;5:3037–46.
98. 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;41:350–9.
99. 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;35:569-82.
100. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2002;3:371-8.
101. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet.* 2006;367:356-367.
102. McMullen RJ, Jennings LG. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007;34:255-62.
103. Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007;146:26-39.
104. 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;577:769-77.
105. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 2005;85:1093-29.
106. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. Nutrient requirements of laboratory animals. 4aed. Washington D.C: National Academy Press; 1995.
107. Hrubec Z, Neel JV. The National Academy of Sciences--National Research Council Twin Registry: ten years of operation. *Prog Clin Biol Res.* 1978;24:153-72.
108. 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;27:1245-50.
109. 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(1):43-53.
110. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding quantification in M-Mode echocardiography: results of a survey of echocardiography measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-83.
111. Yin FCP, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*. 1982;243(6):H941-7.
112. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol*. 2003;18:225-8.
113. Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Pai-Silva MD, Carvalho RF, Cicogna AC, Padovani CR, Novelli EL, Novo R, Campana AO, Paiva SAR. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicol Sci*. 2006;90:259-66.
114. Aksnes L. A simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of vitamin D, 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human serum. *Scand J Clin Lab Invest*. 1992;52:177-82.
115. Bass A, Brdicka PE, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem*. 1969;10:198-206.
116. Moura RA. Técnicas de laboratório. São Paulo: Atheneu; 1982.
117. 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;72:248-54.
118. Eisman JA, Hamstra AJ, Kream BE, DeLuca HF. A sensitive, precise, and convenient method for determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 1976;176(1):235-43.
119. Weishaar RE, Simpson RU. Vitamin D₃ and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest*. 1987;79(6):1706-12.
120. Giovannucci E. Dietary influences of 1,25(OH)₂ vitamin D in relation to prostate cancer: A hypothesis. *Cancer Causes Control*. 1998;9(6):567-82.
121. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin

- D. J Nutr. 2005;135(2):317-22.
122. Akeno N, Saikatsu S, Kawane T, Horiuchi N. Mouse vitamin D-24-hydroxylase: molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 1997;138:2233-40.
123. Cardús A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res.* 2007;22(6):860-6.
124. DeLuca HF, Schnoes HK. Metabolism and mechanism of action of vitamin D. *Annu Rev Biochem.* 1976;45:631-66
125. DeLuca HF. The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutr Rev.* 1979;37:161-93.
126. Resnick LM, Müller FB, Laragh JH. Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med.* 1986;105(5):649-54.
127. Rosenthal FD, Roy S. Hypertension and hyperparathyroidism. *Br Med J.* 1972;4:396-7.
128. Aoki K, Miyagawa K. Correlation on increased serum calcium with elevated blood pressure and vascular resistance during calcium infusion in normotensive man. *J Hypertens.* 1990;8:579-83.
129. Eiam-Ong S, Eiam-Ong S, Punsin P, Sitprija V, Chaiyabutr N. Acute hypercalcemia-induced hypertension: the roles of calcium channel and alpha-1 adrenergic receptor. *J Med Assoc Thai.* 2004;87(4):410-8.
130. Sonnenblick EH. Force-velocity relations in mammalian heart muscle. *Am J Physiol.* 1962;202:931-6.
131. Johansson B. Vascular smooth muscle reactivity. *Annu Rev Physiol.* 1981;43:359-70.
132. Douglas WW, Rubin RP. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol.* 1961;159:40-57.
133. Poisner AM, Douglas WW. The need for calcium in adrenomedullary secretion evoked by biogenic amines, polypeptides, and muscarinic agents. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;123:62-4.
134. Boullin DJ. The action of extracellular cations on the release of the sympathetic amines transmitted from peripheral nerves. *J Physiol.* 1967;189:85-99.
135. Kirpekar SM, Misu Y. Release of noradrenaline by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium. *J Physiol.* 1967;188:219-34.

136. Kotchen TA, Maull KI, Luke R, Rees D, Flamenbaum W. Effect of acute and chronic calcium administration on plasma renin. *J Clin Invest.* 1974;54:1279-86.
137. Nakazato Y, Douglas WW. Vasopressin release from the isolated neurohypophysis induced by a calcium ionophore, X-537A. *Nature.* 1974;249:479-81.
138. Kisch ES, Dluhy RG, Williams GH. Regulation of renin release by calcium and ammonium ions in normal man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;43:1343-50.
139. Kotchen TA, Galla JH, Luke RG. Effects of calcium on renin and aldosterone in the rat. *Am J Physiol.* 1977;232(4):E388-93.
140. Park CS, Han DS, Fray JCS. Calcium in the control of renin secretion: Ca^{2+} influx as an inhibitory signal. *Am J Physiol.* 1981;240(1):F70-4.
141. Ishikawa S, Handelman WA, Schrier RW, Berl T. In vivo effect of cellular calcium uptake on osmotic and nonosmotic release of arginine vasopressin. *Kidney Int.* 1982;21:813-9.
142. Fanner JB, Campbell IK. Calcium and magnesium ions: influence on the response of an isolated artery to sympathetic nerve stimulation, noradrenaline and tyramine. *Br J Pharmacol Chemother.* 1967;29:319-28.
143. Paiva ACM, Paiva TB, Miyamoto ME, Nakaie CR. The role of calcium in the response of rabbit aorta to angiotensin. *Mayo Clin Proc.* 1977;52:427-9.
144. Goldberg JP, Schrier RW. Effect of calcium membrane blockers on in vivo vasoconstrictor properties of norepinephrine, angiotensin II and vasopressin. *Miner Electrolyte Metab.* 1984;10:178-83.
145. Haffner D, Hoher B, Muller D, Simon K, König K, Richter CM, Eggert B, Schwarz J, Godes M, Nissel R, Querfeld U. Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)₂D₃. *J Hypertens.* 2005;23:1067-75.
146. Bukoski RD, Xue H. On the vascular inotropic action of 1,25-(OH)₂ vitamin-D₃. *Am J Hypertens.* 1993;6:388-96.
147. Li Y, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu S, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002;110:229-38.
148. Feres T, Vianna LM, Paiva AC, Paiva TB. Effect of treatment with vitamin D₃ on the responses of the duodenum of spontaneously hypertensive rats to bradykinin and to potassium. *Br J Pharmacol.* 1992;105(4):881-4.
149. Borges ACR, Feres T, Vianna LM, Paiva TB. Recovery of impaired K⁺ channels in

- mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats by prolonged treatment with cholecalciferol. *Br J Pharmacol.* 1999;127(3):772–8.
150. Pfeifer M., Begerow B, Minne, HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short term vitamin D3 and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:1633–7..
151. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet. Med.* 2008;25:320–5.
152. Merke J, Milde P, Lewicka S, Hügel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest.* 1989;83(6):1903-15.
153. Mitsuhashi T, Morris RC, Ives HE. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Modulates Growth of Vascular Smooth Muscle Cells. *J Clin Invest.* 1991;87:1889-95.
154. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D (3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:621–9.
155. Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O, Jaccard N, Knoll E, Stern N. 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation.* 2005;111:1666-71.
156. Koh E, Morimoto S, Fukuo K, Itoh K, Hironaka T, Shiraishi T, Onishi T, Kumahara Y. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. *Life Sci.* 1988;42:215-23.
157. Bukoski RD, Wang DB, Wagman DW. Injection of 1,25 vitamin D enhances resistance artery contractile properties. *Hypertension.* 1990;16:523-31.
158. Bukoski RD, Li J, Bo J. Effect of long-term administration of calcitriol on blood pressure and resistance artery contractility in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1993;6:944-50.
159. Bukoski RD, Xue H. On the vascular inotropic action of calcitriol. *Am J Hypertens.* 1993;6:388-96.

160. Hatton DC, Xue H, DeMerritt J, McCarron DA. 1,25 (OH)₂ vitamin D₃-induced alterations in vascular reactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Med Sci*. 1994;307:S154-8.
161. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation*. 1998;98:1302-6.
162. Cardús A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernández E, Valdivielso JM. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int*. 2006;69:1377-84.
163. Tukaj C. Enhanced proliferation of aortal smooth muscle cells treated by 1,25(OH)₂D₃ in vitro coincides with impaired formation of elastic fibres. *Int J Exp Pathol*. 2008;89:117-24.
164. Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res*. 2002;91:17-24.
165. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res*. 2006;21:484-90.
166. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzen E, Towler DA, Lacey D, Martin D. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:1370-7.
167. Hirata M, Katsumata K, Endo K, Fukushima N, Ohkawa H, Fukagawa M. In subtotally nephrectomized rats 22-oxacalcitriol suppresses parathyroid hormone with less risk of cardiovascular calcification or deterioration of residual renal function than 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1770-1776.
168. Lopez I, Aguilera-Tejero E, Mendoza FJ, Almaden Y, Perez J, Martin D, Rodriguez M. Calcimimetic R-568 decreases extraosseous calcifications in uremic rats treated with calcitriol. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 795-804.
169. Kenchaiah S, Pfeffer MA. Cardiac remodeling in systemic hypertension. *Med Clin North Am*. 2004;88(1):115-30.
170. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 1990;67:1355-64.

171. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1979;237(4):H461-8.
172. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. *Card. Res.* 1997;33:243-257.
173. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schönekeess BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochem. Biophys.* 1994;1213:263-76.
174. Sabbah HN, Stanley CW. Partial fatty acid oxidation inhibitors: a potentially new class of drugs for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002;4:3-6.
175. Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR, Hintze TH, Lopaschuk GD, Recchia FA. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor in pacing induced heart failure. *Circulation* 2002;106:606-612.
176. Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J Am Coll Cardiol.* 2009;24;53(12):1013-20.
177. Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD. Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Ann Intern Med.* 2010 Mar 2;152(5):315-23.
178. Sasayama S, Matsumori A, Kihara Y. New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999 Jun;42(3):557-64
179. Hosenpud JD, Campbell SM, Pan G. Indirect inhibition of myocyte RNA and protein synthesis by interleukin-1. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22:213–25.
180. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998;97:1382–91.
181. Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, Inoko M, Ono K, Iwanaga Y, Yamada T, Iwasaki A, Matushima K, Sasayama S. Increased expression of interleukin-1 β and monocyte chemoattractant and activating factor /monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ Res.* 1997;81:664–71.
182. Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JCJ, Cain BS, Shames BD, Meng X, Harken

- AH. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor α mediated cardiac injury by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanisms. *Surgery*. 1998;124:291–6.
183. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. *Circulation* 1998;98:794–9.
 184. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, 62. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1999;43:860–78.
 185. Machida Y, Kubota T, Kawamura N, Funakoshi H, Ide T, Utsumi H, Li YY, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of tumor necrosis factor α increases production of hydroxyl radical in murine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;284:H449–H455.
 186. Sia YT, Parker TG, Liu P, Tsoporis JN, Adam A, Rouleau JL. Improved post-myocardial infarction survival with probucol in rats: effects on left ventricular function, morphology, cardiac oxidative stress and cytokine expression. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:148–56.
 187. Khaper N, Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI-rats. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1461–6.
 188. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*. 1993;92: 2303–12.
 189. Goldhaber JI. Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1996;271:H823–33.
 190. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*. 2000;87:241–7.
 191. Jaakkola K, Jalkanen S, Kaunistaki K, et al. Vascular adhesion protein-1, intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin mediate leukocyte binding to ischemic heart in humans *J Am Coll Cardiol* 2000;36:122-129.
 192. Wilhelmi MH, Leyh RG, Wilhelmi M, et al. Upregulation of endothelial adhesion molecules in hearts with congestive and ischemic cardiomyopathy: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:122-127.

193. Yin WH, Chen JW, Young MS, et al. Increased endothelial monocyte adhesiveness is related to clinical outcomes in chronic heart failure Int J Cardiol 2007;121:276-283.