



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Bruna Letícia Buzati Pereira

**Influência da suplementação de tomate e licopeno
na remodelação cardíaca após infarto agudo do
miocárdio**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci
Coorientador: Prof. Tit. Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientadora: Prof.^a Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

**Botucatu
2015**

Bruna Letícia Buzati Pereira

Influência da suplementação de tomate e
licopeno na remodelação cardíaca após infarto
agudo do miocárdio

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci
Coorientador: Prof. Tit. Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientadora: Prof.^a Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Bruna Letícia Buzati.

Influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio / Bruna Letícia Buzati Pereira. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Marcos Ferreira Minicucci
Coorientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Paula Schmidt Azevedo Gaiolla
Capes: 40101100

1. Cardiologia. 2. Infarto do miocárdio. 3. Stress oxidativo. 4. Antioxidantes. 5. Tomate.

Palavras-chave: Cardiologia; Infarto; licopeno; tomate.

Dedicat3ria

Aos meus pais Edson e Conceição, por todo o amor e incentivo durante toda a minha vida. Meus ídolos.

Ao meu irmão Renan, meu espelho de foco, sensatez e simpatia.

À minha amiga e irmã por opção Ana Carolina, por ser minha família longe de casa e pela alegria e força diária com tanta meiguice.

Aos meus avós Moacir (in memoriam), Aurora, Artur (in memoriam) e Olívia, pela sabedoria e incentivo aos estudos diante de toda humildade.

Amo vocês.

Agradecimento especial

*Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Ferreira
Minicucci, por todo empenho, disponibilidade,
paciência e carinho.*

*Obrigada pela confiança e por ter despertado em mim a
paixão pela pesquisa. Cresci muito e sou orgulhosa em
tê-lo como exemplo diante de tanta competência.*

Agradecimientos

A Deus, por todas as bênçãos concedidas em minha vida.

Ao meu coorientador Prof. Tit. Sergio Alberto Rupp de Paiva, por toda dedicação, competência e carinho. Meu ídolo desde a graduação.

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Leonardo A. M. Zornoff e Katashi Okoshi, pelos ensinamentos, suporte e disponibilidade para realização dos procedimentos.

À Marina P. Okoshi e Bertha P. Furlan, pela imprescindível contribuição durante o decorrer do projeto e no exame de qualificação.

À minha equipe de laboratório e agora grandes amigos, Renata, Renan, Fernanda, Amanda, Ana Carolina, Pamela, Priscila, Bruna, Andrea e Diego por toda a colaboração, ensinamentos, incentivos e alegria diária. Vocês são demais.

A todos os funcionários da Biblioteca e da seção de Pós-Graduação pela competência.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica, Elizângela Silva, Bruno Fajjoli, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Laura Câmara, Ana Mengue e Mario Dallaqua e por todo apoio e suma importância no transcorrer do projeto.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica, José Carlos Georgette, Sueli Clara, Elenize Jamas, Vitor Souza, Rogério Monteiro, José Ap. De Souza, e em especial ao Mário Bruno e Carlinhos, que com muita dedicação contribuíram para a realização deste trabalho. Vocês foram essenciais.

À Dr.^a Fernanda Chiuso Minicucci e Prof.^a Dra. Ana Angélica H. Fernandes do Instituto de Biociências – UNESP, pela realização das análises.

À Prof. Dra. Léa Silvia Sant´ana, da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu – UNESP; ao Prof. Alceu Afonso Jordão Júnior e Livia M. C. Simões, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; e ao Prof. Dr. Marcos Franke Pinto da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pela colaboração com as análises.

À minha família, em especial ao meu padrinho Silvonei, meu tio Czeslaw e minha prima Larissa, pelo incentivo e orações diárias e pela participação ativa nesse projeto.

Aos meus amigos Fernanda e Mário pelo incentivo e alegria diária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2012/17414-0) e CNPq pelo suporte financeiro (auxílio pesquisa) e à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2012/16471-0).

Muito Obrigada.

*“Viva como se você fosse morrer
amanhã. Aprenda como se você
fosse viver para sempre”.*
- Gandhi

Lista de abreviações

+dP/dtmax	derivada positiva máxima de pressão
AE	diâmetro do átrio esquerdo
ASM	áreas seccional transversa dos miócitos
BHT	butil-hidroxitolueno
CAT	catalase
DDVE	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
-dP/dtmax	derivada negativa máxima de pressão
DSVE	diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
E/A	razão entre as ondas E e A
EDPP	espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERA	elemento de resposta antioxidante
EROs	espécies reativas de oxigênio
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	hematoxilina - eosina
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	grupo infarto controle
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IDR	ingestão diária recomendada
IFN- γ	interferon gama
IL	grupo infarto licopeno
IL-10	interleucina 10
IMVE	índice de massa do VE
IT	grupo infarto tomate

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	nitroblue-tetrazólico
NF-kB	<i>nuclear factor kappa B</i>
Nrf-2	<i>nuclear factor E2-related factor2</i>
onda A	pico de velocidade do enchimento diastólico tardio
onda E	pico de velocidade do enchimento diastólico inicial
PC	peso corporal
PD	pressão desenvolvida
SC	grupo sham controle
SL	grupo sham licopeno
SOD	superóxido dismutase
ST	grupo sham tomate
TDE	tempo de desaceleração da onda E
THF	tetrahidrofurano
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRIV	tempo de relaxamento isovolumétrico
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo
VEPP	velocidade de encurtamento da parede posterior

Sumário

Resumo	06
Abstract	10
Introdução	14
Hipótese	19
Objetivo	21
Materiais e métodos	23
Resultados	37
Discussão	56
Conclusões	63
Referências	65

Índice de tabelas

Tabela 1. Composição centesimal dos tomates e extratos de tomate industrializados	27
Tabela 2. Variáveis morfológicas	41
Tabela 3. Variáveis estruturais avaliadas pelo ecocardiograma	42
Tabela 4. Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma	43
Tabela 5. Dados do estudo do coração isolado	45
Tabela 6. Mediadores inflamatórios	46
Tabela 7. Proteínas por <i>Western Blot</i>	48
Tabela 8. Estudo histológico por microscopia óptica	54
Tabela 9. Estresse oxidativo no tecido cardíaco	55

Índice de figuras

Figura 1. Fotografias dos extratos de tomate industrializado	26
Figura 2. Infarto experimental	28
Figura 3. Aparato do coração isolado	31
Figura 4. Média de ganho de peso corporal	38
Figura 5. <i>Western blot</i> - <i>Nrf-2</i>	49
Figura 6. <i>Western blot</i> - <i>NF-κB</i>	50
Figura 7. <i>Western blot</i> - <i>pNF-κB</i>	51
Figura 8. <i>Western blot</i> - <i>NF-κB/pNF-κB</i>	52

Resumo

Introdução: A insuficiência cardíaca é uma frequente complicação após o infarto agudo do miocárdio (IAM), sendo que a remodelação cardíaca apresenta papel de destaque nesse cenário. O aumento do estresse oxidativo e do processo inflamatório estão associados com a remodelação cardíaca após o IAM. Devido ao grande impacto sócio econômico e às altas taxas de mortalidade, torna-se relevante a identificação de outros fatores que modulem o processo de remodelação cardíaca e podemos destacar a suplementação de alimentos com propriedades antioxidantes, como o tomate (*Lycopersicon esculentum*), e um de seus principais constituintes, o licopeno.

Objetivo: Avaliar a influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após o IAM.

Materiais e métodos: Ratos *Wistar* machos, com peso entre 200 e 250g, foram submetidos ao infarto experimental ou à cirurgia simulada e alocados em seis grupos: 1) grupo Sham (animais submetidos à cirurgia simulada) alimentado com dieta padrão (grupo-SC); 2) grupo Sham alimentado com dieta suplementada com licopeno 1mg/kg peso corporal/dia (grupo-SL); 3) grupo Sham alimentado com dieta suplementada com tomate (grupo-ST); 4) grupo infartado (animais submetidos ao infarto experimental) alimentado com dieta padrão (grupo-IC); 5) grupo infartado alimentado com dieta suplementada com licopeno 1mg/kg de peso corporal/dia (grupo-IL); 6) grupo infartado alimentado com dieta suplementada com tomate (grupo-IT). O licopeno e o tomate das dietas foram diluídos em óleo de milho para serem adicionados à ração (0,5ml de óleo/kg de peso corporal/dia) e os grupos controles tiveram a mesma quantidade de óleo adicionado. Após três meses de observação os animais foram submetidos ao estudo funcional, morfométrico, e bioquímico. Os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão. As variáveis que não preencheram os critérios de normalidade e de igualdade de variância foram normalizadas antes da análise. As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância de duas vias (ANOVA). Para os dados não normalizados, foram utilizados os testes de *Kruskal-Wallis* (comparação entre os grupos SHAM, SC, SL e ST; e entre os grupos infartados IC, IL e IT) e *Mann-Whitney* (comparação entre os grupos SC e IC; SL e IL e ST e IT) seguidos pela correção por *Bonferroni* (multiplicamos o valor de p por 5, visto termos realizado 5 comparações). Para comparação dos tamanhos dos infartos: ANOVA de uma via. Para a comparação da mortalidade: Chi-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados: Os grupos suplementados com licopeno apresentaram peso corporal maior que os grupos suplementados com tomate e com ração controle. O ganho de peso médio por grupo foi: (IC (n=13): 44,8±9,4%; IL (n=16): 38,1±6,1%; IT (n=15): 41,6±7,7%; p=0,070). Até 48 horas após a cirurgia do infarto houve mortalidade de 47% e durante o acompanhamento morreu 1 rato SC e 1 IL. Não houve diferença na mortalidade entre os grupos (p=0,601). O IAM induziu alterações morfológicas e funcionais no ventrículo esquerdo (VE). No ecocardiograma, houve aumento das câmaras cardíacas esquerdas: diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetros e áreas sistólica e diastólica do VE. Houve aumento da espessura da parede do VE quando comparados os grupos SC e IC, SL e IL, ST e IT. O infarto aumentou o IMVE. Os grupos suplementados com licopeno apresentaram valores menores do diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal quando comparados aos grupos que receberam ração controle. O diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal foi menor nos grupos suplementados com licopeno quando comparados aos grupos suplementados com tomate e com ração controle. O IAM aumentou o tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca e reduziu a fração de variação de área e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE. No estudo do coração isolado, o IAM reduziu tanto a derivada positiva (+dP/dtmax) quanto a derivada negativa (-dP/dtmax) máxima e a pressão desenvolvida. Houve interação entre o infarto e a suplementação de licopeno e tomate na +dP/dtmax e -dP/dtmax. A +dP/dtmax e a -dP/dtmax do grupo SC foi maior que do grupo IC; dos animais do grupo SL foi maior que do grupo IL e do ST foi maior que do grupo IT. A +dP/dtmax do grupo SC foi maior que do grupo SL. Houve interação entre o infarto e a suplementação de licopeno e tomate nos valores de TNF- α e IL-10. Em relação ao TNF- α , o grupo IT apresentou valores menores quando comparado ao grupo IC e ST. Em relação aos valores de IL-10, o grupo IT apresentou valores menores que o grupo ST. O IAM provocou diminuição dos valores de IFN- γ . Não houve diferença em relação à expressão do *NF- κ B* total e fosforilado e na relação entre os dois. O infarto provocou aumento da expressão de *NF- κ B* fosforilado e o colágeno tipo III e diminuição do *Nrf-2*. Houve diferença na área seccional do miócito entre os grupos SC e ST e SC e SL. O grupo IT apresentou menores áreas do que o grupo IC. A concentração de hidroperóxido de lipídio foi maior no grupo IC do que no SC. Em relação à catalase, houve interação entre os fatores infarto e a suplementação de tomate e licopeno. O grupo IC apresentou atividade da CAT menor em comparação com o grupo SC. O grupo ST apresentou atividade de catalase maior que o SL e SC. Os grupos IT e IL também apresentaram atividade de catalase no

miocárdio maiores que o grupo IC. Para a superóxido dismutase, esta foi menor no grupo SC em relação ao grupo SL e sua atividade foi ainda menor no grupo ST. Nos grupos submetidos ao IAM e suplementados com tomate ou licopeno apresentaram atividades de superóxido dismutase menores que o grupo IC. Em relação à glutathiona peroxidase houve interação entre as variáveis. O grupo IC apresentou atividade da GSH-Px no miocárdio menor que o grupo SC, o mesmo ocorrendo entre os grupos suplementados com licopeno IL e SL, e com tomate IT e ST. Nos grupos Sham a suplementação com tomate e licopeno aumentaram a atividade da glutathiona peroxidase em relação ao grupo SC, mas esse aumento foi maior no grupo ST que no SL. Nos grupos submetidos ao infarto apenas a suplementação com tomate aumentou as concentrações miocárdicas da glutathiona peroxidase.

Conclusão: Em conclusão, a suplementação de tomate e licopeno atenuou o processo de remodelação cardíaca. A suplementação de licopeno atenuou o estresse oxidativo cardíaco e a suplementação de tomate tanto o estresse oxidativo quanto o processo inflamatório nesse modelo. É interessante observarmos que a suplementação de tomate foi mais efetiva em atenuar o estresse oxidativo que a de licopeno isolada, sugerindo maior benefício da suplementação do tomate.

Abstract

Introduction: Heart failure is a common complication after the acute myocardial infarction (AMI), and cardiac remodeling has a prominent role in this scenario. Increased oxidative stress and inflammation are associated with cardiac remodeling after AMI. Due to the great economic and social and high mortality rates, it's important to identify other factors that modulate the process of cardiac remodeling and among this factors are the supplementation of foods with antioxidant properties, such as tomato (*Lycopersicon esculentum*), and of its primary constituents, the lycopene.

Objectives: Evaluate the influence of tomato and lycopene supplementation in cardiac remodeling after AMI.

Methods: Male Wistar rats, weighing between 200 and 250g, were submitted to the experimental infarction or sham surgery and divided into six groups: 1) Sham group (animals undergoing sham surgery) fed a standard diet (SC group); 2) Sham group fed diet supplemented with 1 mg lycopene/kg body/day (SL group); 3) Sham group fed diet supplemented with tomato (ST group); 4) infarcted group (animals submitted to experimental infarction) fed a standard diet (IC group); 5) infarcted group fed diet supplemented with 1 mg lycopene/kg of body weight/day (IL group); 6) infarcted group fed diet supplemented with tomato (IT group). The lycopene and the tomato were dilute in corn oil to be add into the diet (0.5 ml of corn oil/kg body weight/day) and the standard group received the same oil. After three months of observation the animals underwent functional, morphometric and biochemical analysis. The values were expressed as mean \pm standard deviation. The variables that did not meet the criteria of normality and equal variance were normalized before analysis. Comparisons between groups were made by two-way analysis of variance (ANOVA). For non-normalized data, we used Kruskal-Wallis test (comparison between the Sham groups, SC, SL and ST, and between the infarcted groups CI, IL and IT)) and Mann-Whitney (comparison between the SC and IC groups; SL and IL and ST and IT) followed by Bonferroni correction (p value was multiplied by 5, as we have performed 5 comparisons). For comparison of infarct size we used one-way ANOVA. For mortality comparison Chi-square test was used. The significance level was 5%.

Results: The groups supplemented with lycopene showed higher body weight than the supplemented groups with tomatoes and control diet. The average weight gain per group was:

(IC (n = 13): $44.8 \pm 9.4\%$; IL (n = 16): $38.1 \pm 6.1\%$; IT (n = 15): $41.6 \pm 7.7\%$; $p = 0.070$). Up to 48 hours after myocardial infarction the mortality was 47% and during the follow up there were 1 death in SC group and 1 in IL group. There was no difference in mortality between the groups ($p = 0.601$). In the echocardiographic analysis, the AMI induced morphological and functional changes in the left ventricle (LV). There was enlargement of the left heart chambers: diameter of the left atrium (LA) and systolic diameters and areas and diastolic LV. There was an increase in the thickness of the LV wall when compared to SC and IC groups, SL and IL groups, ST and IT groups. Myocardial infarction increased LVMI. The groups supplemented with lycopene had lower values of left atrial diameter adjusted for body weight when compared to the control diet groups. The LV diastolic diameter corrected by body weight was lower in groups supplemented with lycopene compared to groups supplemented with tomato and control diet. The IAM increased the isovolumetric relaxation time corrected by heart rate and reduced the area variation fraction and the LV posterior wall shortening velocity. There was a reduction in LV shortening in the comparison between infarcted with Sham groups. In the isolated heart study, the AMI reduced both the maximum rate of ventricular pressure rise (+dP/dt max) as the decreased maximum rate of ventricular pressure rise (-dP/dt max) and the maximum developed pressure. There was interaction between the infarction and supplementation of lycopene and tomato on + dP/dt max and -dP/dt max. The +dP/dt max and -dP/dt max were higher in SC group than in IC group; higher in SL group compared with IL group, and higher in ST group compared with IT group. The +dP/dt max was higher in SC group compared with SL group. There was interaction between the infarction and supplementation of lycopene and tomato in TNF- α and IL-10 values. In relation to TNF- α , the IT group showed lower values when compared to IC and ST groups. Regarding IL-10 values, the IT group showed lower values than the ST group. The AMI decreased IFN- γ values. There was no difference in relation to Nrf-2 expression, total and phosphorylated NF-kB, and the ratio between total/phosphor NF-kB. Myocardial infarction increased phosphorylated NF-kB and type III collagen expression. The myocyte cross sectional area was higher in SC group compared to SL and ST groups. The IT group had smaller areas than the IC group. The concentration of lipid hydroperoxide was higher in IC group than in the SC group. Regarding catalase, an interaction between myocardial infarction and supplementation of tomato and lycopene was observed. The IC group showed lower CAT activity compared with the SC group. The ST group showed higher catalase activity than the SL and SC groups. The IT and IL groups also showed higher catalase activity in the

myocardium that the IC group. Regarding superoxide dismutase, its activity was lower in the SC group compared to SL group, and lower in ST group compared with SL. In addition, infarcted animals, supplemented with tomato or lycopene showed lower superoxide dismutase activities that the IC group. Regarding glutathione peroxidase activity, there was no interaction between variables. The IC group had GSH-Px activity lower than the SC group, as well as between the groups supplemented with lycopene, IL and SL, and between the groups supplemented with tomato. In Sham groups supplementation with tomato and lycopene increased the activity of glutathione peroxidase in relation to SC, but this increase was higher in the ST group compared to SL group. In the groups submitted to myocardial infarction, only tomato supplementation increased myocardial concentrations of glutathione peroxidase.

Conclusion: In conclusion, lycopene and tomato supplementation attenuated cardiac remodeling after myocardial infarction. Lycopene supplementation attenuated cardiac oxidative stress and tomato supplementation both oxidative stress and the inflammatory process in this model. It is interesting to observe that tomato supplementation was more effective in attenuating oxidative stress than isolated lycopene, suggesting greater benefit with tomato supplementation.

Introdução

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2030, as doenças cardiovasculares serão responsáveis por aproximadamente 23,6 milhões de óbitos em todo o mundo. No Brasil, em 2009, elas representaram a terceira causa de internações pelo Sistema Único de Saúde, com mais de um milhão de hospitalizações^{1,3}.

Dentre as doenças cardiovasculares, podemos destacar as síndromes coronarianas agudas, principalmente o infarto agudo do miocárdio (IAM) com e sem supradesnivelamento do segmento ST. Estudos epidemiológicos mostraram que 40% dos IAM com supradesnivelamento do segmento ST evoluem com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e 25% com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca⁴. Logo a insuficiência cardíaca é frequente complicação após o IAM.

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é definido como foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas consequentes da morte celular cardíaca⁵. Diversos fatores influenciam o desenvolvimento de insuficiência cardíaca após o infarto, sendo que a remodelação cardíaca apresenta papel de destaque nesse cenário.

As alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a região infartada como a não infartada, estão sendo estudadas nos últimos anos com o nome de remodelação ventricular ou cardíaca. A remodelação cardíaca é definida como alterações genéticas, morfológicas e bioquímicas, que se manifestam clinicamente por mudanças no tamanho, massa, geometria e na função do coração em resposta à determinada agressão⁶⁻⁹.

O processo de remodelação após o IAM apresenta algumas particularidades. A perda aguda de miócitos que ocorre logo após o infarto é acompanhada pela degradação do colágeno interfibrilar que mantém o alinhamento entre os miócitos. A degradação desse colágeno ocorre principalmente pela ativação das metaloproteinases e promove o deslizamento dos miócitos necróticos e o realinhamento dos mesmos em série¹⁰⁻¹², processo conhecido como expansão do infarto⁶⁻¹⁰.

Em decorrência da expansão do infarto, o ventrículo esquerdo (VE) perde sua forma elíptica e assume a conformação esférica causando elevação do estresse parietal diastólico e sistólico, principalmente na região apical do VE. O aumento do estresse parietal é importante estímulo para a síntese de sarcômeros, preferencialmente em série^{8,9}. Cronicamente, ocorre aumento do raio da cavidade e redução da espessura da parede ventricular esquerda, alterações características da hipertrofia excêntrica. Todas essas alterações também envolvem a

região não infartada e ativam os sistemas neuro-hormonais, como o sistema nervoso autônomo simpático e o renina-angiotensina-aldosterona⁸⁻⁹.

A princípio, a remodelação cardíaca é um processo adaptativo que tenta manter a função cardíaca. Cronicamente, entretanto, com a continuidade do processo, ocorre disfunção ventricular progressiva e morte⁶⁻⁸. Diversos fatores estão associados com a remodelação cardíaca após o IAM e dentre eles podemos destacar o aumento do estresse oxidativo e do processo inflamatório¹¹.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio, e/ou diminuição de antioxidantes endógenos. Após o IAM ocorre aumento da produção de EROs no miocárdio isquêmico. As principais fontes dessas EROs são as enzimas xantina oxidase nas células endoteliais, as reações da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase nas células inflamatórias, principalmente neutrófilos¹¹.

As EROs, em quantidades micromolares, podem lesar diretamente o miócito e desencadear diversos processos patológicos. Em modelos experimentais de camundongos transgênicos em que a enzima superóxido dismutase estava “superexpressa”, houve redução do tamanho do infarto sugerindo efeitos deletérios das EROs⁸⁻¹⁰. Além disso, o excesso de radicais livres pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana dos miócitos, em arritmias e na redução da função sistólica¹¹. No entanto, a produção de EROs em escalas nanomolares é considerada fundamental e atua como segundo mensageiro intracelular.

Além das EROS, citocinas pró-inflamatórias também são produzidas pelo miocárdio isquêmico. As EROS estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e vice-versa. Entre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ). O aumento do IFN- γ e, principalmente do TNF- α , está associado à disfunção ventricular, caquexia, apoptose, hipertrofia e fibrose¹²⁻¹⁴.

Diante disso, o estresse oxidativo e o processo inflamatório são potenciais alvos para atenuar o processo de remodelação ventricular após o infarto.

Com a finalidade de atenuar a remodelação e reduzir a mortalidade após o IAM, tem-se utilizado, nos últimos anos, estratégias como os inibidores da enzima de conversão da angiotensina II, os betabloqueadores, os bloqueadores da aldosterona e mais recentemente os inibidores da neprilisina. No entanto, devido ao grande impacto sócio econômico e às altas

taxas de mortalidade, torna-se relevante a identificação de outros fatores que modulem o processo de remodelação ventricular¹⁵⁻¹⁷. Entre esses fatores destacam-se a suplementação de alimentos com propriedades antioxidantes, como o tomate (*Lycopersicon esculentum*), e um de seus principais constituintes, o licopeno.

O licopeno é o principal pigmento responsável pela coloração vermelha dos tomates maduros e produtos à base de tomate¹⁸. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o licopeno atua como um potente antioxidante¹⁹.

O licopeno é o mais eficiente sequestrador de oxigênio *singlet* e de radicais peróxil entre os carotenoides. Além disso, o licopeno pode modular a produção de enzimas antioxidantes e de citocinas inflamatórias, principalmente devido suas ações no *nuclear factor E2-related factor2 (Nrf-2)* e no *nuclear factor kappa B (NF-κB)*. O *Nrf-2* é um fator de transcrição nuclear que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ERA) no DNA estimulando a transcrição de diversas enzimas antioxidantes, entre elas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a tioredoxina^{20,21}. Diversos estudos experimentais já mostraram que a administração de licopeno aumenta a expressão de enzimas antioxidantes via *Nrf-2/ERA*²¹⁻²⁴.

O *NF-κB* também é importante fator transcricional relacionado tanto ao estresse oxidativo quanto ao processo inflamatório. Hung e colaboradores, mostraram, em estudo com células endoteliais humanas, que a administração de licopeno reduziu a ativação do *NF-κB* e a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) via redução de *TNF-α*²⁵.

Em decorrência de todos esses potenciais efeitos benéficos do licopeno e dos diversos estudos epidemiológicos que associam o seu consumo à redução do risco cardiovascular é que este carotenoide vem sendo estudado atualmente em modelos experimentais de agressão ao coração²⁶⁻³⁰.

Em modelos de cardiotoxicidade aguda induzida por doxorubicina, a suplementação de licopeno reduziu as alterações histológicas tanto nucleares quanto citoplasmáticas dos miócitos causadas pelo quimioterápico sem, no entanto, interferir com variáveis funcionais²⁹. Além disso, essa suplementação reduziu o dano oxidativo no *DNA (deoxyribonucleic acid)* avaliado pelo teste do cometa³¹.

Gitenay e colaboradores mostraram em modelo de rato com deficiência de vitamina E que a suplementação tanto de tomate quanto de licopeno reduziu o estresse oxidativo no coração desses animais. Nesse estudo é interessante observar que essa redução foi mais importante no grupo suplementado com tomate³².

O licopeno representa 90% do total de carotenoides e outros fitoquímicos presentes nos tomates. Entretanto, a participação de outros carotenoides no efeito antioxidante do tomate não pode ser descartada^{32,33}. Além disso, a sinergia entre todos os fitoquímicos pode fazer com que o tomate tenha efeito mais importante que o licopeno na redução do estresse oxidativo³⁴. Por isso, atualmente, tem-se proposto priorizar a seleção de alimentos e hábitos alimentares em geral ao invés do consumo de nutrientes isolados ou fatores dietéticos específicos^{23,35}.

Em relação aos modelos experimentais de isquemia miocárdica, a suplementação de licopeno foi estudada em modelos de IAM induzidos por isoproterenol e de isquemia e reperfusão. No entanto, nesses estudos, o licopeno foi administrado antes da injúria miocárdica. Mohamadin e colaboradores suplementaram ratos *Sprague Dawley* com 4mg/kg/dia de licopeno por 21 dias e após induziram IAM com isoproterenol. Logo após a lesão os ratos foram sacrificados e os autores mostraram que a suplementação de licopeno antes do IAM diminuiu a atividade das enzimas lisossomais no coração bem como os marcadores de estresse oxidativo³⁶. Upaganlawar e colaboradores, utilizando o mesmo modelo, mostraram que o tratamento prévio com licopeno 10mg/kg/dia por 30 dias atenuou as alterações eletrocardiográficas, hemodinâmicas, bioquímicas e a apoptose causada pelo isoproterenol³⁷. Além disso, em modelo de isquemia e reperfusão, a suplementação de 1mg/kg/dia de licopeno por 30 dias reduziu o estresse oxidativo, o que resultou em redução da injúria miocárdica³⁵.

No entanto, a influência do tomate e do licopeno na remodelação cardíaca após o IAM ainda não foi estudada. Os dados e comentários expostos permitiram elaborar a hipótese de que a suplementação de tomate e licopeno atenua a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio. Além disso, acreditamos que a suplementação de tomate seja mais benéfica que a do licopeno sozinha. Entre outros mecanismos fisiopatológicos, acreditamos que a redução do processo inflamatório e do estresse oxidativo poderiam ser os processos envolvidos nas ações do tomate e licopeno nesse modelo.

Hipótese

- A suplementação de tomate e licopeno atenua a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio.
- A suplementação do tomate é mais benéfica do que a do licopeno isolado.
- A redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório são os mecanismos envolvidos nesse modelo.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio.

Materiais e Métodos

Delineamento

O protocolo da pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (nº 983/2012), UNESP, em acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram submetidos ao infarto experimental (figura 2), de acordo com método descrito inicialmente por Heimburger e modificado por Pfeffer e colaboradores³⁸⁻⁴⁰, ou à cirurgia simulada (mesmo procedimento do infarto experimental, porém, sem a oclusão da artéria coronária).

Após 7 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado o primeiro estudo ecocardiográfico para aferição do tamanho do infarto e da fração de variação de área. Esse primeiro ecocardiograma foi realizado para garantir que o tamanho do infarto era semelhante entre os grupos infartados antes do tratamento. No final dos três meses de acompanhamento, foi realizado novo estudo ecocardiográfico.

Após o estudo ecocardiográfico inicial, os animais foram alocados em seis grupos: 1) grupo Sham (animais submetidos à cirurgia simulada) alimentado com dieta padrão (grupo-SC); 2) grupo Sham alimentado com dieta suplementada com licopeno 1mg/kg peso corporal/dia (grupo-SL); 3) grupo Sham alimentado com dieta suplementada com tomate (grupo-ST); 4) grupo infartado (animais submetidos ao infarto experimental) alimentado com dieta padrão (grupo-IC); 5) grupo infartado alimentado com dieta suplementada com licopeno 1mg/kg de peso corporal/dia (grupo-IL); 6) grupo infartado alimentado com dieta suplementada com tomate (grupo-IT). O licopeno e o tomate das dietas foram diluídos em óleo de milho para serem adicionados à ração (0,5ml de óleo/kg de peso corporal/dia) e os grupos controles tiveram a mesma quantidade de óleo adicionadas à ração para que não houvesse diferença em relação aos macronutrientes fornecidos pela dieta entre os grupos.

A quantidade de tomate suplementada forneceu a mesma quantidade de licopeno (1mg/kg de peso corporal/dia) que receberam os grupos suplementados apenas com este carotenoide. A ração utilizada foi a Nuvilab (Nuvital®) moída.

O licopeno adicionado à ração foi adquirido em farmácia de manipulação. A concentração do licopeno comercial foi confirmada pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também para garantir que ele não apresentasse em sua formulação outros

carotenóides. Após o seu preparo, a ração foi armazenada em freezer (-14°C). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água, controle de luz (ciclos de 12 horas), de temperatura (aproximadamente 25°C) e de umidade. Os animais foram observados por três meses.

Neste estudo utilizamos apenas os resultados de animais que apresentaram área de infarto avaliado pela análise histológica maiores que 30%, pois trabalhos prévios do grupo observaram alterações característica de remodelação com área infartada superior a essa porcentagem.

A ingestão de ração foi controlada diariamente e os animais foram pesados semanalmente durante todo o período experimental. Três meses após o infarto, os animais foram submetidos ao estudo funcional, morfométrico, e bioquímico.

Escolha do tomate

Foram escolhidas 3 variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*), com nomes populares de tomate cereja, tomate salada e tomate indústria) e 3 extratos de tomate industrializado para o preparo da ração teste. Esse teste inicial foi realizado com o objetivo de determinar o produto mais adequado a ser adicionado à ração sem alterar suas características físicas e sua composição centesimal, garantindo que distribuição de macronutrientes entre as rações dos diferentes grupos fosse a mesma.

Foi realizada a dosagem de licopeno nesses produtos pela técnica de (HPLC) segundo método descrito por Riso (1997) e Yeum (1996)^{41,42}. Além disso, todos os produtos foram caracterizados quanto à: umidade (método de AACC 44-15 - 1983), cinzas (método AACC 81-31 - 1983), proteína (método AACC 16-10 - 1983) e matéria graxa (método AACC 30-20 - 1983)⁴³ no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Campus Lageado – UNESP.

Foram testadas misturas de extrato de tomate industrializado na forma pastosa na ração, extrato de tomate liofilizado e tomate em pó (tomate *in natura* branqueado, liquidificado, seco em estufa a 65°C por 72h e macerado para obtenção de pó de tomate) para optarmos pela melhor combinação.

Aspecto geral dos produtos

A Figura 1 apresenta o aspecto visual dos extratos de tomate industrializado secos em estufa e liofilizado e do tomate *in natura* branqueado e liquidificado. Observamos alterações físicas promovidas pelos processos.



Extrato de tomate industrializado seco em estufa a 65°C por 72h.



Extrato de tomate industrializado liofilizado em 72h.

Figura 1- Fotografias dos extratos de tomate industrializado (secos em estufa ou liofilizados).

Composição centesimal dos produtos e dosagem de licopeno

Os resultados obtidos nas análises da composição centesimal dos tomates *in natura* e extratos de tomate industrializados analisados neste projeto estão apresentados na Tabela 1. A análise dos produtos mostrou que os mesmos apresentaram valores desprezíveis quanto às concentrações dos macronutrientes, o que não alteraria a composição da ração em relação a esses compostos.

Diante disso, a escolha do produto a ser adicionado na ração foi baseada em seu aspecto físico mais favorável à adição e preparo da ração e sua maior concentração de licopeno.

O tomate indústria apresentou maior concentração de licopeno (1mg de pó de tomate: 5,9µg de licopeno) e então foi o produto escolhido para ser utilizado em nosso estudo.

Como observado na Figura 1, o extrato de tomate industrializado seco em estufa formou uma espécie de placa com aspecto gelatinoso, o que não permitia sua maceração nem a identificação dos possíveis componentes que proporcionavam esse aspecto ao produto e que poderiam interferir no estudo.

O extrato de tomate industrializado liofilizado formou um produto com aspecto esponjoso, o que também não permitia sua maceração e também sugeriu a adição de produtos desconhecidos e que poderiam interferir em nosso estudo.

O tomate indústria *in natura* foi branqueado, liquidificado e seco em estufa. Após esses procedimentos ele foi macerado tornando-se um pó, produto de fácil manipulação para adição na ração sem alterar suas características físicas.

Tabela 1- Composição centesimal dos tomates e extratos de tomate industrializados

Produtos	Componentes g/100g				
	Matéria graxa	Cinzas	Umidade	Proteína	Atividade de água
P1	-	0,60	94,27	1,23	0,28
P2	-	0,32	95,22	1,54	0,34
P3	-	0,42	95,55	1,42	0,29
P4	0,16	2,43	84,22	1,12	0,46
P5	0,13	1,95	88,77	1,06	0,43
P6	0,18	2,30	91,59	1,07	0,43
P7	-	0,42	12,90	1,28	0,32

P1: tomate cereja; P2: tomate salada; P3: tomate indústria; P4, P5, P6: extratos de tomate industrializados; P7: pó de tomate (tomate indústria). Valores em apresentados – média de 3 dosagens.

Para que cada animal recebesse a quantidade equivalente de 1mg de licopeno/kg de peso/dia, para cada quilo de ração foi adicionado 4,2g de pó de tomate e 7,5g de pó de licopeno.

Infarto Experimental

Após anestesia com cloridrato de cetamina (70mg/kg) e xilazina (1mg/kg), por via intraperitoneal, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado (figura 2) por compressão lateral do tórax e descendente anterior ligada, a aproximadamente 2mm da origem, com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado, com aspiração do pneumotórax³⁸⁻⁴⁰.

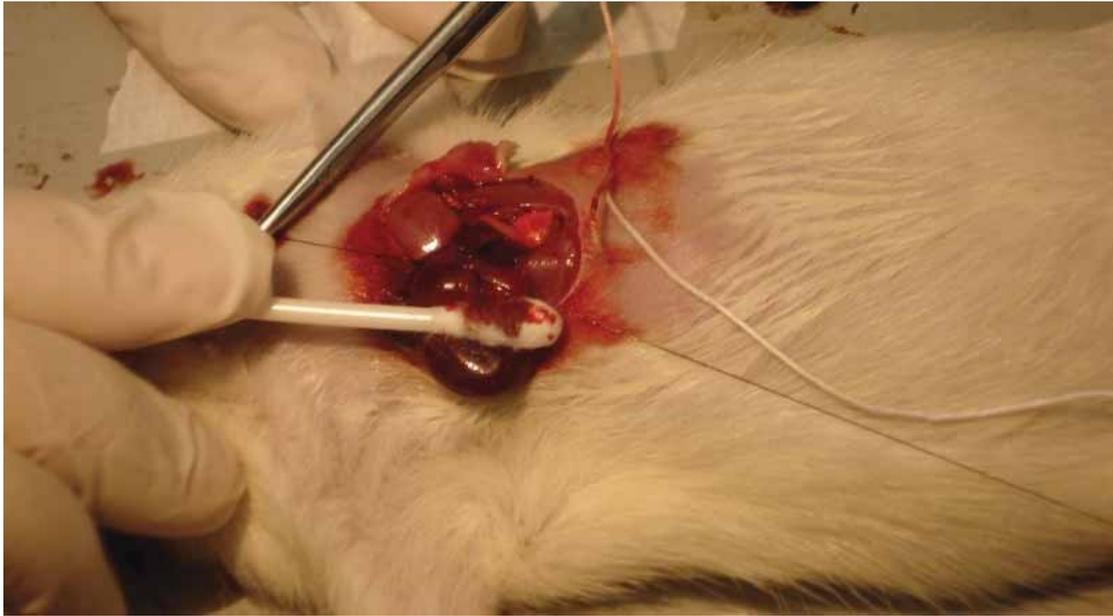


Figura 2 – Infarto experimental. Exteriorização do coração para sutura coronária a 2mm da origem, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar.

Estudo Ecocardiográfico

Nos dois momentos (ecocardiograma inicial: após a cirurgia e final: após os 3 meses de acompanhamento) o procedimento foi o mesmo. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg) por via intramuscular. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento Vivid S6 da General Electric Medical Systems (Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz.

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional, na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor, com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography*⁴⁴ e já validadas no modelo de ratos infartados.

As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede

posterior do ventrículo esquerdo (EDPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede da cavidade. As áreas diastólicas e sistólicas foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo maior e eixo menor. A espessura relativa do ventrículo esquerdo foi calculada pela fórmula: $[(2 \times \text{EDPP})/\text{DDVE}]$. O índice de massa do VE (IMVE) foi calculado pela fórmula: $\{[(\text{DDVE} + 2 \times \text{EDPP})^3 - \text{DDVE}^3] \times 1,04\}/\text{PC}$.

A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor, operando em 5,0 MHz, na posição apical quatro câmaras. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca (TRIV/RR^{0,5}). O TRIV medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada calculando-se a fração de variação de área (FVA= $(\text{AD}-\text{AS})/\text{AD} \times 100$) a velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e a porcentagem de encurtamento endocárdico $[(\text{DDVE}-\text{DSVE})/\text{DDVE}]$.

Estudo do coração isolado - Preparação de *Langendorff* - Avaliação funcional “*in vitro*”

Após a realização do ecocardiograma, de 5 a 8 animais de cada grupo, receberam pentobarbital sódico (50mg/kg) e heparina (1000UI) por via intraperitoneal e foram submetidos ao estudo do coração isolado pela técnica de *Langendorff*, seguindo método já padronizado em nosso laboratório.

Os animais foram ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto, a aorta cateterizada com cânula de metal número 15 e foi iniciada a perfusão miocárdica retrógrada com solução nutriente de *Krebs-Henseleit* que tem a seguinte composição, em mmol/l: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 2,5 CaCl₂; 1,15 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11 glicose. A solução acima foi acrescida de manitol, na concentração de 8mmol, para assegurar maior preservação miocárdica⁴⁵. Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado tamanho 3, tipo 830 (*Hugo Sacks Eletronic-Germany*), com pressão de perfusão constante de 75mmHg (figura 3). A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5%

de CO₂, mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 500-600mmHg, à temperatura de 37°C, pH entre 7,3 e 7,4. O átrio esquerdo foi aberto e o ápice do ventrículo esquerdo puncionado com agulha para drenar a cavidade ventricular, evitando-se o acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de látex, atado ao tubo de polietileno PE 90, foi colocado na cavidade ventricular. A outra extremidade do tubo de polietileno foi conectada a uma torneira de 3 vias, sendo uma das vias acoplada a um transdutor de pressão (*Stathan P23 XL*) e a outra a uma seringa de 1ml que permitiu a variação do volume do balão intracavitário. A musculatura atrial direita, compreendendo o nódulo sinoatrial, foi extirpada, e um eletrodo de marcapasso artificial colocado no miocárdio do ventrículo direito para manter, artificialmente, a frequência cardíaca entre 200-250bpm. Por meio da preparação descrita, foram obtidas curvas de *Starling* com infusão de líquido no balão, que permite variar a pressão diastólica no ventrículo esquerdo de 0 a 25mmHg, por meio de incrementos graduais de 5mmHg, registrando-se a pressão sistólica correspondente a cada variação de volume. Nesta preparação em que o coração opera em condições isovolumétricas, a pressão desenvolvida (pressão sistólica menos a pressão diastólica) foi utilizada como indicadora da capacidade contrátil. Foram registradas também a primeira derivada positiva de pressão (+dP/dtmax) e a derivada negativa de pressão (-dP/dtmax). Esses índices servem, respectivamente, como parâmetros de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo⁴⁵⁻⁴⁶.

Figura 3: Aparato do coração isolado



Figura 3: Visão geral da aparelhagem para realização do estudo do coração isolado com o coração do rato (indicado pela seta) colocado no aparato já sendo perfundido, com o balão intraventricular alocado e com marcapasso (haste preta) posicionado próximo aos átrios.

Eutanásia e coleta de material biológico

Após o período de 3 meses de observação, os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de pentobarbital. Os corações foram retirados, dissecados e o ventrículo direito (VD) e o VE foram separados e pesados. Em seguida, os corações tiveram o VE seccionado a 4mm a partir do ápice, pelo fato deste corte refletir a média dos resultados dos tamanhos dos infartos de cortes de todo o ventrículo. O anel do VE foi colocado em formol tamponado (formol a 10%) por 24 horas e depois foi lavado em água corrente por mais 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram armazenados em álcool 70% e inclusos em blocos de

parafina⁴⁵⁻⁴⁷, obtendo-se, a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica. A base e a ponta do VE foram congeladas a -80°C para posteriores dosagens bioquímicas. O sangue foi coletado e centrifugado a 3000rpm por 20 minutos, a 4°C, e o soro foi coletado e armazenado a -80°C. Os animais que foram submetidos ao estudo do coração isolado tiveram o VE utilizado apenas para o cálculo do tamanho do infarto por análise histológica, não tendo seus corações utilizados para as outras análises. Isso porque os procedimentos realizados durante o estudo do coração isolado poderiam causar alterações estruturais que interfeririam em nossas análises posteriores. Fato este que aumenta ainda mais nosso número de animais utilizados no estudo.

Estudo morfométrico

Após o estudo funcional, foi realizado o estudo morfométrico, segundo técnica já padronizada⁴⁷⁻⁴⁹. Cortes histológicos de 4 micra foram realizados nos blocos de parafina e corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição de áreas seccional transversa dos miócitos (ASM) e do tamanho do infarto, empregando-se microscópio *LEICA DM LS* acoplado à 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 mensuradas de 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente, apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula. 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.

O tamanho do infarto foi calculado pela soma do comprimento endocárdico e epicárdico do segmento infartado em relação à soma do comprimento endocárdico e epicárdico total do ventrículo esquerdo x 100.

ELISA para quantificação de citocinas

Para extração da proteína do tecido cardíaco foi adicionado 1,5 ml de tampão de extração (50mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3nM de sacarose; 0,5 mM de DTT; 1mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3mM; 10mM de NaF; inibidor de protease 1:100) a 60mg de tecido cardíaco proveniente do septo interventricular. O material foi homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20min a 4° C, com 12.000rpm, e o sobrenadante coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de

Bradford e a concentração final ajustada para 1mg/ml. Nesse extrato protéico foi avaliada a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10. Placas de 96 poços (*Nunc*) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- γ , anti-TNF- α ou anti-IL-10 (Interleucina 10) de rato (*R&D Systems*), diluídos em tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS– Tween 20 (0,05%), foi adicionada 300 μ L da solução de bloqueio constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. Após as lavagem as placas foram incubadas por duas horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN- γ , anti-TNF- α ou anti-IL-10 de rato biotinilados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluída 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (*Sigma*). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄2N e a leitura realizada em 492nm⁴⁹. Todos os resultados foram ajustados para a quantidade total de proteína de cada amostra.

Análise das enzimas antioxidantes e do hidroperóxido de lipídeo

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas glutathione peroxidase (*GSH-Px*), SOD e CAT tecido cardíaco. As análises foram realizadas após a determinação das proteínas totais do tecido. Amostras de 100mg de tecido cardíaco foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugado a 12000 x g, por 30 minutos a -4°C, segundo descrito por Pereira e colaboradores (1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (g/100g de tecido):

Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (E.C.1.11.1.9.)

A atividade da GSH-Px foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura e colaboradores (1974), em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutathione reduzida (GSH) e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metilenotetraidrofolato redutase (NADPH₂) a 340nm na presença de glutathione redutase, a

qual catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px, expressa em nmol/mg de tecido⁵⁰.

Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (E.C.1.15.1.1.)

A atividade da SOD foi determinada pela técnica de Crouch e colaboradores (1981), tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. A atividade foi expressa em nmol/mg de proteínas totais⁵¹.

Determinação da atividade da Catalase (EC.1.11.1.6.)

A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm. Os resultados, expressos nmol/mg de proteínas totais⁵².

Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo

Foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) medida por hidroperóxido, com 100µl da amostra e 900µl de mistura reagente de sulfato ferroso ($FeSO_4$) 250µM, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25mM, xilenolorange 100µM e butil-hidroxitolueno (BHT) 4mM em 90% (v/v) metanol. A intensidade da coloração da reação foi medida espectrofotometricamente. A concentração do hidroperóxido de lipídeo foi expressa em nmol/g de tecido⁵³.

Western blot para determinação da expressão do *Nrf-2*, *NF-κB*, colágeno tipo I e colágeno tipo III

A quantificação de proteínas envolvidas no estresse oxidativo no tecido cardíaco foi realizada pela técnica de *western blot*. A quantificação do *Nrf-2* foi realizada com o *Kit NE - PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Biotechnology)*, que permite a extração separadamente das proteínas citoplasmáticas e nucleares. A expressão do *Nrf-2* foi determinada utilizando o extrato nuclear. A extração das proteínas do VE para quantificação do *NF-κB* total e fosforilado e colágeno tipo I e colágeno tipo III foram realizadas com

tampão RIPA, contendo inibidores de protease e fosfatase. A concentração de proteína dos extratos foi analisada pelo método de *Bradford*⁵³, utilizando as curvas de *BSA Protein Standard* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

As proteínas presentes no extrato foram aplicadas em géis de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio 10% para eletroforese (*sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell* - Bio - Rad, Hercules, CA, EUA). Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose em sistema *Mini-Trans Blot* (Bio - Rad, Hercules, CA, EUA) e as membranas foram cortadas de acordo com as alturas das bandas das proteínas específicas e separadas em diferentes recipientes para a adição dos anticorpos. A membrana foi bloqueada, por 120 minutos, com 0,5% de solução de leite em pó desnatado em temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada por uma noite a 4°C com os respectivos anticorpos primários (*Nrf-2* (C-20), *rabbit polyclonal IgG* sc-722, na diluição 1:400; e *p65 NF-κB total mouse monoclonal IgG* sc-8008, na diluição 1:200; e *NF-κB fosforilado, rabbit monoclonal Ig-G*, na diluição 1:200, sc-3302; (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe). Após três lavagens com solução basal (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20), a membrana foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpo secundário (conjugado à peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com as recomendações do fabricante (*IgG anti - rabbit* e *goat anti- mouse IgG*, nas concentrações 1:8.000 e 1:10.000, respectivamente (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e novamente lavados em solução basal três vezes.

Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimiluminescência de acordo com as instruções do fabricante (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo Scientific, EUA) para deteção do anticorpo ligado à membrana e foi obtida a autorradiografia. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (*GAPDH* (6C5) *mouse monoclonal IgG* sc-32233, na diluição 1:10.000; *Goat anti - mouse IgG - HRP* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa), obtidos na mesma eletroforese diante dos pesos moleculares diferentes das proteínas.

As bandas de interesse foram localizadas por meio de marcador de peso molecular com peso de 100kDa para o *Nrf-2*, 90kDa para o colágeno tipo I, 75kDa para o colágeno tipo III, 65kDa para *NF-κB* e 37kDa para o *GAPDH*. A imuno deteção foi realizada por meio de foto documentador em modo de visualização para luminescência, aparelho *Gel Logic 6000 Pro* equipado com software *Carestream Molecular Imaging* versão 5.0 e as imagens dos *blots*

geradas foram analisadas pelo programa Gel pro Image32 versão 3.1.00 (*Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA*), que mede as bandas escuras em fundo claro do *blot* em unidade de imagem denominada pixel.

Análise estatística

Os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão. Os dados foram testados quanto à normalidade e variância. As variáveis que não preencheram os critérios de normalidade e de igualdade de variância foram normalizadas antes da análise. As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância de duas vias (ANOVA). Para os dados que não conseguiram ser normalizados, utilizamos os testes de *Kruskal-Wallis* (comparação entre os grupos SHAM: SC, SL e ST; e entre os grupos infartados IC, IL e IT) e *Mann-Whitney* (comparação entre os grupos SC e IC; SL e IL e ST e IT) e fizemos a correção por *Bonferroni* (multiplicamos o valor de p por 5, visto termos realizado 5 comparações). Para comparação dos tamanhos dos infartos foi utilizado ANOVA de uma via. Para a comparação da mortalidade foi utilizado o *Chi-quadrado*. O nível de significância adotado foi de 5%.

O pacote estatístico utilizado foi o *Sigma Stat for Windows* versão 3.5 (Systat Software, Inc).

Resultados

Peso dos animais, consumo de ração e mortalidade

Os grupos suplementados com licopeno apresentaram, ao final do experimento, peso corporal maior quando comparados aos grupos suplementados com tomate e com ração controle (Tabela 2). Os animais foram pesados semanalmente o ganho de peso médio por grupo está representado na figura 4.

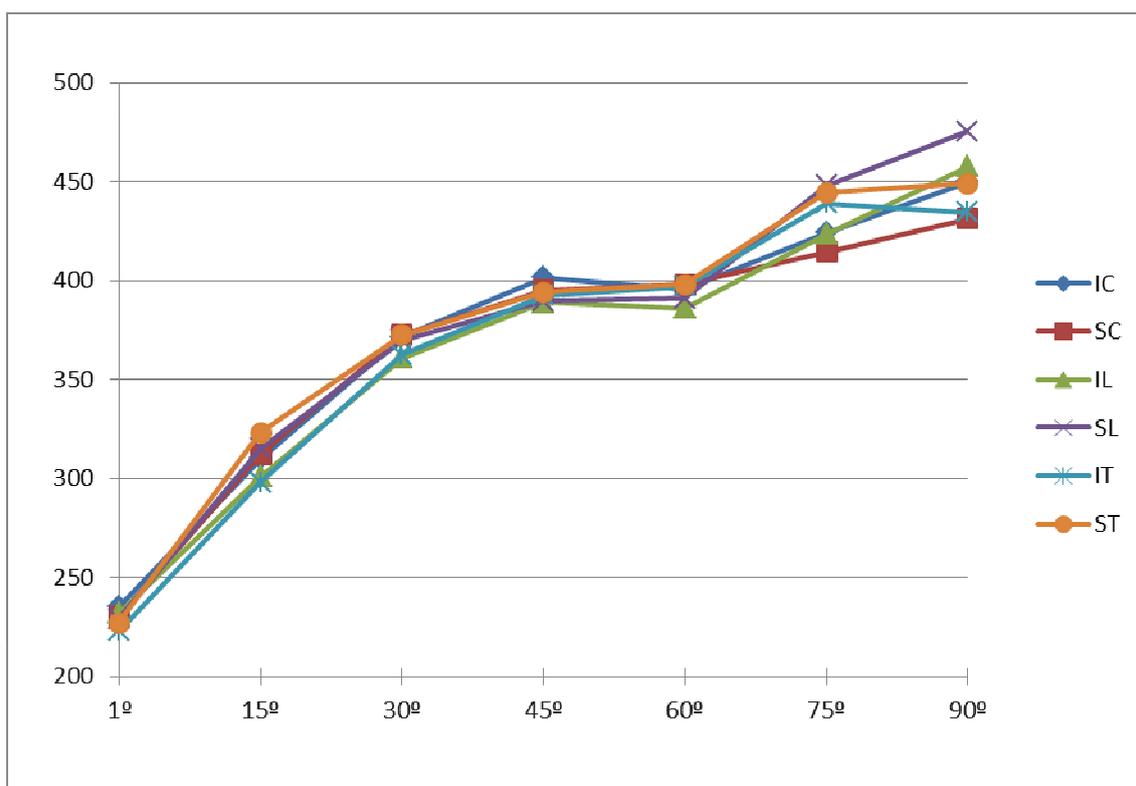


Figura 4: Média de ganho de peso corporal. 90 dias de experimento após a cirurgia. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate.

O consumo médio diário, em gramas, de ração consumida entre os grupos não diferiu significativamente entre os grupos: SC (n=18) $21,6 \pm 0,7$; SL (n=17) $22,3 \pm 1,0$; ST (n=18) $22,3 \pm 1,0$; IC (n=13) $21,7 \pm 0,5$; IL (n=16) $21,8 \pm 0,8$; IT (n=14) $22,2 \pm 1,0$ ($p=0,418$), o que garante que todos os animais tenham recebido a mesma quantidade de licopeno suplementada na ração.

Os animais infartados foram divididos em 3 grupos após o ecocardiograma inicial e não apresentaram diferença significativa no tamanho de infarto inicial: IC (n=13): $29,7 \pm 10,2\%$; IL (n=17): $29,5 \pm 8,6\%$; IT (n=15): $28,0 \pm 7,8\%$; ($p=0,849$).

Ao final do experimento, por meio da avaliação histológica, optamos por utilizar em nosso estudo apenas os animais que apresentaram infartos >30%, e os tamanhos dos infartos entre os grupos também não apresentou diferença significativa (IC (n=13): 44,8±9,4%; IL (n=16): 38,1±6,1%; IT (n=15): 41,6±7,7%; p=0,070). Por tanto, essa variável não influenciou nossos resultados. Foram excluídos 13 animais do grupo IC, 17 animais do grupo IL e 15 animais do grupo IT que apresentaram infartos menores que 30% pela avaliação histológica.

Quanto à mortalidade, até 48 horas após a cirurgia de indução do infarto houve mortalidade de 47% dos animais. Durante o período de acompanhamento apenas 1 rato do grupo SC morreu. Em relação aos grupos infartados, 1 animal do grupo IL evoluiu ao óbito. Não houve diferença na mortalidade entre os grupos (p=0,601).

Estudo Morfométrico

Os dados morfométricos analisados estão apresentados na tabela 2. O IAM aumentou o peso úmido do VD de todos os grupos e também aumentou o peso do VE e do VD corrigidos pelo peso corporal dos grupo controle e tomate. A suplementação com tomate diminuiu o peso do VD quando comparados aos grupos suplementados com licopeno e com ração controle. Não houve interação entre o infarto e a suplementação dietética de licopeno ou tomate nessas variáveis.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados obtidos pelo estudo ecocardiográfico após os três meses de acompanhamento estão apresentados nas tabelas 3 e 4. Como era esperado o IAM induziu alterações morfológicas e funcionais no ventrículo esquerdo (VE).

Houve aumento das câmaras cardíacas (Tabela 3) esquerdas avaliadas pelo diâmetro do átrio esquerdo (AE) e pelos diâmetros e áreas sistólica e diastólica do VE. Em relação à espessura da parede do VE, houve aumento quando comparados os grupos SC e IC, SL e IL, ST e IT. Além disso, o infarto aumentou o IMVE.

Os grupos suplementados com licopeno apresentaram valores menores do diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal quando comparados aos grupos suplementados com ração controle. Além disso, o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal também foi menor nos grupos suplementados com licopeno quando comparados aos grupos suplementados com tomate e com ração controle.

Em relação aos dados funcionais (Tabela 4), o IAM aumentou o tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca e reduziu a fração de variação de área e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE. Logo houve piora tanto da função diastólica quanto sistólica após o infarto.

Os grupos suplementados com tomate apresentaram valores menores de onda A do fluxo transmitral quando comparados aos grupos suplementados com ração controle. Houve diminuição da porcentagem de encurtamento do miocárdio do grupo SC quando comparado ao IC, do grupo SL e IL, e do grupo ST em comparação ao grupo IT.

Não houve interação entre o infarto e a suplementação de licopeno ou tomate nas variáveis ecocardiográficas analisadas.

Tabela 2- Variáveis morfométricas

Variável	Grupo SC (n=17)	Grupo SL (n=9)	Grupo ST (n=9)	Grupo IC (n=11)	Grupo IL (n=10)	Grupo IT (n=8)	p(IAM)	p(DIETA)	p(IAMxDIETA)
VE (g)	1,4±1,9	0,9±0,1	0,9±0,1	1,1±0,2	0,9±0,3	1,0±0,2	-	-	-
*VD (g)	0,29±0,15	0,2±0,04	0,17±0,03	0,35±0,2	0,23±0,21	0,225±11	0,039	<0,001#	0,735
VE/PC	0,0033±0,004	0,002±0,00021	0,0019±0,00013	0,00239±0,00047	0,0021±0,0006	0,0023±0,00035°	-	-	-
VD/PC	0,00069±0,00037	0,00044±0,00008	0,00037±0,00006&	0,00079±0,00028	0,00074±0,00053	0,0005±0,00023	-	-	-

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias/*Kruskal-Wallis Mann-Whitney*. SC: sham controle; SL: sham lícopeno; ST:

sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto lícopeno; IT: infarto tomate; PC: Peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.

grupos suplementados com tomate ≠ grupos suplementados com lícopeno e ração controle.

° p < 0,05 ≠ ST

& p < 0,05 ≠ SC

Tabela 3 - Variáveis estruturais avaliadas pelo ecocardiograma

Variáveis	Grupo SC (n=18)	Grupo SL (n=18)	Grupo ST (n=18)	Grupo IC (n=13)	Grupo IL (n=16)	Grupo IT (n=15)	p(IAM)	p(DIETA)	p(IAMxDIETA)
PC (g)	431,2±18,4	475,4±22,2	443,3±50,9	450,0±21,3	457,5±37,0	448,8±46,3	0,775	0,013#	0,131
DDVE/PC (mm/kg)	18,3±1,3	16,7±1,0	17,6±2,1	22,4±2,0	20,8±2,9	22,1±2,5	<0,001	0,004#	0,915
DSVE/PC (mm/kg)	9,1±1,1	8,7±1,1	9,1±2,0	17,0±3,0	16,0±3,2	18,0±3,1	<0,001	0,169	0,508
EDPP (mm)	1,31±0,1	1,32±0,01	1,31±0,1	1,6±0,2@	1,65±0,3\$	1,64±0,3§	-	-	-
Esp. Rel.	0,333±0,02	0,336±0,02	0,34±0,01	0,323±0,05	0,351±0,05	0,336±0,07	-	-	-
*IMVE (g/kg)	0,703±0,1	0,711±0,1	0,676±0,1	1,32±0,2	1,177±0,373	1,278±0,3	<0,001	0,385	0,151
*AE/PC (mm/kg)	12,3±0,8	11,2±1,2	11,6±1,7	15,7±2,8	14,3±2,6	15,3±3,3	<0,001	0,033°	0,919
*Área Sistólica (cm ²)	13,2±3,7	14,0±2,5	13,7±2,3	66,8±18,0	58,4±15,1	61,8±19,1	<0,001	0,914	0,253
*Área Diastólica (cm ²)	44,6±5,1	44,8±5,3	42,5±4,5	88,4±21,3	78,9±14,5	84,8±18,6	<0,001	0,461	0,291

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias/*Kruskal-Wallis Mann-Whitney*. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate; PC: Peso corporal; DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDPP: Espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; Esp. Rel.: espessura relativa do VE; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; AE: Diâmetro do átrio esquerdo.

grupos suplementados com licopeno ≠ grupos suplementados com tomate e ração controle

° grupos suplementados com licopeno ≠ grupos controles

@ p < 0,05 ≠ SC

\$ p < 0,05 ≠ SL

§ p < 0,05 ≠ ST

Tabela 4—Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma

Variável	Grupo SC (n=18)	Grupo SL (n=18)	Grupo ST (n=18)	Grupo IC (n=13)	Grupo IL (n=16)	Grupo IT (n=15)	p(IAM)	p(DIETA)	p(IAMxDIETA)
*FC (bpm)	261,2±29,8	267,1±39,4	269,8±44,3	271,9±25,2	275,6±37,2	261,3±25,5	0,528	0,790	0,518
% Enc. Endo (%)	50,2±4,6	47,7±4,5	48,5±4,2	24,6±8,1	23,7±7,1 ^o	20,4±7,1 [§]	-	-	-
VEPP (mm/s)	36,9±4,0	37,0±5,2	37,0±4,8	24,9±5,9	23,3±5,5	22,9±7,3	<0,001	0,768	0,712
FVA	70,7±5,8	68,6±5,0	67,8±4,2	24,8±6,0	26,6±9,5	28,4±9,4	<0,001	0,951	0,175
*E mitral (ms)	75,6±20,4	75,6±9,9	73,3±5,5	78,2±14,7	79,8±20,4	74,3±17,1	0,947	0,378	0,872
*A mitral (ms)	48,0±4,6	46,1±9,0	46,3±7,3	49,4±16,0	42,3±14,7	38,1±15,8	0,121	0,030 [#]	0,497
E/A	1,6±0,2	1,68±0,3	1,72±0,3	1,94±1,5	2,2±1,3	2,6±1,8	-	-	-
*TDE (ms)	47,8±8,4	44,8±6,1	46,1±8,0	47,9±9,6	50,7±8,5	47,7±15,8	0,314	0,849	0,448
TRIV/RR (ms)	53,9±5,6	51,1±7,7	49,3±7,7	64,5±12,3	67,9±11,0	60,4±11,8	<0,001	0,091	0,339

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias/Kruskal-Wallis Mann-Whitney. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate; FC: Frequência cardíaca; % Enc. Endo.: Porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; FAV: fração de variação de área; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; TDE: Tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV/RR: TRIV normalizado para a frequência cardíaca.

& p < 0,05 ≠ SC

^o p < 0,05 ≠ SL

[§] p < 0,05 ≠ ST

[#] grupos suplementados com tomate ≠ grupos controles

Em relação à análise do coração isolado os dados estão apresentados na tabela 5. O IAM reduziu tanto a derivada positiva quanto a derivada negativa máxima e a pressão desenvolvida, sugerindo piora tanto da função sistólica quanto diastólica. Houve interação entre o infarto e a suplementação de licopeno e tomate na $+dP/dt_{max}$ e $-dP/dt_{max}$. A $+dP/dt_{max}$ e a $-dP/dt_{max}$ do grupo SC foi maior que do grupo IC; dos animais do grupo SL foi maior que do grupo IL e do ST foi maior que do grupo IT. Além disso, a $+dP/dt_{max}$ do grupo SC também foi maior que a do grupo SL.

Citocinas inflamatórias

Houve interação entre o infarto e a suplementação de licopeno e tomate nos valores de TNF- α e IL-10 (Tabela 6). Em relação ao TNF- α , o grupo IT apresentou valores menores quando comparado ao grupo IC e ST. Em relação aos valores de IL-10, o grupo IT apresentou valores menores que o grupo ST.

Além disso, o IAM provocou diminuição dos valores de IFN- γ (tabela 6).

Tabela 5- Dados do estudo do coração isolado

Variável	Grupo SC (n=8)	Grupo SL (n=7)	Grupo ST (n=8)	Grupo IC (n=5)	Grupo IL (n=6)	Grupo IT (n=6)	p(LAM) p(DIETA) p(LAMxDIETA)
+ dP/dt max (mmHg/s)	2765±419	2196±488&	2406±554x	1200±326°	1479±339#	1041±245	<0,001 0,311 0,042
- dP/dt max (mmHg/s)	2078±258	1750±381	2093±426	850±206°	1187±303#	750±176 x	<0,001 0,915 0,007
*PD (mmHg)	51±6	58±14	52±8	49±10	52±10	39±5	0,030 0,058 0,321

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate; +dP/dtmax: derivada positiva máxima de pressão; -dP/dtmax: derivada negativa máxima de pressão; PD: pressão desenvolvida.

& p < 0,05 ≠ SC

° p < 0,05 ≠ SC

p < 0,05 ≠ SL

x p < 0,05 ≠ ST

Tabela 6 – Mediadores inflamatórios

Variável	Grupo SC (n=7)	Grupo SL (n=4)	Grupo ST (n=5)	Grupo IC (n=5)	Grupo IL (n=4)	Grupo IT (n=3)	p(IAM)	p(DIETA)	p(IAMxDIETA)
*TNF- α (pg/mg proteína)	3,0 \pm 1,4	6,9 \pm 4,0	8,9 \pm 7,4	5,9 \pm 3,5	1,9 \pm 0,0	0,3 \pm 0,2&&\$	0,028	0,053	0,005
*IFN- γ (pg/mg proteína)	8,2 \pm 9,1	12,9 \pm 8,4	17,8 \pm 9,3	5,8 \pm 3,4	2,1 \pm 1,6	2,2 \pm 0,4	0,002	0,792	0,123
*IL-10 (pg/mg proteína)	7,6 \pm 3,4	17,2 \pm 10,7	32,8 \pm 22,6\$	20,2 \pm 24,8	6,6 \pm 4,9	2,5 \pm 0,5	0,012	0,992	0,021

Dados expressos em média \pm desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate;

& p < 0,05 \neq IC

\$ p < 0,05 \neq ST

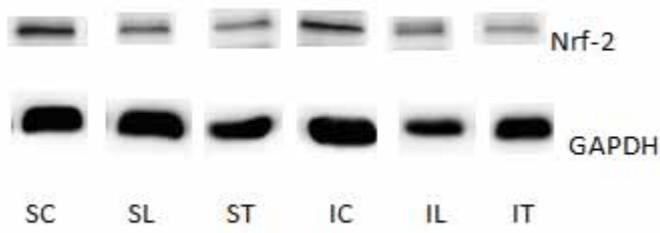
Western blot

Não houve interação entre o infarto e a suplementação de tomate e licopeno na expressão do *Nrf-2*, *NF-κB* total e fosforilado e na relação entre os dois. O infarto provocou diminuição na expressão de *Nrf-2* aumento da expressão de *NF-κB* total e fosforilado e de colágeno tipo I e III entre os grupos (Tabela 7). No entanto, apenas o *Nrf-2*, *NF-κB* fosforilado e o colágeno tipo III apresentaram diferença estatística (todos normalizados pelo *GAPDH*).

Tabela 7- Proteínas por Western Blot

Variável	Grupo SC	Grupo SL	Grupo ST	Grupo IC	Grupo IL	Grupo IT	p(IAM)	p(DIETA)	p(IAMxDIETA)
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(7)	(6)			
<i>Nrf-2</i> (unidades arbitrárias)	1,1±0,4	0,83±0,39	0,64±0,4	0,72±0,6	0,39±0,3	0,65±0,4	0,046	0,132	0,338
(N)	(7)	(6)	(6)	(7)	(8)	(9)			
<i>NF-κB</i> (unidades arbitrárias)	1,05±1,7	1,53±1,7	0,73±0,3	3,67±5,2	3,76±7,8	2,38±4,1	0,124	0,952	0,398
(N)	(7)	(6)	(6)	(7)	(8)	(9)			
<i>pNF-κB</i> (unidades arbitrárias)	0,94±1,0	1,22±1,1	1,0±0,4	3,43±3,5	4,21±6,2	2,45±2,79	0,009	0,811	0,471
(N)	(7)	(6)	(6)	(7)	(8)	(9)			
<i>NF-κB/pNF-κB</i> (unidades arbitrárias)	0,82±0,6	1,14±0,9	0,87±0,4	0,77±0,4	0,61±0,4	0,91±0,8	0,353	0,920	0,424
(N)	(6)	(5)	(6)	(6)	(4)	(3)			
Colágeno tipo I (unidades arbitrárias)	3,5±3,1	4,7±2,8	5,5±3,4	7,6±2,8	6,04±2,5	4,9±1,4	0,147	0,964	0,190
(N)	(6)	(5)	(6)	(6)	(4)	(3)			
*Colágeno tipo III (unidades arbitrárias)	0,4±0,2	0,3±0,2	0,5±0,4	1,8±1,3	1,2±0,9	1,1±1,1	0,011	0,574	0,693

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate; Todas as proteínas foram normalizadas pelo *GAPDH*; *NF-κB/pNF-κB*: relação entre *NF-κB* e o *pNF-κB*.



p IAM:0,046
 p dieta: 0,132
 p IAMxdieta: 0,338

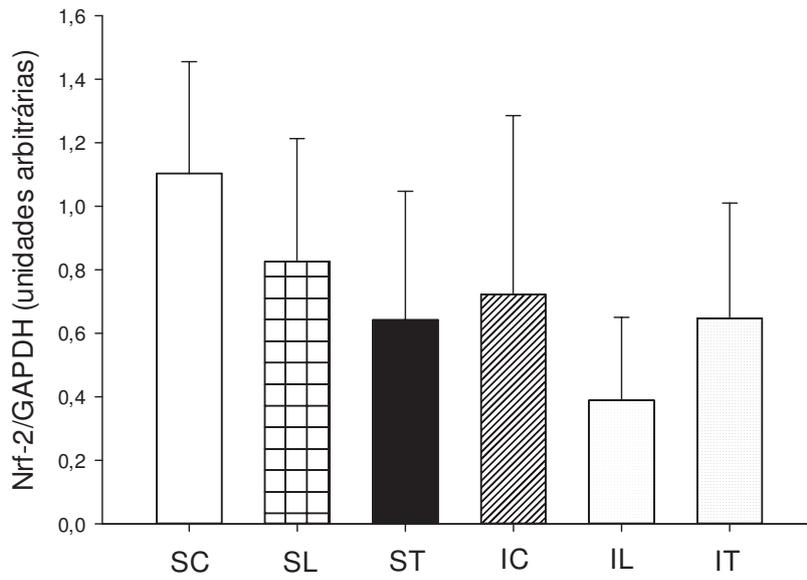


Figura 5. Western blot - Nrf-2 (normalizado pelo GAPDH). ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate.

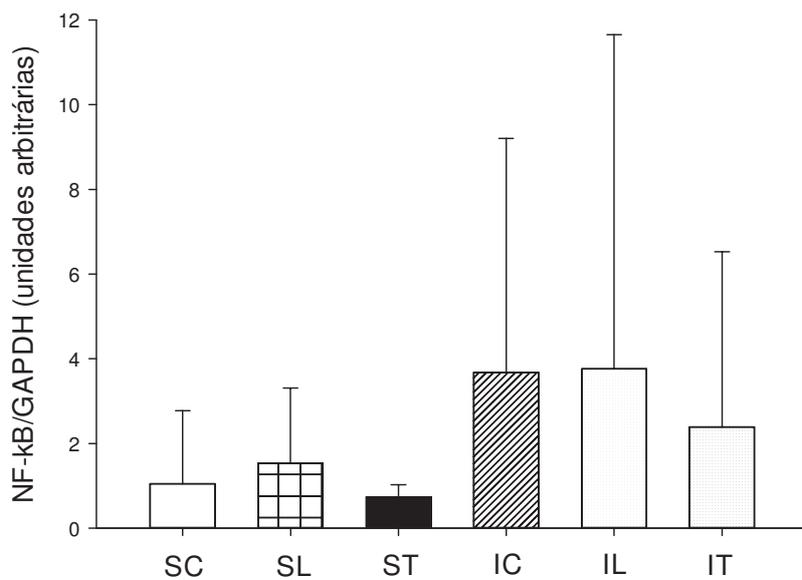


Figura 6. Western blot - *NF-κB* (normalizado pelo *GAPDH*). ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate.

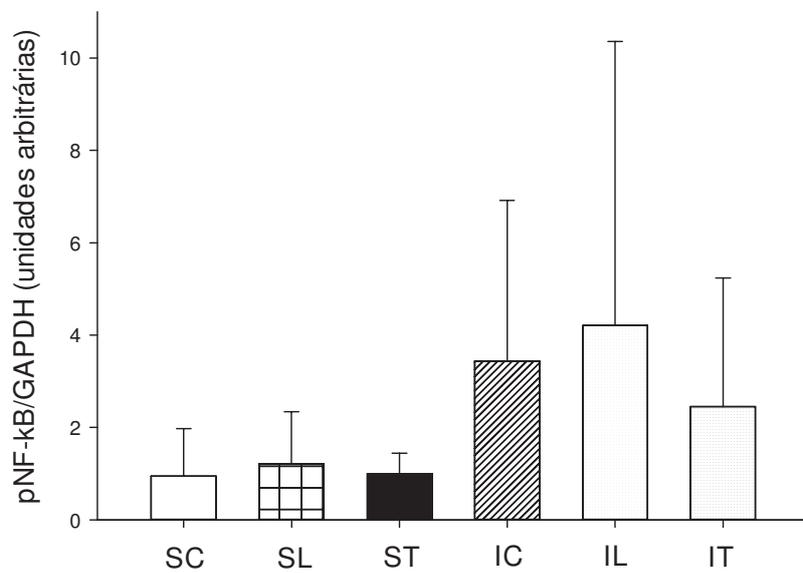
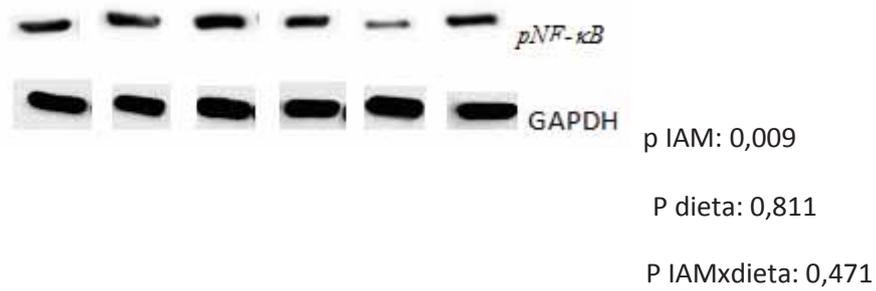


Figura 7. Western blot - pNF- κ B (normalizado pelo GAPDH). ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate.

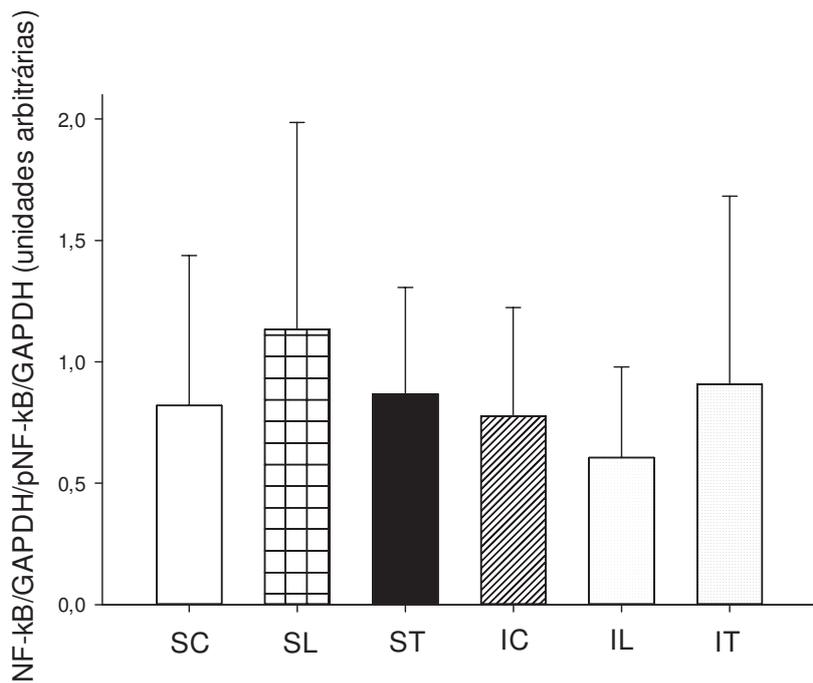
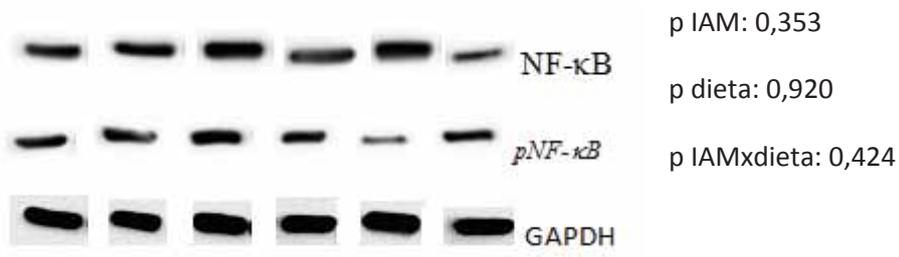


Figura 8. Western blot - *NF-κB/pNF-κ* (normalizados pelo GAPDH): relação entre *NF-κB* e o *pNF-κB*; ANOVA de duas vias. SC: sham controle; SL: sham licopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto licopeno; IT: infarto tomate.

Avaliação histológica

A avaliação histológica do tecido cardíaco está apresentada na tabela 8. A área seccional do miócito foi maior no grupo SC em comparação com os grupos ST e SL. O grupo IT apresentou menores áreas do que o grupo IC (Tabela 8).

Enzimas do estresse oxidativo e hidroperóxido de lipídeo

As determinações das enzimas antioxidantes e do hidroperóxido de lipídeo no coração estão apresentadas na Tabela 9.

Em relação à concentração de hidroperóxido de lipídeo, ela foi maior no grupo IC em comparação com o grupo SC. Não houve diferença entre os grupos SL e IL, e ST e IT, sugerindo atenuação do estresse oxidativo nos grupos suplementados.

Em relação à catalase, houve interação entre os fatores infarto e a suplementação de tomate e licopeno. O grupo IC apresentou atividade da CAT menor em comparação com o grupo SC. Além disso, o grupo ST apresentou atividade de catalase maior que o SL e SC. Os grupos IT e IL também apresentaram atividade de catalase no miocárdio maiores que o grupo IC.

Em relação à superóxido dismutase, esta foi menor no grupo SC em relação ao grupo IC. No entanto, sua atividade foi ainda menor no grupo ST. Nos grupos submetidos ao IAM e suplementados com tomate ou licopeno apresentaram atividades de superóxido dismutase menores que o grupo IC.

Em relação à glutathione peroxidase também houve interação entre as variáveis. O grupo IC apresentou atividade da GSH-Px no miocárdio menor que o grupo SC, o mesmo ocorrendo entre os grupos suplementados com licopeno IL e SL, e com tomate IT e ST. Nos grupos SHAM a suplementação com tomate e licopeno aumentaram a atividade da glutathione peroxidase em relação ao grupo SC, mas esse aumento foi maior no grupo ST que no SL. Nos grupos submetidos ao infarto apenas a suplementação com tomate aumentou as concentrações miocárdicas da GSH-Px.

Tabela 8- Estudo histológico por microscopia óptica

Variável	Grupo SC	Grupo SL	Grupo ST	Grupo IC	Grupo IL	Grupo IT	p(IAM)	p(DIETA)	p(IAMxDIETA)
(N)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)			
Área de miócitos (μm^2)	453,4±90,2	355,0±59,8\$	279,2±25,0\$	493,6±69,6	444,1±103,2	312,3±40,6&	-	-	-

Dados expressos em média ± desvio padrão. teste ANOVA de duas vias/*Kruskal-Wallis Mann-Whitney*. SC: sham controle; SL: sham lícopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto lícopeno; IT: infarto tomate.

\$ p < 0,05 ≠ SC

& p < 0,05 ≠ IC

Tabela 9- Estresse oxidativo no tecido cardíaco

Variável	Grupo SC (n=8)	Grupo SL (n=6)	Grupo ST (n=9)	Grupo IC (n=8)	Grupo IL (n=8)	Grupo IT (n=8)	p(IAM) p(DIETA) p(IAMxDIETA)
Hidropéroxido de lipídio (nmol/g de tecido)	222,9±20,8	244,6±20,0	259,9±49,1	298,8±19,5&	277,0±26,6	261,3±28,8	- - -
CAT (µmol/g tecido)	69,3±8,9	68,2±13,3	91,8±20,1&°	40,8±9,7·&	72,1±13,3#	86,8±18,2	0,028 <0,001 0,012
SOD (nmol/MG proteína)	16,0±2,8	14,2±2,1	13,1±1,4&	24,5±3,2&	14,4±3,7#	12,8±1,0#	- - -
GSH-Px (nmol/mg de tecido)	39,5±5,6	70,0±7,2&	93,7±9,3&°	22,5±4,0&	31,7±4,9#	43,4±5,8@#\$	<0,001 <0,001 <0,001

Dados expressos em média ± desvio padrão. teste ANOVA de duas vias/*Kruskal-Wallis Mann-Whitney*. SC: sham controle; SL: sham lícopeno; ST: sham tomate; IC: Infarto controle; IL: infarto lícopeno; IT: infarto tomate.

CAT: catase; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutatona peroxidase;

& p < 0,05 ≠ SC

° p < 0,05 ≠ SL

@ p < 0,05 ≠ ST

p < 0,05 ≠ IC

\$ p < 0,05 ≠ IL

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio. Nossos dados mostram que o infarto induziu, como esperado, alterações morfológicas e funcionais cardíacas. Além disso, apesar de não interferir com variáveis funcionais, tanto a suplementação de tomate, quanto a de licopeno atenuaram o processo de remodelação cardíaca. A suplementação de licopeno atenuou o estresse oxidativo cardíaco e a suplementação de tomate atenuou tanto o estresse oxidativo quanto o processo inflamatório nesse modelo. É interessante observarmos que a suplementação de tomate foi mais efetiva em atenuar o estresse oxidativo que a de licopeno isolada.

Após o IAM o coração pode sofrer alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a área infartada quanto a não infartada. Esse conjunto de alterações vem sendo estudadas com o nome de remodelação cardíaca, processo definido como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestaram clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração⁵⁻⁸. A remodelação tem o objetivo de manter, inicialmente, a função do coração. Entretanto, na fase crônica, pode ocorrer o comprometimento progressivo dessa capacidade funcional.

Considerando-se as variáveis morfológicas, o infarto resultou, conforme esperado, em aumento das áreas e diâmetros diastólicos e sistólicos do VE, acompanhado por aumento da espessura da parede ventricular e do índice de massa do VE. Esses achados são compatíveis com o processo de hipertrofia observado na fase crônica do infarto⁵⁻⁷. Em relação aos dados funcionais, o IAM aumentou o tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca e reduziu a fração de variação de área e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE. No estudo do coração isolado o IAM reduziu a $+dP/dt_{máx}$ e a $-dP/dt_{máx}$. Logo o infarto levou tanto a disfunção diastólica quanto sistólica do VE. Podemos então, inferir que nosso protocolo foi eficiente para a indução de remodelação após o infarto experimental⁵⁻⁹.

Minicucci e colaboradores mostraram que, para se observar alterações morfológicas, funcionais e anormalidades clínicas na remodelação após o IAM, é necessário ter uma área infartada de pelo menos 36%, 38% e 40%, respectivamente para cada item relatado⁴⁰. Por isso, optamos por utilizar em nosso protocolo animais com área de infarto avaliado pela análise histológica maior que 30%. Em relação ao tamanho do infarto, sua quantificação pela análise histológica é considerada mais fidedigna que a análise pelo ecocardiograma. Este

método quantifica apenas o perímetro endocárdico do infarto, que pode estar superestimado devido ao processo de expansão do infarto.

Em virtude da remodelação cardíaca ser um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e óbito, torna-se relevante identificar estratégias que modulem esse processo de remodelação⁵⁻⁸ e, dentre esses fatores, destacam-se a suplementação de alimentos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, como o tomate (*Lycopersicon esculentum*), e um de seus principais constituintes, o licopeno.

O licopeno é o principal pigmento responsável pela coloração vermelha dos tomates maduros e produtos à base de tomate. É uma forma acíclica do betacaroteno sem atividade provitamina A, com estrutura química razoavelmente apolar, solúvel, portanto, em óleos. Como não é considerado um nutriente “essencial”, não há ingestão diária recomendada (IDR) de licopeno, mas acredita-se que entre 15 a 75mg sejam necessários para que este exerça seus efeitos¹⁷.

O licopeno ingerido é incorporado nas micelas e absorvido na mucosa do intestino delgado por difusão passiva. Em humanos, a absorção do licopeno apresenta-se ao redor de 10 a 30% sendo o restante excretado. Diversos fatores influenciam sua biodisponibilidade, entre eles a idade, o tabaco, o álcool, o processamento térmico e suas formas isoméricas. As formas *cis* são consideradas mais biodisponíveis que a *trans*. Cerca de 80 a 90% do licopeno presente nos tomates encontram-se na forma *trans* e as concentrações séricas e tissulares deste composto encontram-se, em mais de 50%, na sua forma *cis*. Após a absorção, o licopeno é incorporado nos quilomicrons e transportado via sistema linfático até atingir a circulação sistêmica e o fígado. Este é então transportado por lipoproteínas no plasma para diferentes órgãos, inclusive o coração⁵⁵.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o licopeno atua como um potente agente anti-inflamatório e antioxidante, principalmente por modular a atividade dos fatores transcricionais *Nrf-2* e *NF-κB*. Apesar disso, outros mecanismos de ação como a modulação da comunicação intercelular, estimulação do sistema imune, regulação de vias endócrinas e do ciclo celular, também são estudados.

Estudos recentes têm mostrado que a ação do licopeno ocorre não só por seu efeito direto, mas também pode ser devido à atividade de seus metabólitos, também conhecidos como licopenoides. Esses compostos apresentam menos de 10 carbonos em suas moléculas e mostraram atividade antiproliferativa no câncer, por inibir a proliferação celular, induzir apoptose e interferir na comunicação entre as células⁵⁶.

É importante observarmos que, em nosso estudo, não houve interação entre o infarto e a suplementação de tomate e licopeno nas variáveis ecocardiográficas tanto estruturais quanto funcionais, mas a suplementação de licopeno, de modo independente da agressão cardíaca, reduziu as cavidades ventriculares esquerdas. Apesar da suplementação de tomate não ter influenciado nas variáveis ecocardiográficas, ela reduziu a área seccional do miócito nos animais infartados. Logo, podemos concluir que tanto a suplementação de tomate, quanto de licopeno, atenuou o processo de remodelação cardíaca. Wang e colaboradores, em estudo com ratos infartados que receberam soro fisiológico ou licopeno, observaram que o tratamento com licopeno aumentou fração de ejeção e diminuiu o DDVE e o DSVE após o IAM. O licopeno atenuou o aumento do colágeno tipo I e diminuiu a fração de colágeno na zona peri-infarto, dados que indicaram que licopeno melhorou a função e a remodelação ventricular cardíaca⁵⁷.

Em nosso estudo, o infarto aumentou a expressão do colágeno tipo I e III miocárdico, no entanto, apenas o aumento do tipo III com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Sham. De modo contrário ao observado por Wang e colaboradores, a suplementação de tomate ou licopeno também não reduziu a fibrose induzida pelo IAM. O tecido colágeno é um importante modulador tanto da função diastólica quanto da sistólica. As fibras de colágeno encontradas no interstício do tecido cardíaco são predominantemente dos tipos I e III (95% do colágeno total). Em condições patológicas, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular, arritmias e morte súbita⁵⁸. Acreditamos que o tempo de avaliação pós-infarto e a dose de licopeno utilizada possam ser a responsáveis pelos resultados divergentes. No trabalho de Wang, os ratos foram acompanhados por um período de 28 dias após o IAM e receberam 40mg/kg/dia de licopeno. As doses utilizadas em estudos com licopeno variam em cerca de 1 a 40mg/kg/dia devido ao fato de se utilizar a oleresina em grande parte dos estudos, substância esta que não é composta exclusivamente de licopeno, apresentando outros compostos em sua formulação.

Diversos são os mecanismos envolvidos no processo de remodelação cardíaca, entre eles podemos destacar o processo inflamatório e o estresse oxidativo. As citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , promovem alterações estruturais e funcionais no coração com consequente piora da insuficiência cardíaca. É interessante observarmos que elas também podem estimular a síntese de EROs. O TNF- α é uma citocina liberada pelos linfócitos T, principalmente na fase aguda da inflamação (4 a 6 horas após gatilho inflamatório), e sua principal função é aumentar a expressão das moléculas ligantes de integrinas (ICAM-1,

VCAM-1) na superfície celular, aumentando o recrutamento e ligação de leucócitos ao endotélio vascular. Ele estimula produção de outras citocinas inflamatórias, promove ativação de neutrófilos e aumenta a capacidade trombogênica do endotélio⁵⁹. Outra citocina pró-inflamatória importante é o IFN- γ . O IFN- γ é produzido pelos linfócitos T ativados e está relacionado mais especificamente com a fase crônica da inflamação. Ele induz a diferenciação de macrófagos em células gigantes, aumenta a apresentação de antígenos e estimula produção de outras citocinas inflamatórias. A IL-10 é produzida por linfócitos T, macrófagos e monócitos com a finalidade de regular e/ou inibir a resposta inflamatória, sendo uma citocina anti-inflamatória. A IL-10 pode ser utilizada como um biomarcador no infarto, sendo importante citocina inflamatória na regulação da resposta imune e é utilizada na prática clínica em situações como miocardite e na fase aguda do infarto⁶⁰.

É importante lembrarmos que o *NF- κ B* é o principal fator que estimula a síntese de TNF- α . Hung e colaboradores mostraram, em estudo com células endoteliais humanas, que a administração de licopeno reduziu a ativação do *NF- κ B* e a expressão da ICAM-1. Em outro estudo, Zhou e colaboradores, avaliaram os efeitos do licopeno sobre a função cardíaca e os mecanismos moleculares após o IAM em ratos, e observaram melhora da função cardíaca e remodelação com a suplementação. A inibição da resposta inflamatória por supressão dos níveis de TNF- α e ativação da via do *NF- κ B* seriam os mecanismos envolvidos⁶¹. Em nosso trabalho, a suplementação de tomate levou a redução das concentrações miocárdicas de TNF- α nos animais infartados, sendo que o mesmo não foi observado com a administração do licopeno isolada. A suplementação de tomate e licopeno não influenciou a concentração miocárdica de IFN- γ e IL-10 nem a expressão do *NF- κ B* total e fosforilado. Nossos resultados sugerem que a suplementação de tomate pode reduzir o processo inflamatório após o IAM.

Em relação ao estresse oxidativo, ele ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs), e as reservas antioxidantes do miocárdio⁹. Entre as principais enzimas antioxidantes destacam-se a CAT, a SOD, a GSH-Px e a tiorredoxina. A SOD converte o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, e este, posteriormente é convertido em água pela CAT e GSH-Px. GSH-Px é uma enzima antioxidante chave que catalisa a redução do H₂O₂ e hidroperóxidos. Ela não só elimina H₂O₂, mas também previne a formação de mais outros radicais tóxicos^{61,62}.

Um mecanismo de defesa importante envolve as enzimas antioxidantes, incluindo a SOD, a CAT e GSH-Px, que convertem as moléculas ativas de oxigênio em substâncias inativas ou reduzidas⁶³. Estas enzimas evitam a formação de radicais hidroxila e protegem os

constituintes celulares dos danos oxidativos. Uma redução nas atividades destas enzimas está associada ao elevado acúmulo de radicais livres, o que leva a efeitos deletérios, tais como a perda da integridade e função das membranas celulares⁶⁴.

É importante ressaltarmos que o *Nrf-2* é um dos mais importantes reguladores da produção de enzimas antioxidantes. O *Nrf-2* é um fator presente no citoplasma celular que atua na resposta primária à citotoxicidade e ao estresse oxidativo. Frente a agentes agressores, o *Nrf-2* se dissocia da proteína *Keap1* e vai ao núcleo onde estimula a produção de proteínas antioxidantes, uma vez que se liga na região promotora de genes-alvo e então codifica proteínas como glutathione, glutathione peroxidase e tioredoxina. Depois de ligar-se ao núcleo, ele volta ao citoplasma onde é degradado. De forma aguda, a ativação do *Nrf-2* é benéfica, porém, estudo mostrou que sua ativação crônica pode levar a cardiomiopatia^{64,65}.

O principal efeito da suplementação de tomate e licopeno é na redução do estresse oxidativo, além de ser potente sequestrador de oxigênio *singlet* e de radicais peróxil, o licopeno modula a produção de enzimas antioxidantes através da ativação do *Nrf-2*.

Estudos experimentais têm mostrado que o estresse oxidativo pode induzir ao processo de remodelação cardíaca e afetar a matriz extracelular e proteínas contráteis por meio da lipoperoxidação, de danos ao DNA celular e da oxidação de proteínas⁶⁵. Uma das principais consequências do estresse oxidativo seria a lipoperoxidação. Logo, as concentrações de lipoperóxidos poderiam avaliar a presença/intensidade do estresse oxidativo. As alterações de hidroperóxidos de lipídios nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina)⁶⁶.

Ferreira e colaboradores observaram redução do dano oxidativo no DNA em modelo de cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina e suplementado com licopeno³⁰. No presente estudo, os grupos infartados suplementados com tomate e licopeno não apresentaram aumento das concentrações miocárdicas de hidroperóxido de lipídio em comparação com seus respectivos controles, como ocorreu nos animais com dieta padrão. Logo, a suplementação atenuou o estresse oxidativo em nosso estudo. Essa atenuação pode, em parte, ser explicada pela atividade aumentada de CAT e diminuída da SOD nos animais infartados suplementados com licopeno e tomate. Além disso, os animais infartados suplementados com tomate também tiveram atividade miocárdica aumentada de GSH-Px, dados semelhantes aos encontrados por

Odja e colaboradores, que avaliaram o efeito cardioprotetor da suplementação de licopeno, por 30 dias, em ratos infartados que receberam isoproterenol⁶⁷. Apesar dessas alterações nas enzimas antioxidantes, a suplementação não influenciou na expressão nuclear miocárdica do fator transcricional *Nrf-2*. Esses dados sugerem que apesar da suplementação de licopeno influenciar a atividade das enzimas antioxidantes, estas sofreram ação mais intensa com a suplementação de tomate.

O licopeno representa 90% do total de carotenoides e outros fitoquímicos presentes nos tomates. No entanto, como exposto anteriormente, deve existir sinergia entre os compostos fitoquímicos do tomate, permitindo que o benefício da suplementação do tomate seja maior que a administração isolada de licopeno.

Apesar das alterações morfológicas observadas e das ações nas citocinas inflamatórias, nas atividades das enzimas antioxidantes e na concentração de hidroperóxido de lipídeo, não houve alterações funcionais que foram atenuadas no modelo do IAM. Acreditamos que a dose que utilizamos de suplementação de licopeno 1mg/kg/dia e os diferentes modelos de agressão cardíaca utilizados contribuem para os resultados controversos encontrados na literatura. Estudos com doses maiores de suplementação devem ser realizados nesse modelo.

Não encontramos outro estudo na literatura que comparou os efeitos da a suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após o IAM. Acreditamos que nosso trabalho reforça a importância de se priorizar a seleção de alimentos e hábitos alimentares em geral ao invés do consumo ou suplementação de nutrientes isolados ou fatores dietéticos específicos.

Conclusões

Em conclusão, a suplementação de tomate e licopeno atenuou o processo de remodelação cardíaca. A suplementação de licopeno atenuou o estresse oxidativo cardíaco e a suplementação de tomate tanto o estresse oxidativo quanto o processo inflamatório nesse modelo. É interessante observarmos que a suplementação de tomate foi mais efetiva em atenuar o estresse oxidativo que a de licopeno isolada, sugerindo maior benefício da suplementação do tomate.

Referências

- 1- Wann LS, Curtis AB, January CT, Ellenbogen KA, Lowe JE, Estes NM, et al. 2011 ACCF/AHA/HRS Focused Update on the Management of Patients With Atrial Fibrillation (Updating the 2006 Guideline) A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(2):223–42.
- 2- World Health Organization [homepage na internet], [atualizado em set 2011; acesso em 05 jun 2014]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
- 3- Ministério da Saúde/SE/Datasus. Acesso em 06 de janeiro de 2015. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/d13.def>.
- 4- Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima AR, Bonomo C, Guizoni DM, et al. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol*. 2011;151(2):242–3.
- 5- Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, et al. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol de São Paulo*. 2002;12:371-378.
- 6- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985;57(1):84–95.
- 7- 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(3):569–82.
- 8- Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J: Ventricular remodeling after myocardial infarction: Concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol* 2009;92:157-164.
- 9- Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2008 Oct 29;81(3):482–90.

- 10- Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2008 Oct 29;81(3):457–64.
- 11- Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1201–6.
- 12- Mann D. Tumor necrosis factor induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail*. 2002 Dec;8(6):S379–86.
- 13- Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990;223:236–241.
- 14- Aikawa Y, Rohde L, Plehn J, Greaves SC, Menapace F, Arnold JMO, et al. Regional wall stress predicts ventricular remodeling after anteroseptal myocardial infarction in the Healing and Early Afterload Reducing Trial (HEART): An echocardiography-based structural analysis. *Am Heart J*. 2001 Feb;141(2):234–42.
- 15- Karppi J, Laukkanen JA, Makikallio TH, Kurl S. Low serum lycopene and -carotene increase risk of acute myocardial infarction in men. *Eur J Public Health*. 2012 Dec 1;22(6):835–40.
- 16- Weisburger JH. Lycopene and tomato products in health promotion. *Exp Biol Med*. 2002;227(10):924–7.
- 17- John JV, McMurray MD, Packer M, et al. Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med* 2014; 371:993-1004.
- 18- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 1989;274:532–8.
- 19- Palozza P, Catalano A, Simone R, Cittadini A. Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(1):21.

- 20- Böhm V. Lycopene and heart health. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Feb;56(2):296–303.
- 21- Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L, Danilenko M, Dubi N, Linnewiel K, et al. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(1):177–86.
- 22- Goo YA, Li Z, Pajkovic N, Shaffer S, Taylor G, Chen J, et al. Systematic investigation of lycopene effects in LNCaP cells by use of novel large-scale proteomic analysis software. *PROTEOMICS – Clin Appl*. 2007 May;1(5):513–23.
- 23- Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang X-D. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer*. 2010;NA – NA.
- 24- Koh W-P, Yuan J-M, Wang R, Lee Y-P, Lee B-L, Yu MC, et al. Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese Health Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011 Sep;21(9):685–90.
- 25- Hung C-F, Huang T-F, Chen B-H, Shieh J-M, Wu P-H, Wu W-B. Lycopene inhibits TNF- α -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur J Pharmacol*. 2008 May;586(1-3):275–82.
- 26- Karppi J, Laukkanen JA, Mäkkilä TH, Kurl S. Low serum lycopene and b-carotene increase risk of acute myocardial infarction in men. *Eur J Pub Health*. 2011;1–5.
- 27- Gianetti J, Pedrinelli R, Petrucci R, Lazzerini G, De Caterina M, Bellomo G, et al. Inverse association between carotid intima-media thickness and the antioxidant lycopene in atherosclerosis. *Am Heart J*. 2002 Mar;143(3):467–74.
- 28- Rao AV. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Exp Biol Med*. 2002;227(10):908–13.

- 29- Tang XY, Yang XD, Peng YF, Lin JH. Protective effects of lycopene against H₂O₂-induced oxidative injury and apoptosis in human endothelial cells. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2009;(23):439–448.
- 30- Anjos Ferreira AL, Russell RM, Rocha N, Placido Ladeira MS, Favero Salvadori DM, Oliveira Nascimento MCM, et al. Effect of Lycopene on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Echocardiographic, Histological and Morphometrical Assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007 Jul;101(1):16–24.
- 31- Gitenay D, Lyan B, Rambeau M, Mazur A, Rock E. Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats. *Eur J Nutr.* 2007;46:468-475.
- 32- Visioli F, Riso P, Grande S, Galli C, Porrini M. Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *Eur J Nutr.* 2003 Aug 1;42(4):201–6.
- 33- Hsu Y-M, Lai C-H, Chang C-Y, Fan C-T, Chen C-T, Wu C-H. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72(3):677–85.
- 34- Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L. Components of a Cardioprotective Diet: New Insights. *Circulation.* 2011 Jun 21;123(24):2870–91.
- 35- Bansal P, Kumar S, Shreesh G, Ojha K, Nandave M, Mittal R, Kumariand S, Singh S, Cardioprotective effect of lycopene in the experimental mode 1 of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2006;289:1–9.
- 36- Mohamadin AM, Elberry AA, Mariee AD, Morsy GM, Al-Abbasi FA. Lycopene attenuates oxidative stress and heart lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats: A biochemical study. *Pathophysiology.* 2012 Apr;19(2):121–30.

- 37- Upaganlawar A, Patel V, Balaraman R. Tomato lycopene attenuates myocardial infarction induced by isoproterenol: Electrocardiographic, biochemical and anti-apoptotic study. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012 May;2(5):345–51.
- 38- Heimburger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg* 1946;52:677-89.
- 39- Pfeffer JM, Finn PV, Zornoff LA, Pfeffer MA: Endothelin-a receptor antagonism during acute myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000;14:579-587.
- 40- Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Heart Failure After Myocardial Infarction: Clinical Implications and Treatment. *Clin Cardiol.* 2011 Jul;34(7):410–4.
- 41- Riso P; Porrini M. Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma. *journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschriftfur Vitamin-und Ernahrungsforschung. Journal international de vitaminologieet de nutrition.* 1997;61: 47.
- 42- Yeum KJ, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *The American journal of clinical nutrition* 64.4 (1996): 594-602
- 43-American Association of Cereal Chemists – AACC. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists.7^a ed. Rev. St. Paul, 1983.
- 44- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A ft. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58(6):1072–83.
- 45- De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *Eur J Heart Fail.* 2006 Dec;8(8):784–9.

- 46- Zornoff LAM, Paiva SAR de, Tornero MTT, Carvalho MSS, Tucci PJF. Influência do acréscimo de manitol à solução nutriente no desempenho mecânico e no grau de edema miocárdico de corações isolados de ratos. *Arq Bras Cardiol.* 1995;64(3):225–9.
- 47- Castardeli E, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, et al. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84:320–4.
- 48- Zornoff LAM. Beta-Carotene Supplementation Attenuates Cardiac Remodeling Induced by One-Month Tobacco-Smoke Exposure in Rats. *Toxicol Sci.* 2005 Nov 30;90(1):259–66.
- 49- Minicucci M, Santos P, Rafacho B, Goncalves A, Ardisson L, Batista D, et al. Periostin as a modulator of chronic cardiac remodeling after myocardial infarction. *Clinics.* 2013 Oct 22;68(10):1344–9.
- 50- Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974;358:251-61.
- 51- Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes.* 1981;30(3):235–41.
- 52- De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial contractility of the isovolumetrically beating isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(10):1563–9.
- 53- Diniz YS, Rocha KKHR, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, et al. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006 Aug;543(1-3):151–7.
- 54- Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira Jr SA, Martinez PF, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, et al. Tissue vitamin A insufficiency results in adverse ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(4-5):523–30.

- 55- Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Advances in Food and Nutrition Research* [Internet]. Elsevier; 2006 [cited 2015 Jan 22]. p. 99–164. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452606510022>
- 56- Ford NA, Erdman Jr JW. Are lycopene metabolites metabolically active. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(1):1–4.
- 57- Wang X, Lv H, Gu Y, Wang X et al. Protective effect of lycopene on cardiac function and myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via the modulation of p 38 and MMP-9. *J Mol Histol.* 2014 Feb;45(1):113-20.
- 58- Lou H. Cytokines are not upregulated in adriamycin-induced cardiomyopathy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 May;36(5):683–90.
- 59- Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The Immune System and Chronic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Mar;53(12):1013–20.
- 60- Zhou Y. Cardioprotective Effect of Lycopene Against Inflammation Via the Modulation Nf-kb Pathway. 2014 [cited 2015 Jan 22]; Available from: http://cardiologyacademicpress.com/soap/pdf/delme_1336_53fdc3886ece97.75473310.pdf
- 61- Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Heart Lung Circ.* 2004 Jun;13(2):132–8.
- 62- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *AJP Heart Circ Physiol.* 2011 Dec 1;301(6):H2181–90.
- 63- Zhang H, Wang Z-Y, Zhang Z, Wang X. Purified *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP I-a) prevents oxidative stress in an ageing mouse model. *Carbohydr Polym.* 2011 Feb;84(1):638–48.

64- Bai H, Wang Z, Cui J, Yun K, Zhang H, Liu R, et al. Synergistic Radiation Protective Effect of Purified *Auricularia auricular-judae* Polysaccharide (AAP IV) with Grape Seed Procyanidins. *Molecules*. 2014 Dec 11;19(12):20675–94.

65- Rajasekaran NS, Varadharaj S, Khanderao GD, Davidson CJ, Kannan S, Firpo MA, et al. Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(6):957–71.

66- Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J et al. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:1797–1806.

67- Ojha S, Goyal S, Sharma C, Arora S, Kumari S, Arya D. Cardioprotective effect of lycopene against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2013 May 1;32(5):492–503.