



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

Bruna Paola Murino Rafacho

**Influência da suplementação de alecrim (*Rosmarinus
officinallis* L.) na ração sobre a remodelação cardíaca em
ratos submetidos ao infarto do miocárdio**

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

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci

Botucatu
2015

Bruna Paola Murino Rafacho

Influência da suplementação de alecrim
(*Rosmarinus officinallis* L.) na razão sobre a
remodelação cardíaca em ratos submetidos ao
infarto do miocárdio

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

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rafacho, Bruna Paola Murino.

Influência da suplementação de alecrim (*Rosmarinus
oficinallis* L.) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos
submetidos ao infarto do miocárdio / Bruna Paola Murino
Rafacho. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Marcos Ferreira Minicucci
Capes: 40500004

1. Coração - Doenças. 2. Infarto do miocárdio. 3. Stress
oxidativo. 4. Suplementos dietéticos. 5. Remodelação
ventricular. 6. Rações.

Palavras-chave: Alecrim; Estresse oxidativo; Infarto do
miocárdio; Metabolismo energético; Remodelação cardíaca.

Dedicatória

Aos meus pais Paulo e Marilene, minha avó Irma e meus avós Hércio e Maria (in memorian) por seus exemplos, amor, apoio e firmeza em seus olhares em cada momento da minha vida.

À minha irmã e estrelinha Amanda que transmite uma imensa alegria e energia que nunca me deixam enfraquecer.

Ao meu marido Danillo pelo amor, compreensão e por estar sempre ao meu lado e nunca me deixar desistir de meus sonhos.

Agradecimientos

A Deus pela luz e forças para vencer todos os desafios.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio A. R. Paiva, por toda sua competência, dedicação, ensinamentos e grande exemplo em todas as etapas. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci, pelo companheirismo, incentivo e suporte na realização deste projeto.

A todos os docentes do departamento de Clínica Médica, em especial à Dr. Leonardo Antonio M. Zornoff e Dr. Katashi Okoshi pelas contribuições no decorrer de todo o projeto e no exame de qualificação.

À Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla e Dra. Bertha Furlan Polegato, pelos ensinamentos e companheirismo, além do exemplo profissional e pessoal.

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

A todos os funcionários do Departamento e Laboratório Experimental de Clínica Médica, Mário Bruno, José Carlos Georgette, Sueli Clara, Elenize Jamas, Corina Corrêa, Camila Camacho, Vitor Souza,

Rogério Monteiro, Elizângela Silva, Bruno Fajiolli, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Laura Câmara, Mario Dallaqua e Ana Mengue por todo apoio no transcorrer do curso.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Miriane,, Maria Tereza, Regiane, Camila B., Daniele, Marcelo, Paula, Silvio, Camila, Dijon e Fernanda pela troca de conhecimentos e por todo o companheirismo, em especial aos amigos Andrea, Priscila e Ricardo, pela amizade, apoio e auxílio em todas as etapas do projeto.

A Profa. Dra. Ana Angélica H. Fernandes do Instituto de Biociências – UNESP, pela realização de análises bioquímicas.

A todos os meus amigos em Botucatu e em Bauru pela maravilhosa convivência e por toda compreensão e carinho concedidos até hoje.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

Sumário

Resumo	9
Abstract.....	11
Introdução.....	13
Hipótese e Objetivo	18
Métodos.....	20
Animais	21
Infarto experimental	21
Estudo ecocardiográfico inicial, tamanho do infarto e tamanho amostral	21
Preparação e oferta da ração	23
Aferição da pressão arterial sistólica	23
Estudo ecocardiográfico final	24
Eutanásia e coleta de material biológico	25
Estudo morfométrico dos tecidos.....	25
Análise histológica do miocárdio do VE.....	25
Avaliação da produção de citocinas e TIMP no miocárdio do VE	26
Zimografia para MMP-2 e -9 no miocárdio do VE	27
Determinação da apoptose no miocárdio do VE.....	28
Avaliação do metabolismo energético no miocárdio do VE	29
Avaliação do estresse oxidativo no miocárdio do VE	30
Análise estatística	33
Resultados	35
Ingestão de ração, peso corporal, pressão arterial sistólica, tamanho do infarto e mortalidade.....	36
Estudo ecocardiográfico	39
Estudo morfométrico do VE, VD, átrios e pulmão	53
Análise histológica do miocárdio do VE.....	54
Avaliação da produção de TIMP-1 e atividade da MMP-2 no miocárdio do VE	59
Avaliação da produção de citocinas no miocárdio do VE.....	63
Determinação da apoptose no miocárdio do VE.....	67
Avaliação do metabolismo energético cardíaco no miocárdio do VE	69
Avaliação do estresse oxidativo cardíaco no miocárdio do VE.....	84
Discussão	94
Alecrim no coração sem agressão.....	95
Morfologia e função do coração infartado	96
Fibrose cardíaca no coração infartado	97
Inflamação no coração infartado.....	98
Morte celular no coração infartado	99
Metabolismo energético no coração infartado.....	100
Estresse oxidativo no coração infartado.....	101
Alecrim no coração sem e com agressão	104
Dose resposta da suplementação de alecrim no coração infartado	104
Conclusão	107
Referências	109

Resumo

RAFACHO, B. P. M. **Influência da suplementação de alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos ao infarto do miocárdio.** 2015. 122f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

A remodelação cardíaca tem papel chave na disfunção ventricular pós-infarto. Alguns mecanismos como estresse oxidativo, inflamação e fibrose modulam esse processo. Assim, a reparação dos danos pós-infarto tem grande relevância clínica. Neste contexto, há grande interesse por produtos naturais, com propriedades antioxidantes, destacando-se o alecrim. **Objetivo:** Analisar a influência do consumo de folhas secas de alecrim na ração sobre a remodelação cardíaca após infarto do miocárdio (IM) em ratos. **Métodos:** ratos machos Wistar com 200-250g foram alocados em 6 grupos: 1) grupo Sham alimentado com ração padrão e não submetido ao IM (SA0, n=23); 2) grupo Sham alimentado com ração padrão suplementada com 0,02% de alecrim e não submetido a IM (SA1, n=23); 3) grupo Sham alimentado com ração padrão suplementada com 0,2% de alecrim e não submetido a IM (SA2, n=22); 4) grupo submetido ao IM e alimentado com ração padrão (IA0, n=13); 5) grupo submetido ao IM e alimentado com ração padrão suplementada com 0,02% de alecrim (IA1, n=8); 6) grupo submetido ao IM e alimentado com ração padrão suplementada com 0,2% de alecrim (IA2, n=9). Após três meses, foi realizada a aferição da pressão sistólica, ecocardiograma para estudo morfofuncional e eutanásia para coleta de material biológico. Amostras do ventrículo esquerdo foram avaliadas: fibrose (colágeno, TIMP-1 e metaloprotease [MMP]-2), inflamação (TNF- α , IFN- α , IL-10 e ICAM-1), morte celular (Bcl-2 e caspase-3), metabolismo energético (atividade das enzimas lactato desidrogenase [LDH], piruvato desidrogenase [PIDH], citrato sintase [CS], β -hidroxiacil-coenzima A desidrogenase [β -OH-CoA-DH], Complexo I e II da cadeia respiratória de elétrons e ATP sintase) e estresse oxidativo (atividade das enzimas superóxido dismutase [SOD], catalase e glutatona peroxidase [GSH-Px] e concentração de hidroperóxido de lipídeos [HL] e por meio da expressão do Nrf-2, hemeoxigenase-1 [HO-1] e GSH-Px). Os valores foram apresentados como média $\pm$ erro padrão e as comparações foram feitas por teste ANOVA de duas vias, com nível de significância adotado de 5%. **Resultados:** o infarto levou a hipertrofia, maior porcentagem de colágeno, piora da função sistólica e diastólica cardíaca, menor concentração de citocinas, menor expressão da Bcl-2, maior atividade da MMP-2, da LDH e menor atividade da PIDH, CS e complexos I e II, maior concentração de HL e atividade da SOD, menor atividade da catalase e GSH-Px, menor expressão do Nrf-2 e HO-1, características do processo de remodelação cardíaca após o IM. A suplementação de alecrim com ambas as doses levou a menor atividade da LDH e maior atividade da β -OH-CoA-DH, CS e Complexo I, menor concentração de HL, menor atividade da SOD após o IM. A suplementação com 0,02% de alecrim nos grupos infartados levou a melhora da função diastólica e menor área seccional do miócito. A suplementação com 0,2% de alecrim nos animais infartados levou a maior atividade do complexo II mitocondrial. **Conclusão:** Conclui-se que a suplementação com 0,02% de alecrim atenuou a remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio por ação na hipertrofia, na função e no metabolismo energético cardíaco. Os achados do presente estudo sugerem também ação diferente entre as doses estudadas.

Palavras-chave: Alecrim; Estresse oxidativo; Infarto do miocárdio; Metabolismo energético; Remodelação cardíaca.

Abstract

RAFACHO, B. P. M. **Influência da suplementação de alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos ao infarto do miocárdio.** 2015. 122f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Cardiac remodeling plays a key role in post-infarction ventricular dysfunction. Some mechanisms, such as oxidative stress, inflammation and fibrosis can modulate this process. Thus, prevention of post-myocardial damage has great clinical relevance. In this context, there is great interest in natural products with antioxidant properties, as Rosemary leaves. **Objective:** To analyze the influence of the consumption of dried rosemary leaves in the chow on cardiac remodeling after myocardial infarction (MI) in rats. **Methods:** Male Wistar rats with 200-250 g were divided into 6 groups: 1) Sham group fed standard chow and not subjected to MI (SA0, n = 23); 2) Sham group fed standard chow supplemented with 0.02% rosemary and not subjected to MI (SA1, n = 23); 3) Sham group fed standard chow supplemented with 0.2% rosemary and not subjected to MI (SA2, n = 22); 4) group submitted to MI and fed standard chow (IA0, n = 13); 5) group submitted to MI and fed standard chow supplemented with 0.02% rosemary (IA1, n = 8); 6) group submitted to MI and fed standard chow supplemented with 0.2% rosemary (IA2, n = 9). After three months, systolic pressure, echocardiography and euthanasia for collection of biological material were performed. Left ventricular samples were evaluated: fibrosis (collagen, metalloprotease [MMP]-2 and TIMP-1), inflammation (TNF- α , IFN- α , IL-10 and ICAM-1), cell death (Bcl-2 and caspase-3), energy metabolism (activity of lactate dehydrogenase [LDH], pyruvate dehydrogenase [PIDH], citrate synthase [CS], β -hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase [β -CoA-OH-DH], Complex I and II of the respiratory chain of electrons and ATP synthase) and oxidative stress (activity of superoxide dismutase [SOD], catalase and glutathione peroxidase [GSH-Px] and lipid hydroperoxide concentration [LH], and Nrf-2, hemeoxygenase-1 [HO-1] and GSH-Px expression,). The values are presented as mean $\pm$ SEM and comparisons were made by two-way ANOVA, with significance level of 5%. **Results:** infarction led to hypertrophy, increased percentage of collagen, decline in heart systolic and diastolic function, lower concentration of cytokines, lower expression of Bcl-2, increased MMP-2 activity, LDH-OH activity and lower PIDH, CS and complex I and II, higher concentration of LH and SOD activity, lower activity of catalase and GSH-Px, lower expression of Nrf-2 and HO-1, changes compatible with cardiac remodeling process after MI. Rosemary supplementation with both doses led to lower activity of LDH and higher activity of β -CoA-OH-DH, Complex I and CS, lower concentrations of LH, and lower SOD activity after MI. Supplementation with 0.02% rosemary in infarcted groups led to an improvement in diastolic function and lower sectional area of the myocyte. Supplementation with 0.2% rosemary in infarcted animals led to increased activity of mitochondrial complex II. **Conclusion:** We conclude that supplementation with 0.02% rosemary attenuated cardiac remodeling after myocardial infarction by acting on hypertrophy, function and cardiac energy metabolism. The findings of this study also suggest different action between the doses consumed.

Keywords: Rosemary; Oxidative stress; Myocardial infarction; Energy metabolism; Cardiac remodeling.

As doenças cardiovasculares constituem uma das principais causas de morte no Brasil. Entre elas, destaca-se o infarto do miocárdio (IM), responsável por mais de 80.000 óbitos no ano de 2012, segundo o DATASUS(1, 2).

O IM pode ser definido como foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas consequentes da morte celular cardíaca(3). A morte dos miócitos inicia uma cascata de sinalização intracelular, que pode resultar em alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo a região infartada e não infartada, como inflamação, reabsorção do tecido necrosado, formação de cicatriz, dilatação do ventrículo, hipertrofia e excessiva deposição de colágeno no interstício. Essas alterações, tanto moleculares, celulares e intersticiais, podem causar mudanças no tamanho, massa, geometria e função do coração, e têm sido estudadas com o nome de remodelação ventricular ou cardíaca. Inicialmente, a remodelação constitui forma de adaptação do coração a estímulos de agressão. Entretanto, se o insulto excede a capacidade de adaptação, as alterações podem progressivamente levar ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), principal responsável pelo aumento da mortalidade após IM(4).

O IM é iniciado por isquemia do miocárdio e está associado a maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs se referem a um grupo de pequenas moléculas caracterizadas pela presença de elétrons não pareados. Em pequenas quantidades, funcionam como sinalizadores celulares, mas em excesso podem levar a danos dos componentes das células(5). O balanço entre as EROs e os sistemas antioxidantes do organismo é essencial para a homeostase redox. A aumentada produção das EROs ou o prejuízo nas defesas antioxidantes levam ao estresse oxidativo e podem causar modificações irreversíveis nas macromoléculas, proteínas e membranas celulares(6). Em estudos experimentais, o estresse oxidativo é identificado como um dos mecanismos principais envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca(6). Estudos anteriores mostram que o IM resulta em aumento do estresse oxidativo tanto na região infartada como não infartada(5, 7, 8). Além disso, Sun (2009) descreveu queda progressiva das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) e maior produção do radical superóxido no miocárdio de ratos submetidos a IM(5).

Além do sistema antioxidante enzimático, o organismo possui diferentes mecanismos de resposta antioxidante, entre eles os *scavengers* de EROs, enzimas

de fase II e elementos resposta antioxidante (ARE) na sua região promotora. O fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf-2) é o regulador mestre da via de sinalização do estresse oxidativo e dos ARE(9). O Nrf-2 coordena respostas compensatórias transcricionais que induzem rede de vias antioxidantes e enzimas de detoxificação, como GSH-Px e a hemeoxigenase-1 (HO-1), prevenindo danos patológicos. Estudos experimentais mostraram que a deficiência do Nrf-2 tem papel importante na patogênese da remodelação ventricular e da IC em diferentes modelos de agressão(6). Li et al. (2009) mostraram que a superexpressão do Nrf-2 inibiu a produção de EROs em modelo de hipertrofia em cardiomiócitos e a deleção do gene para Nrf-2 promoveu efeito oposto em camundongos submetidos a constrição transversa da aorta(10). Outros autores descrevem que o Nrf-2 tem efeito antiapoptótico(11, 12) e supressor de resposta pró-inflamatória, fatores envolvidos no processo de remodelação cardíaca(10).

O estresse oxidativo pode ativar a produção de citocinas inflamatórias, como o fator necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6)(13), podendo atuar nas vias inflamatórias, fibrose e na morte celular(6). As EROs e as citocinas participam da ativação de metaloproteases (MMPs) e o depósito de colágeno, que contribuem para reparação do tecido lesado e mudanças estruturais no coração(7, 13). Após o IM, inicia-se o processo de reparação cardíaca por meio da ativação de MMPs latentes, que degradam a matriz extracelular. O aumento das MMPs e diminuição dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) podem levar a degradação do colágeno normal e aumento do colágeno tipo I(5). Progressivamente, as distorções na estrutura tecidual cardíaca devido ao acúmulo adverso de colágeno pode levar ao prejuízo na função ventricular(14).

A apoptose, ou morte celular programada, é processo altamente regulado e que coordena o equilíbrio entre as vias de sinalização a favor da morte celular e as vias de sobrevivência celular. O aumento do estresse oxidativo é capaz de produzir lesão aos miócitos e induzir a via intrínseca da apoptose por meio do citocromo c, que ativa as caspases, grupo de proteases executoras da apoptose(15). Entre as caspases, destaca-se a caspase-3, conhecido efetor da apoptose no coração(16). A regulação da apoptose, por sua vez, é feita pela família das proteínas Bcl-2, que inclui Bcl-2 e Bcl-xL, e são conhecidos como antagonistas da morte celular. A Bcl-2 protege a integridade da membrana mitocondrial celular e controla a liberação de

proteínas apoptóticas na membrana celular(15). A perda de cardiomiócitos tem sido relacionada a progressiva deterioração do VE na hipertrofia e no eventual desenvolvimento da IC. Neste sentido, a apoptose pode constituir um dos importantes moduladores na transição para a IC(15).

A oxidação de substratos energéticos é essencial para o funcionamento eficiente do coração. Em corações normais, os ácidos graxos correspondem de 60 a 90% do substrato energético do músculo cardíaco. No entanto, em situações de injúria, a utilização preferencial de ácidos graxos pode se inverter com a de glicose(17-19). Alguns estudos relatam que ocorrem alterações metabólicas na remodelação cardíaca, que levam a menor produção de energia, menor utilização de ácidos graxos livres e maior utilização de glicose como substrato energético. Essas alterações estão associadas à diminuição da concentração de fosfocreatina, forma na qual o trifosfato de adenosina (ATP) é estocado. Também é documentado alterações funcionais da mitocôndria, associadas a progressão da IC(20, 21).

Pelo exposto, conclui-se que a remodelação está associada a vários fatores e estes podem estar relacionados entre si, com destaque para o papel fisiopatológico do estresse oxidativo no coração(5, 7). Neste sentido, suplementos antioxidantes podem ser benéficos após injúria ao miocárdio, por exemplo: estudos com probucol mostraram proteção da função cardíaca no modelo de cardiomiopatia induzida por adriamicina e maior sobrevida após infarto experimental(22). Em estudos com modelo de infarto, antioxidantes como ácido ascórbico, quercetina e alfa-tocoferol exerceram efeito protetor contra danos ao tecido cardíaco(23, 24). Neste contexto, grande interesse tem sido focado nas propriedades antioxidantes de produtos naturais, fontes de compostos cardioprotetores(25).

Espécies da família *Salvia* têm sido utilizadas como especiarias, ervas medicinais e alimento antioxidante(26). Entre essas espécies, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma das plantas mais utilizadas e comercializadas, não somente para uso culinário, mas também como conservante em alimentos processados e cosméticos, com um dos mais altos teores de compostos antioxidantes(27, 28). Contém diterpenos, como ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico, além de flavonóides e ácidos fenólicos(26). Estas substâncias possuem capacidade de proteção contra as EROs, com ação potencial sobre a resposta inflamatória celular e o estresse oxidativo(27). Estudos *in vitro* com leucócitos e células tumorais

incubados com compostos extraídos do alecrim mostraram supressão de interleucina- β , TNF- α e redução da atividade de cicloxigenase-2 (COX-2) e lipoxigenase-5, substâncias envolvidas na resposta pró-inflamatória(29-32). Lian et al. (2010) ao estudarem células endoteliais em modelo de adesão de monócitos evidenciaram que compostos presentes no alecrim suprimem vias de sinalização induzidas por TNF- α (33). Outros estudos *in vitro* com sistemas antioxidantes relataram que o alecrim é capaz de aumentar a atividade das enzimas GSH-Px e SOD e inibir a oxidação(34, 35). Estudos com células nervosas descrevem que compostos presentes no alecrim ativam a via do Nrf-2, protegendo neurônios contra o estresse oxidativo(36, 37). *In vivo*, Posadas et al. (2009) mostraram que a suplementação de extrato de alecrim em ratos idosos melhorou o perfil oxidativo no coração(38). Porém, pouco se sabe sobre atuação do alecrim em outros mecanismos como a fibrose e o metabolismo energético. Além disso, não existem dados sobre o efeito do consumo de alecrim na morfologia e função ventricular após a injúria ao coração.

Assim, com base nas alterações induzidas pelo IM e na ação dos compostos presentes no alecrim, é possível levantar a hipótese de que a suplementação da ração com as folhas de alecrim pode atenuar a remodelação cardíaca em ratos submetidos a IM.

Hipótese e Objetivo

Hipótese

O consumo de ração com alecrim atenua o processo de remodelação cardíaca após infarto do miocárdio em ratos, por ação no estresse oxidativo cardíaco, estimulando a via do Nrf-2.

Objetivo

Avaliar a influência da suplementação de alecrim na ração sobre a remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio em ratos, principalmente sobre o estresse oxidativo e sobre as vias do Nrf-2.

Animais

O protocolo experimental do trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da nossa instituição, estando 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 250 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu.

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

Inicialmente, os animais foram alocados em dois grupos: Grupo Sham, submetido a cirurgia simulada (mesmo procedimento do infarto experimental, mas sem a oclusão da artéria coronária), e Grupo Infarto, submetido ao infarto experimental, conforme descrito posteriormente. Após as cirurgias, os animais foram distribuídos em grupos de acordo com o tratamento proposto, como descrito a seguir.

Infarto experimental

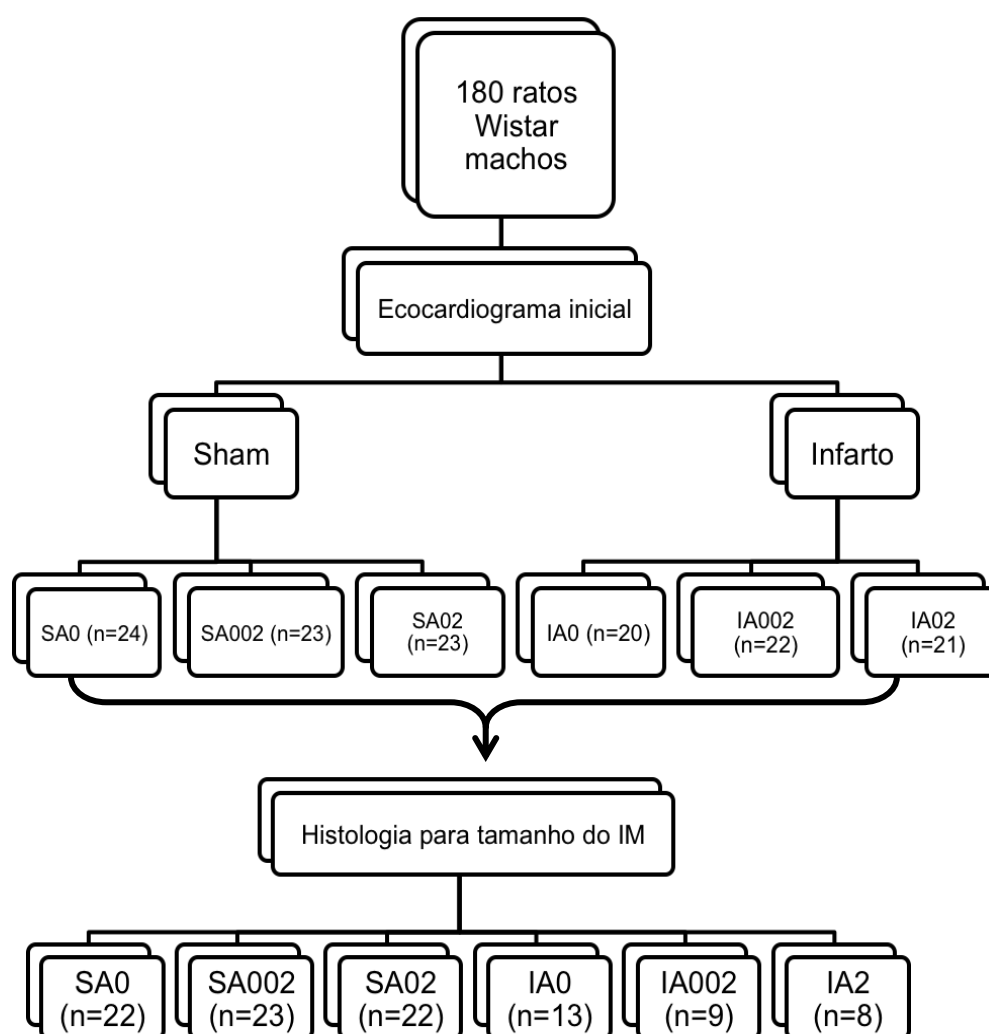
O infarto do miocárdio foi produzido de acordo com método previamente descrito(39, 40). Após anestesia com cloridrato de quetamina (70 mg/kg), por via intramuscular, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria coronária esquerda ligada a, aproximadamente, 2 mm da origem, com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos por ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado.

Estudo ecocardiográfico inicial, tamanho do infarto e tamanho amostral

Após 5 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado estudo ecocardiográfico inicial para aferição das dimensões das câmaras cardíacas dos animais, de modo a garantir a homogeneidade entre os grupos. Após este exame, os animais foram alocados ao acaso nos três grupos IM e nos três grupos Sham, de acordo com a dose de alecrim. Posteriormente para as análises, os animais foram incluídos nas avaliações de acordo com o tamanho do infarto avaliado pela

histologia, como proposto por Minicucci e cols. (2011). O ponto de corte adotado para remodelação cardíaca foi de 36% de área infartada(2). O delineamento do estudo e o tamanho amostral de cada grupo estão apresentados a seguir:

Figura 1. Delineamento e grupos experimentais.



- SA0 = Grupo Sham Controle Alecrim 0%, n=23: animais Sham que receberam ração padrão.
- SA002 = Grupo Sham Alecrim dose 0,02%, n=22: animais Sham que receberam ração padrão adicionada 0,02% de alecrim seco.

- SA02 = Grupo Sham Alecrim dose 0,2%, n=23: animais Sham que receberam ração padrão adicionada 0,2% de alecrim seco.
- IA0 = Grupo Infarto Controle - Alecrim 0%, n=13: animais Infartados que receberam ração padrão.
- IA002 = Grupo Infarto Alecrim dose 0,02%, n=9: animais Infartados que receberam ração padrão adicionada 0,02% de alecrim seco.
- IA02 = Grupo Infarto Alecrim dose 0,2%; n=8: animais Infartados que receberam ração padrão adicionada 0,2% de alecrim seco.

Preparação e oferta da ração

Foi utilizada ração Nuvilab (Nuvital®), que inicialmente foi triturada para posterior adição das folhas de alecrim. As folhas da planta foram adquiridas comercialmente e secas em estufa por 48 horas sob temperatura de 50 °C, trituradas e peneiradas para serem adicionadas à ração. Esse extrato seco foi adicionado à ração triturada e a seguir, a mistura foi peletizada. A ração pronta foi estocada em freezer a -20 °C. A ingestão de ração dos animais foi controlada a cada 24 horas. Os animais foram pesados uma vez por semana durante todo o período experimental. As doses de suplementação de alecrim foram escolhidas com base no estudo de Posadas e cols. (2009)(38).

Aferição da pressão arterial sistólica

Uma semana antes da eutanásia, a pressão sistólica caudal dos animais foi aferida. O registro gráfico da pressão sistólica caudal foi realizado indiretamente por pletismografia de cauda. Foi utilizado polígrafo, sensor e eletroesfigmomanômetro. Este método não permite avaliar a pressão diastólica. Para produzir vasodilatação da artéria caudal, os animais foram mantidos por 5 minutos em caixa aquecida a 40 °C. Após o aquecimento, os animais foram transferidos para um cilindro que permite a exposição da cauda do animal onde foi acoplado o sensor e o manguito. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em esfigmomanômetro Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, USA).

Estudo ecocardiográfico final

Após três meses de suplementação, os ratos foram novamente anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma transtorácico. Foi utilizado equipamento da General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz.

Todas as variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography(41) e já validadas no modelo de ratos infartados e no nosso laboratório(39, 42-46).

As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessura diastólica (EDPP) da parede posterior do VE; espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV); e diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE)(47). A espessura relativa do VE foi calculada pela fórmula $[(2 \times \text{EDPP}) / \text{DDVE}]$ (48). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; 2) fração de variação das áreas sistólica e diastólica da cavidade ventricular; 3) velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular(49). A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e TRIV normalizado pela frequência cardíaca (TRIV/R-R); 4) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A') obtidas por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E')(50, 51).

Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram anestesiados com dose excessiva de pentobarbital. Foram coletados a tíbia, o pulmão inteiro e o lobo esquerdo do fígado para estudo morfométrico. O coração foi dissecado em átrios direito e esquerdo (AE e AD), ventrículo direito (VD), que foram utilizados para estudo morfométrico, e ventrículo esquerdo (VE), para aferição do peso e determinações bioquímicas e moleculares. Um anel do VE foi seccionado e coletado para preparação de lâminas histológicas. O restante do VE foi colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80 °C.

O sangue foi coletado, centrifugado a 1882 x g, por 20 minutos a 4 °C e separado o soro, também armazenado a -80 °C.

Estudo morfométrico dos tecidos

O pulmão, lobo esquerdo do fígado, os átrios, o VE e o VD foram pesados no momento da eutanásia. A razão entre o peso dos tecidos e das estruturas cardíacas com o peso corporal foi calculada para avaliar a hipertrofia das estruturas cardíacas e a congestão pulmonar.

Análise histológica do miocárdio do VE

Após coleta do coração, um anel do VE de aproximadamente 3 mm, seccionado de 4 a 6 mm da ponta do VE, foi retirado, colocado em formol tamponado (formol a 10%) por 24 horas. Depois, foi lavado em água corrente por mais 24 horas e então armazenado em álcool 70%. Após estas etapas, foram inclusos em blocos de parafina para confecção de lâminas histológicas.

Cortes histológicos de 4 µm foram realizados nos blocos de parafina e, os mesmos corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição das áreas seccional transversa dos miócitos (ASM). Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 µm e corados pela técnica de *Picrosirius red*, específicos para visualização de colágeno foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo e para determinação do tamanho do infarto. A determinação da ASM e da

porcentagem de colágeno foram realizadas na área não infartada do corte histológico.

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.

Todas as leituras foram feitas utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Avaliação da produção de citocinas e TIMP no miocárdio do VE

Foram avaliadas a concentração de interleucina 10 (IL-10), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), TNF- α , interferon gama (INF- γ) e inibidor de metaloprotease-1 (TIMP-1) no miocárdio do VE pelo método ELISA. Para extração da proteína do tecido cardíaco foi adicionado 1,5 mL de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM; e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco. O material foi homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 min à 4 °C a 30000 x g, e o sobrenadante coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/mL. Nesse extrato protéico foi avaliada a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e ICAM-1. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- γ ou anti-TNF- α ou anti-IL-10 ou ICAM-1 ou anti-TIMP-1 de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionado 300 μ L da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de 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 ou anti-TNF- α ou anti-IL-10 ou ICAM-1 ou anti-TIMP-1

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, EUA). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492 nm.

Zimografia para MMP-2 e -9 no miocárdio do VE

As metaloproteinases 2 e 9 foram determinadas pela técnica previamente relatada por Tyagi et al.(1993)(52). Amostras de coração foram diluídas em tampão de extração composto por Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, Triton-X 0,1% e CaCl₂ 10 mM. A seguir, as amostras foram diluídas em tampão de aplicação composto de Tris 0,5 M pH 6,8, 100% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol. As amostras foram distribuídas em gel de SDS-poliacrilamida 8%, com 1% de gelatina. A eletroforese foi realizada em aparelho Bio-Rad a 80 V por 2 horas, até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel. O gel foi removido e lavado duas vezes com Triton-X 100 e a seguir lavado com solução Tris 50 mM pH 8,4. O gel então foi incubado a 37°C por 16 horas em solução de ativação de Tris 50 mM pH 8,4 e CaCl₂ 5 mM. A coloração do gel foi realizada por 30 minutos com solução 0,5% de comassie blue e a descoloração feita com solução de 30% de metanol e 10% ácido acético até o clareamento das bandas sobre fundo escuro. O processo de coloração e descoloração foi realizado em temperatura ambiente, em agitador. A seguir, o gel foi fotografado e a intensidade da ação gelatinolítica (bandas claras) analisada em aparelho Gel Logic 6000 Pro equipado com software Carestream Molecular Imaging versão 5.0, e as imagens geradas foram analisadas pelo programa Gel pro Image 32 versão 3.1.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA), que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel. No gel de eletroforese foram identificadas duas bandas de degradação correspondentes à metaloproteinase 2: a metaloproteinase 2 inativa (pró-MMP-2) com peso molecular de aproximadamente 72 KDa e a forma ativa apresenta peso molecular de aproximadamente 64 KDa (30). Foi possível ainda identificar banda de degradação intermediária entre as duas últimas citadas. Não foi possível a nítida quantificação da MMP-9 no presente estudo.

Determinação da apoptose no miocárdio do VE

A quantificação da caspase-3 e da Bcl-2 no miocárdio do VE foi realizada pela técnica de Western blot. Para extração de proteínas foi empregada a extração de células totais com tampão Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA), como descrito pela fabricante Abcam(53).

As proteínas presentes nas amostras homogeneizadas foram aplicadas em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato 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). 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 (Cleaved Caspase-3 [Asp175] [5A002E] Rabbit mAb, Cell Signalling Technology Inc., EUA e Bcl2 sc 492 IgG rabbit monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa). Após três lavagens com solução basal (Tris 1 M pH 8,0, NaCl 5 M e detergente Tween 20), a membrana foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpo secundário (IgG anti - rabbit Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa) 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 (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, EUA). Como controle interno foi utilizada a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH - 6C5, mouse monoclonal IgG1 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa; Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa).

As bandas de interesse foram localizadas por meio de marcador de peso molecular, com peso de 17 kDa para caspase-3 ativa e 26 kDa para Bcl2. A imunodeteção foi realizada por meio de fotodocumentador 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 Image 32 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.

Avaliação do metabolismo energético no miocárdio do VE

Amostras de aproximadamente 200 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e o homogeneizado foi centrifugado a 21000 x g, durante 15 minutos a -40 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas e a atividade das enzimas do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória de elétrons (CR) foi determinada após ressuspensão do pellet com tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 250 mM de sacarose e 2 mM de EDTA e, centrifugação (21000 x g por 5 minutos), de acordo com técnica adaptada de Cassina & Radi (1996)(54).

- Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH): A atividade da LDH foi determinada de acordo com Wilkinson et al. (1965) com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH₂, que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra(55).
- Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK): A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50 mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂, segundo método descrito por Bass et al. (1969)(56).
- Determinação da atividade do complexo piruvato desidrogenase (PIDH): Na presença de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4) determinou-se a atividade da PIDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotreitól, MgCl₂, NBT, piruvato de sódio e fenazina metasulfato, onde mediu-se a conversão do piruvato em acetil coenzima A (acetil-CoA) através da velocidade da redução do NAD(56).
- Determinação da atividade da citrato sintase (CS): A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB em tampão fosfato Tris-HCl 50 mM, pH 8,0(56).
- Determinação da atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH): Foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH(56).

- Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (Complexo I): A atividade do complexo I foi determinada pelo método de Singer (1984) em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80 mM pH 7,4, EDTA e NADH, onde monitorou a velocidade de oxidação do NADH(57).
- Determinação da atividade da succinato desidrogenase (Complexo II): A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi medida pelo método descrito por Fischer et al (1985) em meio com tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e 2,6-dichlorophenolindophenol (DPIP), o qual teve absorbância a 600 nm(58).
- Determinação da atividade ATP sintase: A atividade da ATP sintase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50 mM; pH 8,0, na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase(59).

Todas as leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) com controle pelo software. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Avaliação do estresse oxidativo no miocárdio do VE

A avaliação do estresse oxidativo no miocárdio do VE foi feita a partir da análise bioquímica da atividade das enzimas antioxidantes e da concentração de hidroperóxido de lipídeos e da quantificação da expressão proteica de alguns marcadores por Western blot.

a) Avaliação bioquímica

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no VE. A oxidação foi medida por meio da determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo no miocárdio do VE. As análises enzimáticas e de hidroperóxido de lipídeo foram realizadas após a determinação das proteínas totais do tecido. Amostras de 200 mg do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugadas a 12000 x g, por 30 minutos a -4° C,

segundo descrito por Pereira et al. (1991)(60). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (g/100g de tecido).

- Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9.): a atividade da GSH-Px foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura et al. (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), glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Por meio da oxidação do metilenotetraidrofolato redutase (NADPH_2) a 340 nm na presença de glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), foi determinada a atividade da GSH-Px e expressa em nmol/mg de tecido(61).
- Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1.): a atividade da SOD foi determinada pela técnica de Crouch et al. (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 for 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 totais(62).
- Determinação da atividade da catalase (EC.1.11.1.6.): a atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5 mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A leitura espectrofotométrica foi realizadas a 240 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas totais(60).
- Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeos (HL): foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) medida por hidroperóxido, com 100 μl da amostra e 900 μl de mistura reagente de sulfato ferroso (FeSO_4), 250 μM , ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25 mM, xilenol orange 100 μM e butil-hidroxitolueno (BHT) 4 mM em 90% (v/v) metanol. A intensidade da coloração da reação foi medida espectrofotometricamente. A concentração do hidroperóxido de lipídeo foi expressa em nmol/g de tecido(60).

b) Determinação da expressão de Nrf-2, HO-1 e GSH-Px no miocárdio do VE

Para quantificação do Nrf-2 foi realizada a extração e separação das proteínas nucleares das amostras de VE por meio de extração com tampão para extrato nuclear recomendada pela fabricante Abcam(63). Para a HO-1 e GSH-Px foi empregada a extração de células totais com tampão Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA), como descrito pela fabricante Abcam(53). A concentração de proteína dos extratos foi analisada pelo método de Bradford. As proteínas presentes nos extratos foram aplicadas em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato 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). 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 IgG - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa; Anti-Heme Oxygenase 1 [HO-1-1] ab13248 - Abcam, Reino Unido; Anti-Glutathione Peroxidase 1 ab22604 – Abcam, Reino Unido). Após três lavagens com solução basal (Tris 1 M pH 8,0, NaCl 5 M e detergente Tween 20), a membrana foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpo secundário (IgG anti-rabbit Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa) e novamente lavados em solução basal três vezes. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimiluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, EUA). Como controle interno, foi utilizada a proteína GAPDH (GAPDH 6C5, mouse monoclonal IgG1 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa; Goat anti-mouse IgG - HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europa).

As bandas de interesse foram localizadas por meio de marcador de peso molecular, com peso de 100 kDa para o Nrf-2, 22 kDa para GSH-Px e 34 kDa para HO-1. A imunodeteção foi realizada por meio de fotodocumentador 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 Image 32 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 testes foram realizados por meio do software SigmaStat for Windows v2.03 da SPSS. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. As variáveis com distribuição não normal foram normalizadas por meio de transformação matemática para serem testadas.

Foram analisados os efeitos do infarto (I), do alecrim (A) e a interação entre os fatores (IxA) por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes. Para a comparação do tamanho do infarto foi utilizado o teste ANOVA de uma via. O nível de significância adotado foi de 5%.

O teste ANOVA de duas vias avaliou os efeitos de cada fator sobre as variáveis estudadas, independentemente do efeito do outro fator, bem como a interação entre os dois fatores. Quando ocorre interação significativa entre os fatores ($p < 0,05$), torna-se importante identificar os grupos que apresentam diferença entre si. Para tanto, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. No caso de interação entre os fatores, os dados foram representados em gráficos de barra tridimensionais, de modo a permitir a visualização dos seis grupos experimentais avaliados, bem como a influência de cada fator sobre as variáveis estudadas.

Quando não houve interação entre os fatores, foram analisados os dados marginais, a fim de saber se animais infartados diferem dos animais Sham e se os suplementados com alecrim diferem daqueles sem suplementação. Neste caso, os dados e as diferenças foram representados em gráficos de barras.

Com base nessas considerações, discutimos os resultados da seguinte maneira: 1) efeito da suplementação de alecrim no coração sem agressão, correspondendo às comparações entre os grupos SA0, SA002 e SA02 na ocorrência de interação; 2) alterações causadas pelo infarto, correspondendo às comparações entre os grupos SA0 e IA0 na ocorrência de interação, e as comparações entre todos os animais sem infarto e todos os animais com infarto na ausência de interação entre os fatores; 3) efeito da suplementação de alecrim nos animais infartados, correspondendo à comparação entre os grupos IA0, IA002 e IA02 na ocorrência de interação; 4) efeito da suplementação de alecrim tanto no infarto como no coração sem agressão, correspondendo à comparação entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim na ausência de interação entre os fatores.

Para avaliar a mortalidade entre os animais infartados, foi utilizado o teste χ^2 .

Para a análise dos dados e a construção dos gráficos, foi utilizado software Sigma Plot versão 11.0 da SPSS (San Jose, CA, EUA).

Resultados

Ingestão de ração, peso corporal, pressão arterial sistólica, tamanho do infarto e mortalidade

Não houve diferença entre os animais em relação ao consumo de ração, peso corporal inicial e pressão arterial, como descrito na Tabela 1. Os animais suplementados com 0,02% de alecrim apresentaram maior peso corporal em comparação aos animais sem suplementação de alecrim e aos animais suplementados com 0,2% de alecrim, como representado na Figura 2. Não houve diferença para o tamanho do infarto entre os grupos infartados (Tabela 1).

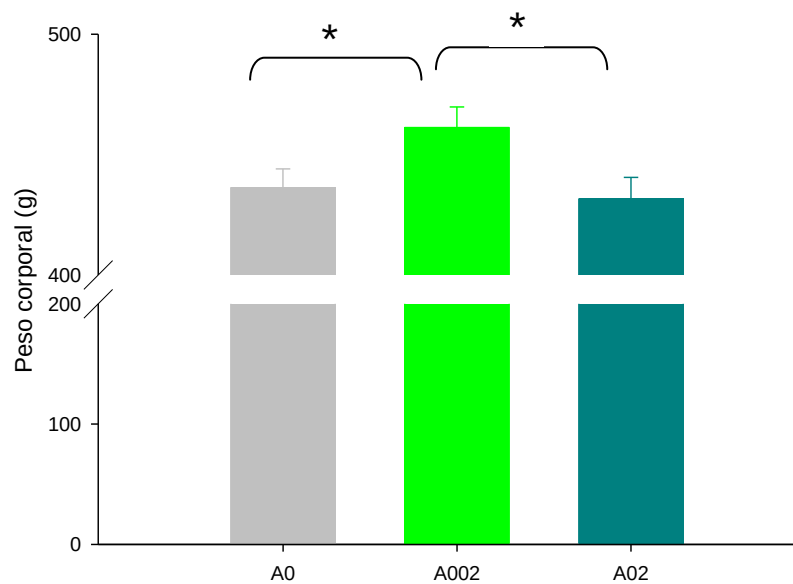
A mortalidade nas 48 horas após o infarto foi de 43%. Ao longo do período experimental, não foi observada a morte de nenhum animal dos grupos Sham. Entre os grupos infartados, morreram dois animais do grupo IA0, um do grupo IA1 e dois animais do grupo IA02 ($p=0,765$).

Tabela 1. Consumo de ração, peso corporal final, pressão sistólica e tamanho do infarto.

Grupo	n	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Consumo de ração (g)	Pressão sistólica (mmHg)	Tamanho do infarto (%)*
SA0	22	256±16,1	432±9,25	25,8±0,2	120±3,1	-
SA002	23	256±6,12	457±9,05	24,6±0,2	128±3,2	-
SA02	22	257±16,1	435±9,26	25,7±0,2	128±3,1	-
IA0	13	253±15,1	440±12,5	25,4±0,2	126±3,1	41,9±4,5
IA002	9	270±15,2	466±14,5	25,0±0,2	124±3,1	40,1±4,2
IA02	8	266±14,6	428±15,3	25,5±0,2	126±3,1	43,6±4,7
p (I)		0,606	0,707	0,187	0,933	-
p (A)		0,837	0,035¹	0,101	0,502	0,244
p (Ix A)		0,864	0,730	0,143	0,343	-

I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: sem suplementação; A002: suplementação com 0,02% de alecrim; A02: suplementação com 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. *Testado por ANOVA de uma via e apresentado como média ± desvio padrão. ¹ Comparações para fator Alecrim: animais suplementados com 0,02% diferem dos animais sem suplementação de alecrim e suplementados com 0,2%.

Figura 2. Peso corporal final.



A0: animais sem suplementação; A002: animais com suplementação de 0,02% de alecrim; A02: animais com suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados obtidos pelo estudo ecocardiográfico estão nas tabelas 2a e 2b (variáveis morfológicas e funcionais).

Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas variáveis ecocardiográficas nas comparações entre os grupos SA0, SA002 e SA02 (interação entre os fatores).

O infarto causou alterações morfológicas, caracterizadas por maior diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (Figura 3), espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (Figura 4), maior área diastólica (Figura 5) e maior átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal e pela aorta (Figura 6 e 7). Foram observadas também alterações funcionais, como menor tempo de desaceleração da onda E (Figura 8), menor fração de variação da área do VE (Figura 9) e maior relação E/E' média (Figura 10).

Em relação ao efeito da suplementação de alecrim nos animais infartados, observou-se que o grupo infartado que recebeu 0,02% de alecrim apresentou menor átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal e pela aorta (Figura 11 e 12) e maior TDE (Figura 13) em comparação ao grupo infartado sem suplementação com alecrim e grupo que recebeu a suplementação de 0,2% de alecrim. O grupo suplementado com 0,2% de alecrim apresentou maior AE/AO em comparação ao grupo que recebeu 0,02% de alecrim, sem diferença em comparação ao grupo infartado sem suplementação (Figura 12).

Não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim (na ausência de interação).

Tabela 2a. Variáveis ecocardiográficas morfológicas.

Grupo	n	DDVE/PC* (mm/kg)	EDPP* (mm)	Espessura relativa do VE	AE/PC (mm/kg)	AE/AO*	Área Diastólica (mm ²)
SA0	22	17,9±0,41	1,36±0,02	0,35±0,006	12,2±0,3 ^a	1,32±0,02 ^a	44,4±1,62
SA002	23	17,1±0,39	1,39±0,01	0,36±0,007	12,2±0,5 ^b	1,41±0,04 ^b	44,5±1,84
SA02	22	17,9±0,29	1,38±0,01	0,36±0,007	12,4±0,4 ^c	1,38±0,03 ^c	43,3±1,65
IA0	13	24,6±0,74	1,95±0,06	0,36±0,012	17,3±0,6 ^{a,A}	2,06±0,09 ^{a,A}	92,2±3,93
IA002	9	24,2±0,68	1,99±0,08	0,36±0,023	15,5±1,0 ^{b,A,B}	1,93±0,14 ^{b,A,B}	91,7±6,89
IA02	8	24,1±0,93	2,00±0,08	0,39±0,019	19,4±0,9 ^{c,B}	2,25±0,08 ^{c,B}	85,2±4,50
p (I)		<0,001	<0,001	0,179	<0,001	<0,001	<0,001
p (A)		0,504	0,456	0,310	0,03	0,079	0,359
p (IxA)		0,582	0,938	0,311	0,001	0,024	0,557

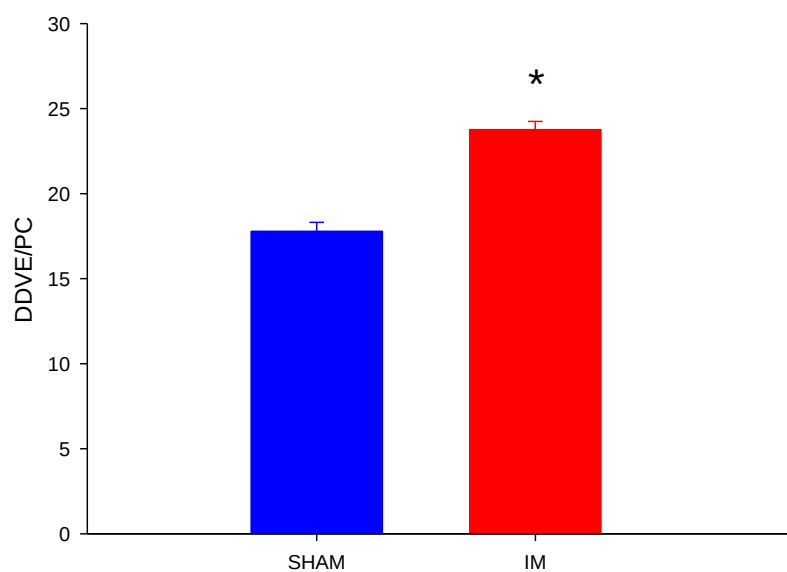
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; VE: Ventrículo esquerdo; DDVE: Diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DDVE/PC: Diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; AO: Diâmetro da aorta; AE: Diâmetro do átrio esquerdo; AE/PC: Átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; AE/AO: Átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.* aplicado operações matemáticas para normalidade (para DDVE/PC e EDPP foi calculado o recíproco; para AE/AO foi utilizado logaritmo neperiano). Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos: comparação para fator Infarto: (a — I≠S entre os grupos A0; b — I≠S entre os grupos A002; c — I≠S entre os grupos A02); comparações para o fator Alecrim: (A — A0≠A002 entre os grupos infartados; B — A002≠A02 entre os grupos infartados; C — A0≠A02 entre os grupos infartados).

Tabela 2b. Variáveis ecocardiográficas funcionais.

Grupo	n	FC (bpm)	VEPP (m/s)	E mitral (cm/s)	A mitral (cm/s)	% variação área	Fração de ejeção	TDE (ms)	TRIV/R-R	E/E' média
SA0	22	304±10	38,6±0,6	75,7±1,5	54,5±2,8	73,3±0,91	0,91±0,01	41,7±1,25 ^a	55,2±1,49	19,1±0,65
SA002	23	312±12	37,8±1,0	77,2±2,1	58,9±3,6	74,3±1,23	0,92±0,01	44,8±1,98	53,3±1,50	19,6±0,86
SA02	22	323±11	38,4±0,8	78,9±1,8	58,3±2,0	75,6±1,00	0,93±0,01	45,3±1,38 ^c	53,9±1,48	18,8±0,61
IA0	13	290±10	23,6±2,1	98,4±5,5	52,8±4,2	27,0±2,32	0,47±0,02	36,1±2,49 ^{a,A}	67,1±3,99	24,4±1,66
IA002	9	312±18	25,6±1,5	87,5±8,5	54,7±9,1	28,2±1,52	0,49±0,02	46,4±2,73 ^{A,B}	67,9±4,19	25,6±2,79
IA02	8	283±14	22,2±1,9	92,7±9,4	49,4±8,6	27,2±3,48	0,46±0,02	31,5±2,04 ^{c,A,B}	70,3±5,71	23,6±2,63
p (I)		0,411	<0,001	0,014	0,176	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
p (A)		0,984	0,990	0,482	0,725	0,697	0,571	0,002	0,857	0,898
p (Ix A)		0,747	0,772	0,246	0,720	0,757	0,612	0,004	0,689	0,523

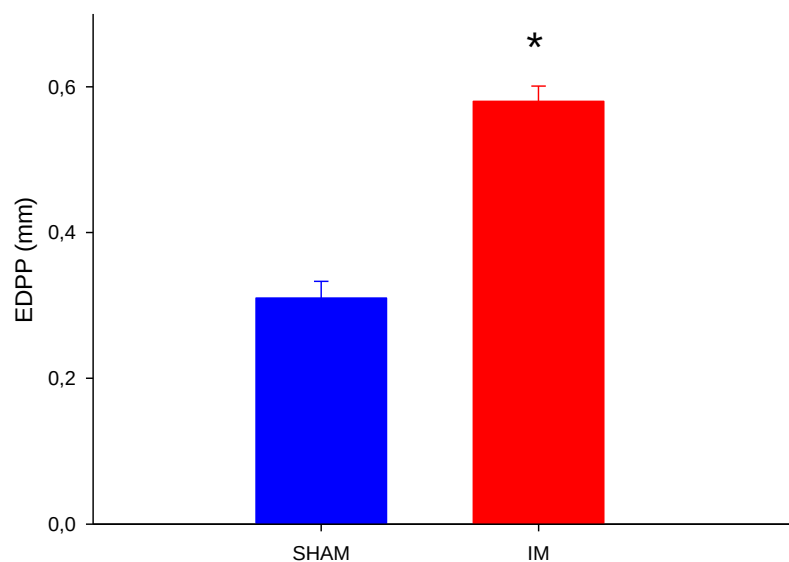
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; VE: Ventrículo esquerdo; FC: Frequência cardíaca; VEPP: Velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E mitral: Onda E do fluxo transmitral; A mitral: Onda A do fluxo transmitral; TRIV: Tempos de relaxamento isovolumétrico; TDE: Tempo de desaceleração da onda E; E/E' média: Relação da onda E do fluxo mitral/E' do anel mitral. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos = comparação para o fator Infarto: (a — I≠S entre os grupos A0; b — I≠S entre os grupos A002; c — I≠S entre os grupos A02); comparações para o fator Alecrim: (A — A0≠A002 entre os grupos infartados; B — A002≠A02 entre grupos infartados; C — A0≠A02 entre os grupos infartados).

Figura 3. Diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal (ecocardiograma).



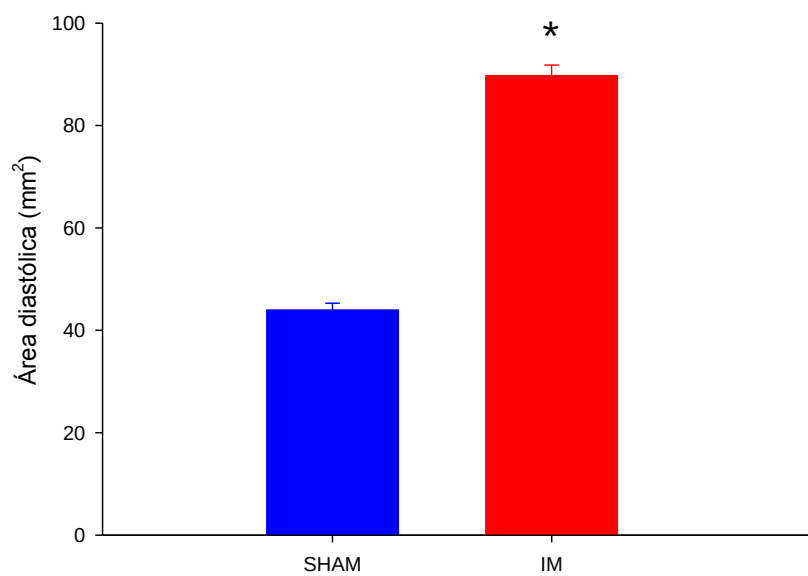
VE: Ventrículo esquerdo; DDVE/PC: Diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 4. Espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (ecocardiograma).



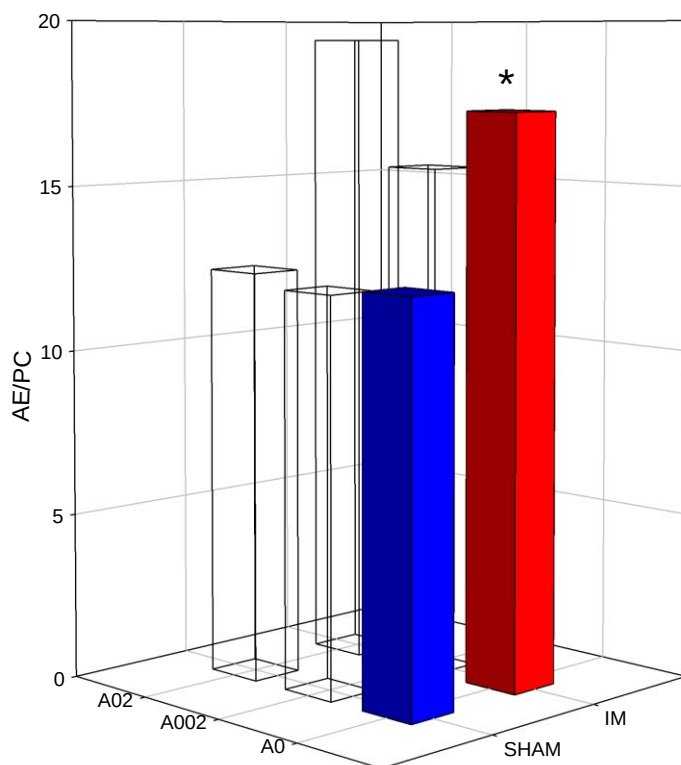
EDPP: Espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 8. Área diastólica da cavidade ventricular (ecocardiograma).



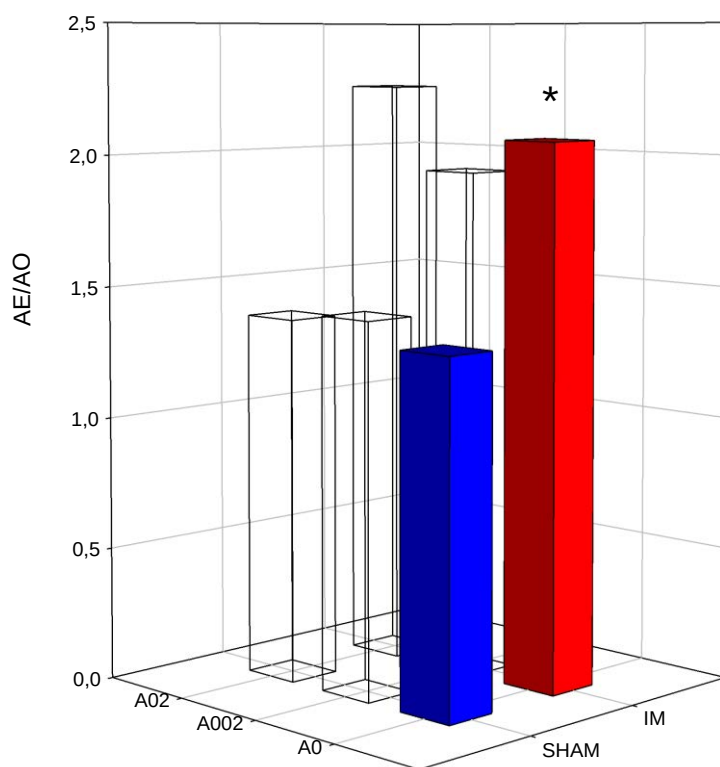
IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 6. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal (ecocardiograma).



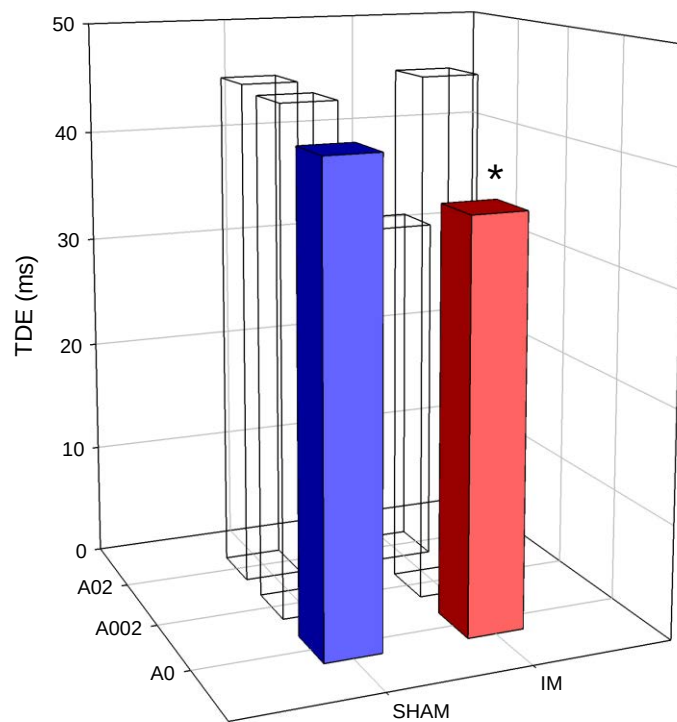
AE/PC: Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 7. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido diâmetro da aorta (ecocardiograma).



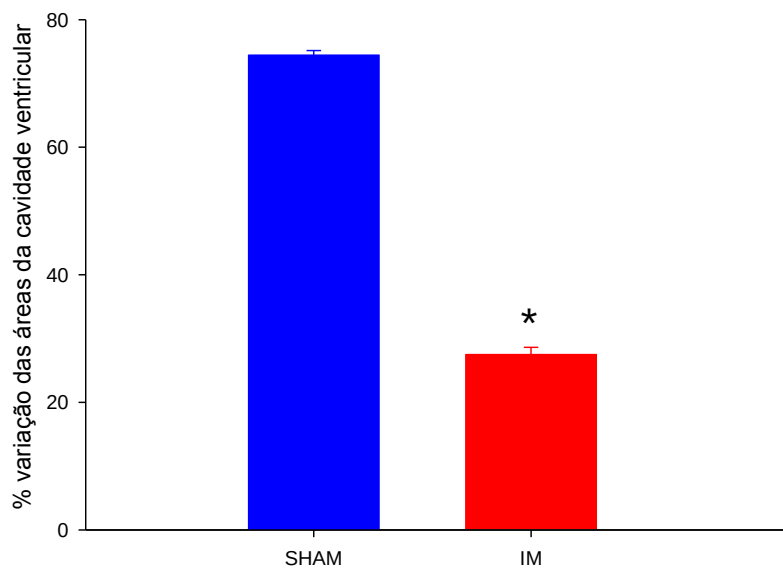
AE/AO: Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pela aorta; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 8. Tempo de desaceleração da onda E (ecocardiograma).



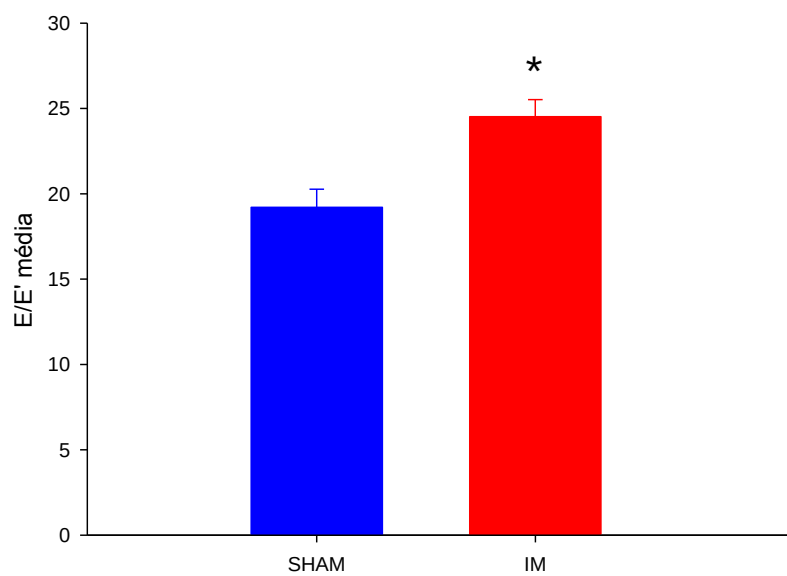
TDE: Tempo de desaceleração da onda E; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A02: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 9. Fração de variação das áreas da cavidade ventricular (ecocardiograma).



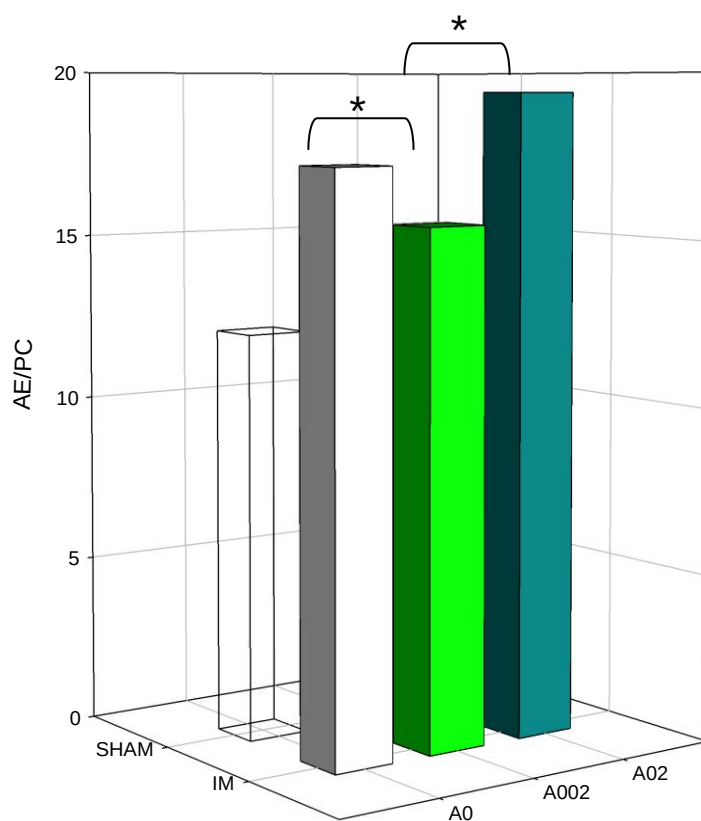
IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 10. Relação E/E' média (ecocardiograma).



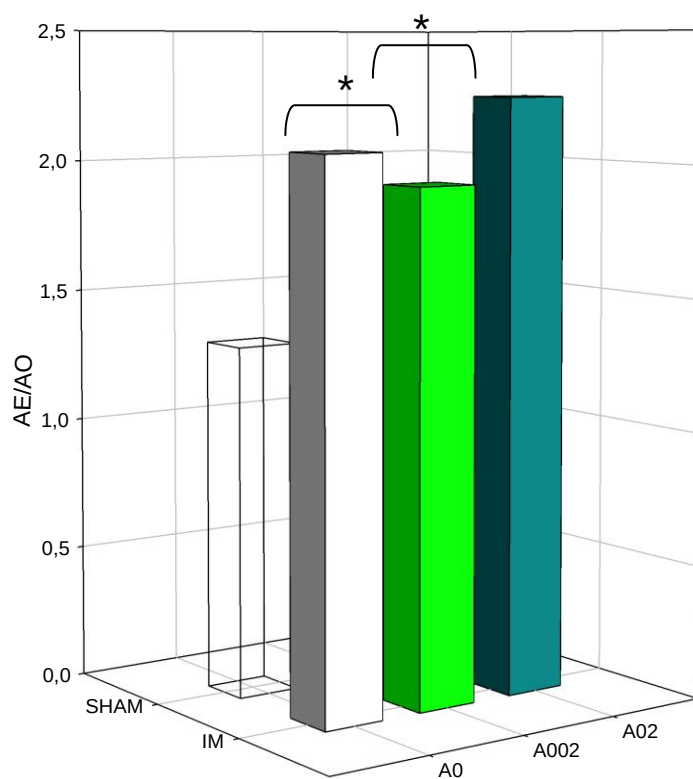
IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 11. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal (ecocardiograma).



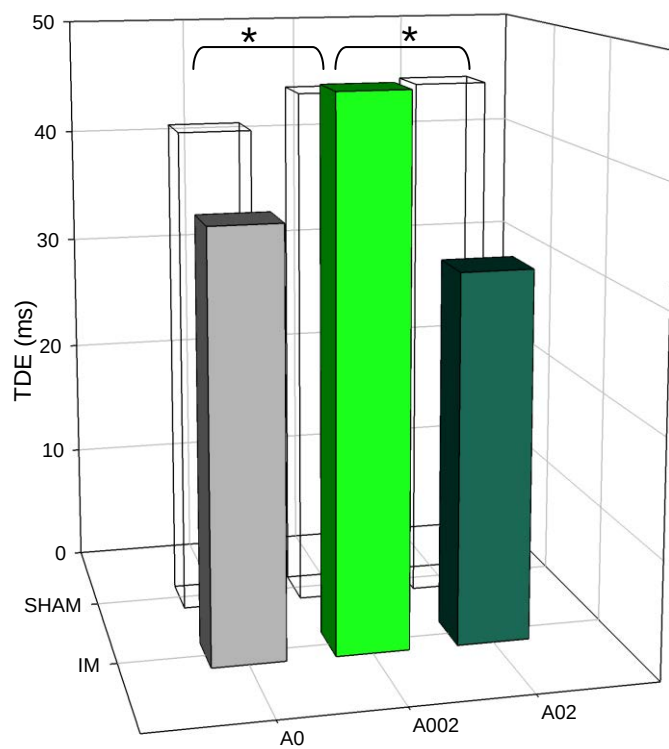
AE/PC: Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 12. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido diâmetro da aorta (ecocardiograma).



AE/AO: diâmetro do átrio esquerdo corrigido pela aorta; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 13. Tempo de desaceleração da onda E (ecocardiograma).



TDE: Tempo de desaceleração da onda E; IM: Infarto; A0: Suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Estudo morfométrico do VE, VD, átrios e pulmão

O infarto levou ao maior peso do VE, VD, átrios corrigidos e pulmão corrigidos pelo peso corporal. Em relação ao efeito da suplementação de alecrim nos grupos infartados, não foram verificadas diferenças nas variáveis morfométricas (Tabela 3).

Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim (sem interação entre os fatores).

Tabela 3. Estudo morfométrico dos tecidos.

Grupo	n	VE/PC (mg/g)	Átrios/PC* (mg/g)	VD/PC (mg/g)*	Pulmão/PC (mg/g)*
SA0	22	1,95±0,05	0,12±0,01	0,54±0,03	5,00±0,29
SA002	23	1,98±0,05	0,13±0,01	0,55±0,03	4,73±0,28
SA02	22	1,92±0,05	0,12±0,01	0,56±0,03	5,01±0,29
IA0	9	2,18±0,08	0,34±0,02	0,80±0,04	6,43±0,42
IA002	7	1,97±0,09	0,28±0,02	0,75±0,05	5,90±0,44
IA02	8	2,09±0,09	0,25±0,02	0,73±0,05	4,78±0,46
p (I)		0,027	<0,001	<0,001	0,012
p (A)		0,431	0,120	0,823	0,097
p (Ix A)		0,199	0,255	0,519	0,071

VE: Peso do ventrículo esquerdo; I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; VE: Ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; PC: Peso corporal. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. * Transformados matematicamente por Logaritmo neperiano para análise estatística.

Análise histológica do miocárdio do VE

Os resultados obtidos pela análise histológica estão apresentados na Tabela 4.

Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre os grupos SA0, SA002 e SA02 para área do miócito (com interação entre os fatores).

O infarto levou a maior da área do miócito (Figura 14) e da porcentagem de colágeno (Figura 15).

Em relação ao efeito da suplementação de alecrim nos animais infartados, observou-se que o grupo infartado que recebeu 0,02% de alecrim apresentou menor área do miócito em comparação ao grupo sem alecrim (Figura 16). Não houve diferença para a porcentagem de colágeno com a suplementação de alecrim nos animais infartados.

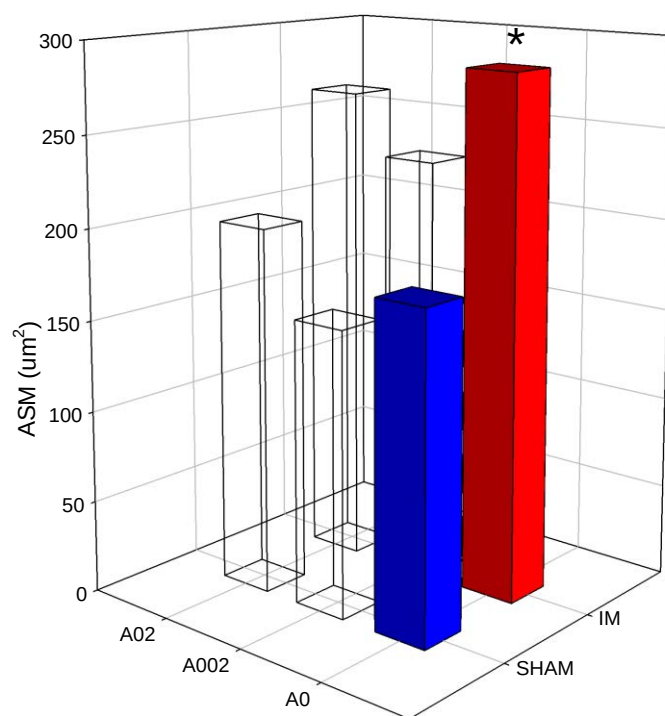
Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim para porcentagem de colágeno (na ausência de interação).

Tabela 4. Análise histológica do miocárdio do VE.

Grupo	n	Área do miócito (μm^2)	% colágeno*
SA0	22	176 $\pm$ 10,5 ^a	3,97 $\pm$ 0,38
SA002	23	155 $\pm$ 11,3 ^b	3,87 $\pm$ 0,79
SA02	22	200 $\pm$ 11,3 ^c	3,71 $\pm$ 0,27
IA0	13	285 $\pm$ 11,4 ^{a,A}	8,73 $\pm$ 1,71
IA002	9	232 $\pm$ 13,4 ^{b,A}	5,11 $\pm$ 0,36
IA02	8	265 $\pm$ 12,5 ^c	5,97 $\pm$ 0,26
p (I)		<0,001	0,046
p (A)		<0,001	0,553
p (Ix A)		<0,001	0,507

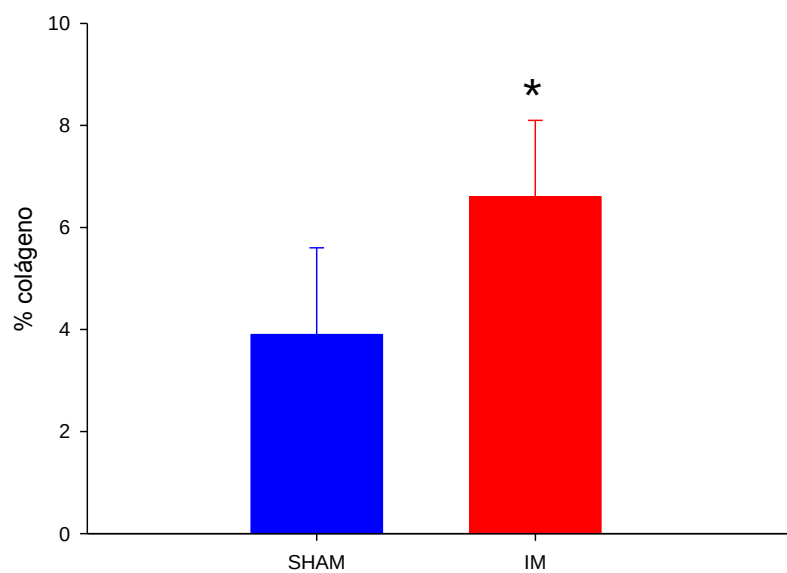
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média.* aplicado operações matemáticas para normalidade (para % de colágeno foi calculado o numero recíproco). Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos = comparação para o fator Infarto: (a — I $\neq$ S entre os grupos A0; b—I $\neq$ S entre os grupos A002; c— I $\neq$ S entre os grupos A02); comparações para o fator Alecrim: (A — A0 $\neq$ A002 entre os grupos infartados; B — A002 $\neq$ A02 entre grupos infartados; C — A0 $\neq$ A02 entre os grupos infartados).

Figura 14. Área seccional do miócito (histologia).



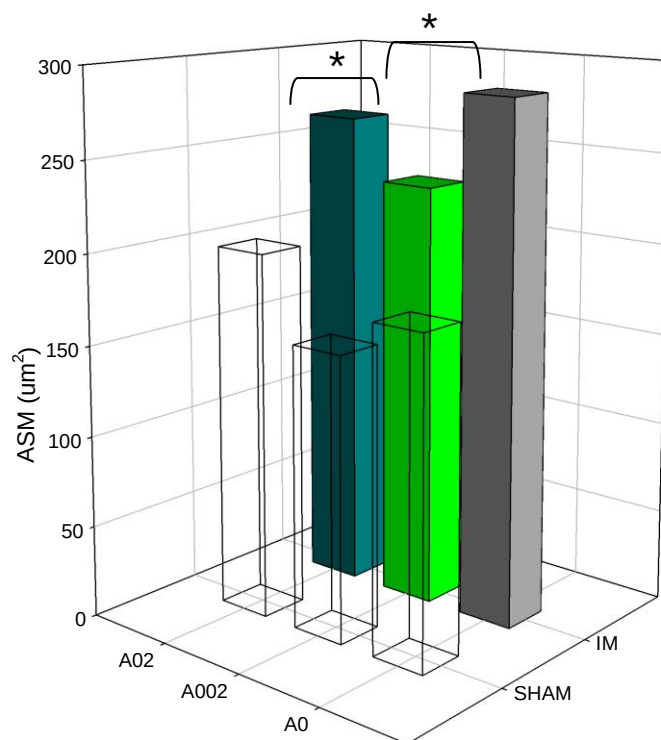
IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 15. Porcentagem de colágeno no miocárdio do VE (histologia).



IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 16. Área seccional do miócito cardíaco (histologia).



ASM: Área seccional do miócito cardíaco; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Avaliação da produção de TIMP-1 e atividade da MMP-2 no miocárdio do VE

Os resultados da concentração de TIMP e da atividade da MMP-2 estão apresentados na Tabela 5.

Não foi observado diferença na concentração de TIMP entre todos os grupos.

O infarto levou a maior atividade da MMP-2 intermediária (Figura 17) e total (Figura 18). A suplementação com alecrim não alterou a atividade da MMP-2 nos grupos infartados (Tabela 5).

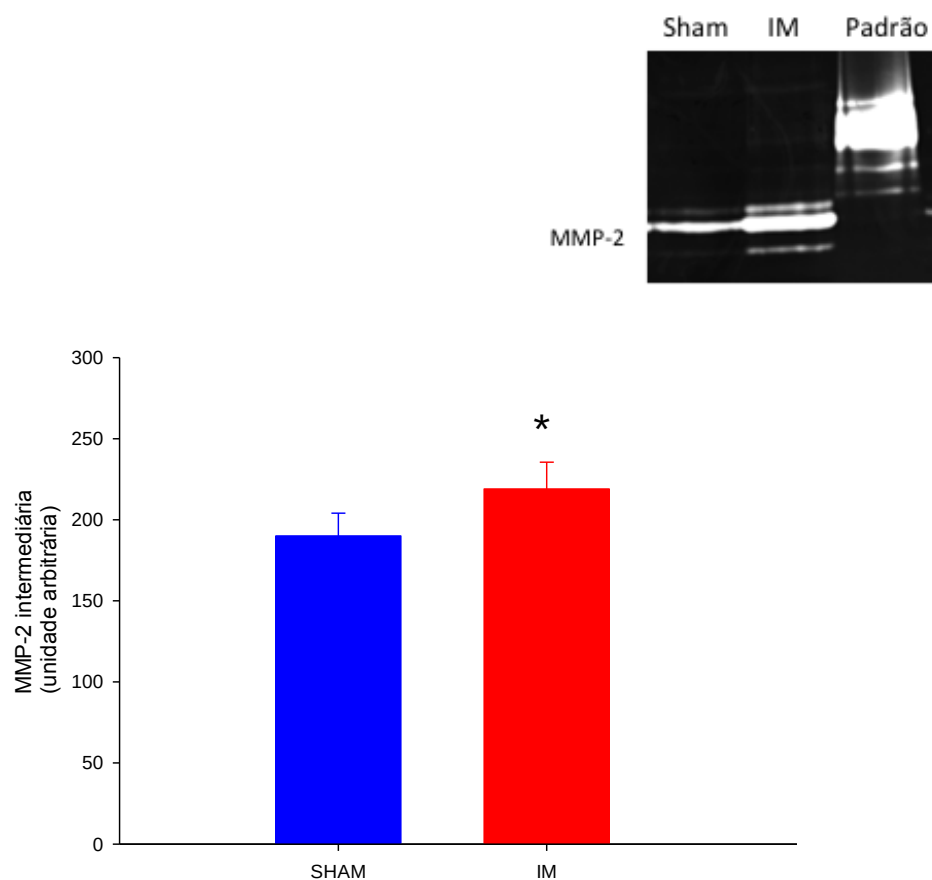
Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim para a MMP-2 (sem interação entre os fatores).

Tabela 5. Avaliação da produção de TIMP-1 e atividade da MMP-2 no miocárdio do VE.

Grupo	n	TIMP-1 (pg/mg proteína)*	MMP-2 Ativa* (unidade arbitrária)	MMP-2 Inativa (unidade arbitrária)	MMP-2 Intermediária (unidade arbitrária)	MMP-2 Total (unidade arbitrária)	MMP-2 Ativa/inativa	MMP-2 Ativa/Total*	MMP-2 Intermediária /Total
SA0	6	84,2±10,6	12,6±4,33	63,7±33,5	169±22,9	243,4±51,9	0,27±0,07	0,05±0,001	0,76±0,06
SA002	6	98,2±24,7	7,8±3,19	40,1±10,2	195±12,5	241,9±19,4	0,17±0,06	0,03±0,01	0,82±0,04
SA02	6	127±31,2	13,8±3,79	48,5±7,5	207±8,40	269,3±14,9	0,26±0,04	0,05±0,01	0,78±0,03
IA0	5	113±41,5	29,1±15,0	85,1±29,9	218±11,5	332,7±45,0	0,49±0,22	0,07±0,02	0,71±0,07
IA002	4	70,3±16,0	9,6±4,62	50,9±19,7	214±18,7	274,3±37,3	0,19±0,06	0,03±0,01	0,79±0,06
IA02	4	112±3,56	58,6±42,1	118,3±54,9	225±7,97	401,8±96,3	0,38±0,14	0,10±0,06	0,65±0,13
p (I)		0,259	0,181	0,147	0,032	0,033	0,305	0,346	0,227
p (A)		0,780	0,228	0,392	0,360	0,266	0,237	0,232	0,394
p (Ix A)		0,549	0,986	0,540	0,504	0,572	0,834	0,940	0,754

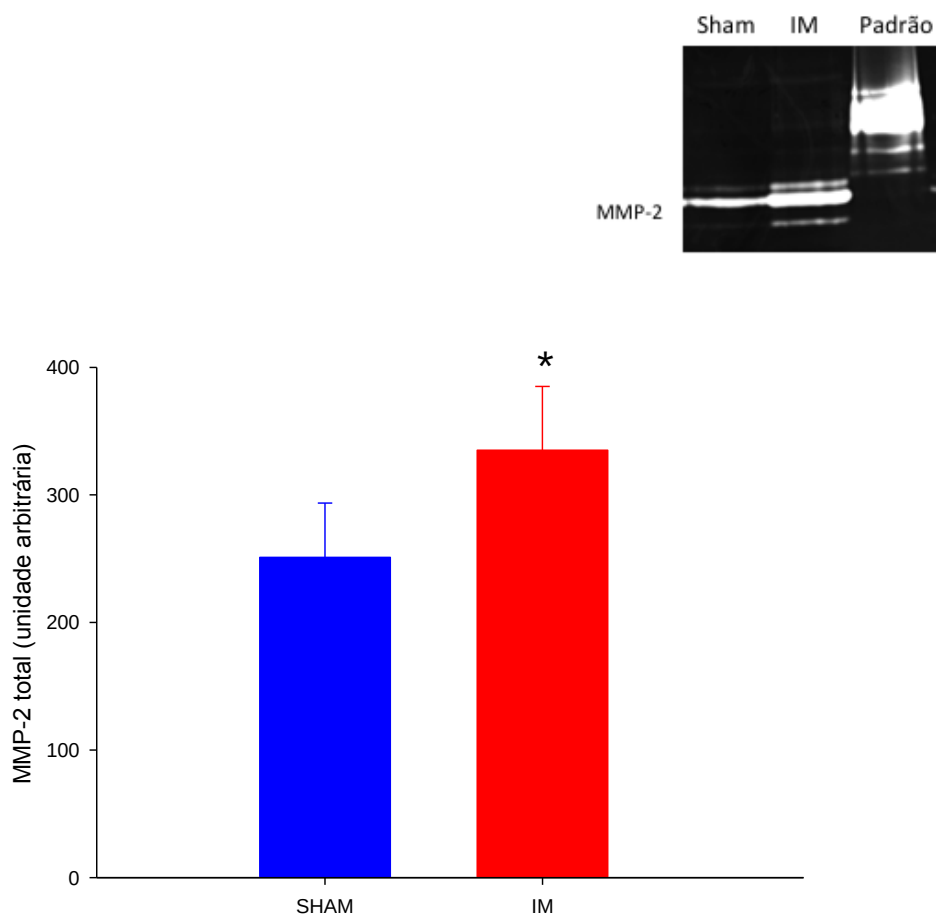
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim. TIMP: Inibidor de metaloprotease-1. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. * Submetidos a transformação matemática: 1/TIMP; Logaritmo neperiano da MMP-2 ativa; Logaritmo neperiano da MMP-2 ativa/total.

Figura 17. Atividade da MMP-2 intermediária (zimografia).



MMP-2: metaloprotease-2; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$. A figura no topo à direita representa as bandas da MMP-2 fotografadas e o padrão utilizado como referência.

Figura 18. Atividade da MMP-2 total (histologia).



MMP-2: metaloprotease-2; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$. A figura no topo à direita representa as bandas da MMP-2 fotografadas e o padrão utilizado como referência.

Avaliação da produção de citocinas no miocárdio do VE

Os resultados da avaliação da produção de citocinas no miocárdio do VE estão apresentados na Tabela 6.

O infarto levou a menor concentração de IL-10, TNF- α e INF- γ , como representado nas Figuras 19 a 21. Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nos animais infartados (Tabela 6).

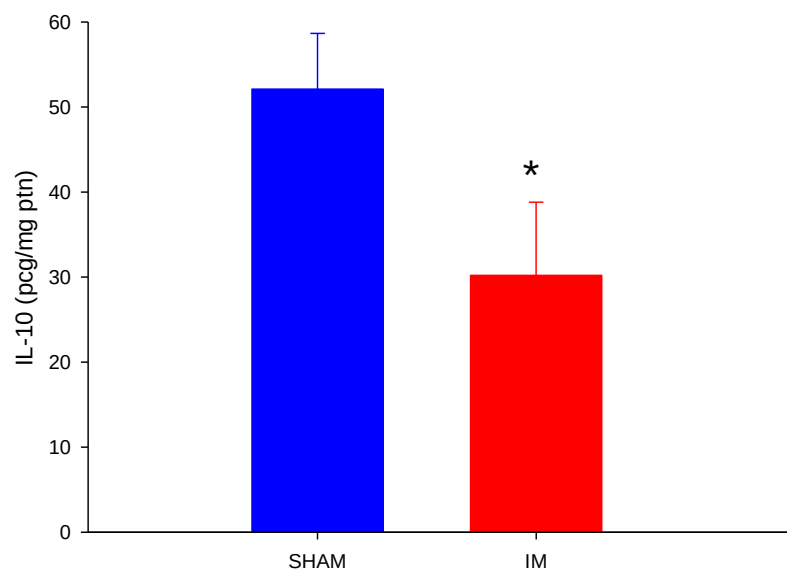
Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim para as citocinas (sem interação).

Tabela 6. Concentração de citocinas no miocárdio do VE.

Grupo	n	IL-10 (pg/mg proteína)	ICAM-1 (pg/mg proteína)	TNF- α (pg/mg proteína)	INF- γ (pg/mg proteína)
SA0	7	46,9 $\pm$ 4,19	95,7 $\pm$ 10,2	41,8 $\pm$ 4,19	28,9 $\pm$ 2,63
SA002	7	45,5 $\pm$ 5,88	95,1 $\pm$ 7,77	41,2 $\pm$ 5,64	27,6 $\pm$ 3,44
SA02	7	63,9 $\pm$ 10,5	115 $\pm$ 15,6	58,3 $\pm$ 10,5	36,3 $\pm$ 5,87
IA0	5	32,6 $\pm$ 5,75	92,1 $\pm$ 1,39	26,8 $\pm$ 3,13	19,8 $\pm$ 3,03
IA002	3	34,2 $\pm$ 7,87	99,3 $\pm$ 22,6	27,9,2 $\pm$ 5,85	20,9 $\pm$ 4,09
IA02	4	23,9 $\pm$ 2,49	74,7 $\pm$ 11,7	18,4 $\pm$ 3,49	15,5 $\pm$ 1,85
p (I)		0,002	0,224	<0,001	0,002
p (A)		0,826	0,969	0,823	0,913
p (Ix A)		0,149	0,214	0,146	0,246

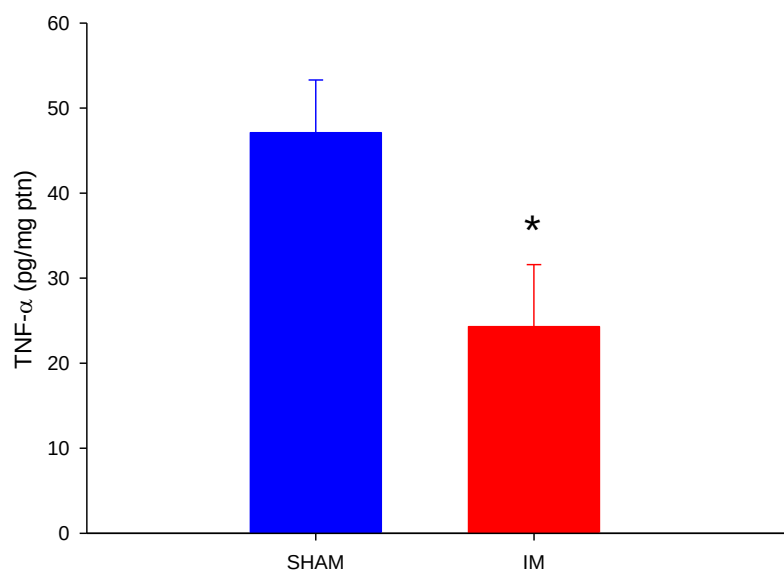
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim. IL-10: Interleucina 10; ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; INF- γ : Inteferon gama. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 19. Interleucina-10 no miocárdio do VE (ELISA).



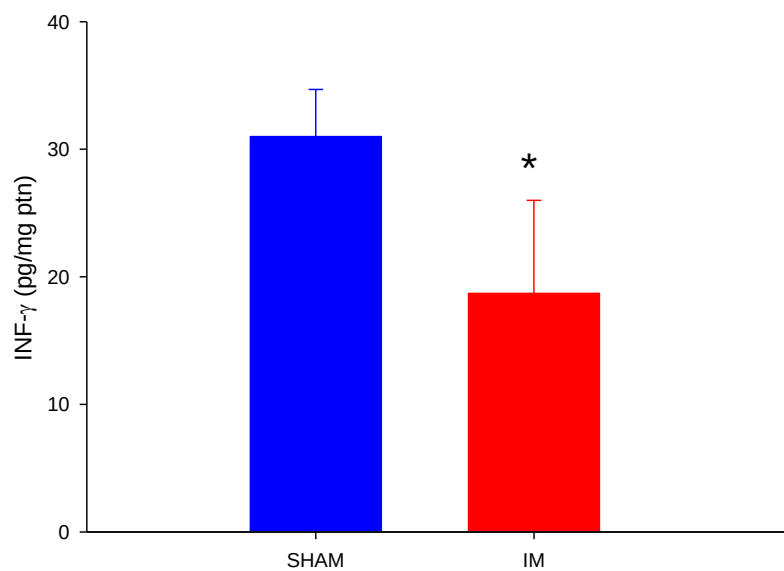
IL-10: Interleucina-10; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 20. Fator de necrose tumoral alfa no miocárdio do VE (ELISA).



TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 21. Interferon gama no miocárdio do VE (ELISA).



INF-γ: Interferon gama; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Determinação da apoptose no miocárdio do VE

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 7. Não foi observada diferença entre os grupos em relação à caspase-3.

O infarto levou a menor expressão da Bcl2, como representado na Figura 22. Não houve efeito da suplementação de alecrim sobre a expressão da Bcl2 nos grupos infartados (Tabela 7).

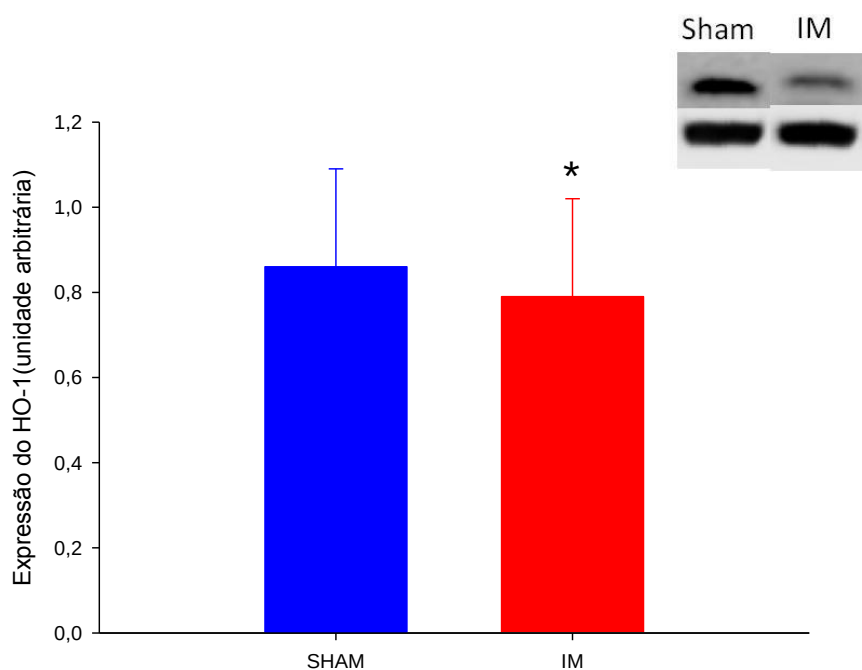
Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim para a expressão da Bcl-2 (sem interação entre os fatores).

Tabela 7. Expressão de caspase-3 e Bcl-2 no miocárdio do VE.

Grupo	n	Caspase-3 (unidade arbitrária)	Bcl-2 (unidade arbitrária)
SA0	6	0,47±0,71	1,30±0,47
SA002	6	0,55±0,35	0,94±0,38
SA02	6	0,52±0,12	0,80±0,24
IA0	6	0,71±0,33	0,65±0,31
IA002	6	0,47±0,12	0,91±0,45
IA02	6	0,52±0,22	0,41±0,22
p (I)		0,254	0,046
p (A)		0,742	0,216
p (Ix A)		0,853	0,416

I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Figura 22. Expressão proteica da Bcl-2 no miocárdio do VE (Western blot).



IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$. A figura no topo à direita representa as bandas da Bcl-2 sobre as bandas do GAPDH fotografadas.

Avaliação do metabolismo energético cardíaco no miocárdio do VE

Os resultados da avaliação das enzimas do metabolismo energético cardíaco e dos complexos mitocondriais estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Não foi observado efeito da suplementação de alecrim no coração sem agressão (na interação entre os fatores).

O infarto levou a maior atividade da LDH (Figura 23) e da ATP sintase (Figura 24) e menor atividade da PIDH, CS, (Figuras 25 e 26) e do Complexo I da CR (Figura 27).

Em relação à suplementação de alecrim nos grupos infartados, os grupos suplementados com ambas as doses de alecrim apresentaram menor atividade da LDH (Figura 28) e maior atividade de CS e β -OH-acil CoA-DH em comparação ao grupo infartado sem alecrim (Figuras 29 e 30). Da mesma forma, os grupos infartados suplementados com alecrim em ambas as doses apresentaram maior atividade do Complexo I da CR em comparação ao grupo infartado sem alecrim (Figura 31). A suplementação de alecrim com 0,2% levou a maior atividade do complexo II em comparação aos grupos infartados sem suplementação e com suplementação de 0,02% de alecrim (Figura 32).

Nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados (sem interação entre os fatores), os animais suplementados com 0,02% e 0,2% de alecrim apresentaram maior atividade da PIDH em comparação aos animais sem suplementação de alecrim (Figura 33). Os animais suplementados com 0,2% apresentaram maior atividade da ATP sintase em comparação aos animais sem suplementação de alecrim e aos animais suplementados com 0,02% de alecrim (Figura 34).

Tabela 8. Atividade das enzimas do metabolismo cardíaco.

Grupo	n	LDH (nmol/mg proteína)	PFK (nmol/mg tecido)	PIDH (nmol/mg g tecido)	CS (nmol/mg tecido)	β-OH-acil CoA-DH (nmol/mg proteína)
SA0	8	162±8,05 ^a	117±7,81	323±12,9	26,1±1,48 ^a	22,9±2,49
SA002	8	179±11,8 ^b	121±7,55	349±17,2	26,2±1,75 ^b	18,5±2,71 ^b
SA02	8	165±8,04	115±9,35	342±8,50	26,6±2,30	16,4±1,67 ^c
IA0	7	192±11,8 ^{a,A,C}	129±10,9	275±14,3	18,3±1,18 ^{a,A,C}	32,2±2,02 ^{A,C}
IA002	8	147±9,59 ^A	116±6,87	327±14,9	34,8±3,52 ^{b,A}	58,6±6,46 ^{b,A}
IA02	7	151±8,00 ^C	108±4,24	319±4,88	31,2±1,16 ^C	59,8±7,43 ^{c,C}
p (I)		0,525	0,988	0,004 ¹	0,152	<0,001
p (A)		0,063	0,677	0,006 ²	0,011	0,071
p (IxA)		0,014	0,729	0,489	<0,001	<0,001

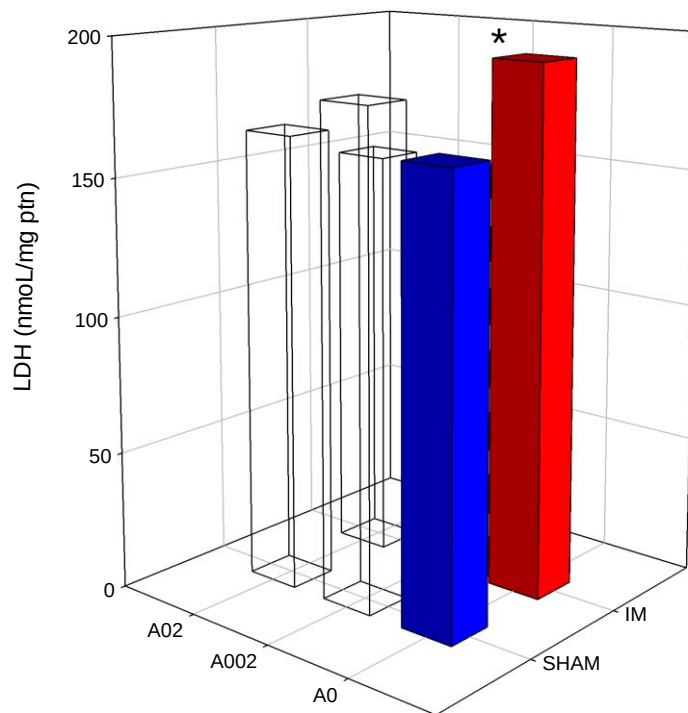
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; PFK: Fosfofrutoquinase; PIDH: Piruvato desidrogenase; CS: Citrato sintase; β-OH-acil CoA-DH: Beta-hidroxiacil Coenzima-A desidrogenase; LDH: Lactato desidrogenase. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. ²Comparações para o fator Alecrim: animais suplementados com 0,02% e 0,2 de alecrim diferentes dos animais sem suplementação de alecrim. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos = comparação para o fator Infarto: (a — I≠S entre os grupos A0; b—I≠S entre os grupos A002; c— I≠S entre os grupos A02); comparações para o fator Alecrim: (A — A0≠A002 entre os grupos infartados; B — A002≠A02 entre grupos infartados; C — A0≠A02 entre os grupos infartados).

Tabela 9. Atividade das enzimas da cadeia respiratória.

Grupo	n	ATP sintase (nmol/mg tecido)	Complexo I (nmol/mg tecido)	Complexo II (nmol/mg tecido)
SA0	8	24,7±1,89	3,77±0,22 ^a	6,01±0,43
SA002	8	27,8±2,46	3,47±0,24 ^b	6,16±0,45
SA02	8	34,6±3,69	3,77±0,26	5,63±0,52 ^c
IA0	7	26,7±2,10	2,83±0,32 ^{a,A,C}	5,43±0,22 ^C
IA002	8	36,3±3,16	4,59±0,46 ^{b,A}	5,49±0,46 ^B
IA02	7	38,5±2,76	4,36±0,22 ^C	8,32±0,48 ^{c,B,C}
p (I)		0,039 ¹	0,389	0,192
p (A)		0,008 ²	0,03	0,009
p (Ix A)		0,569	0,004	<0,001

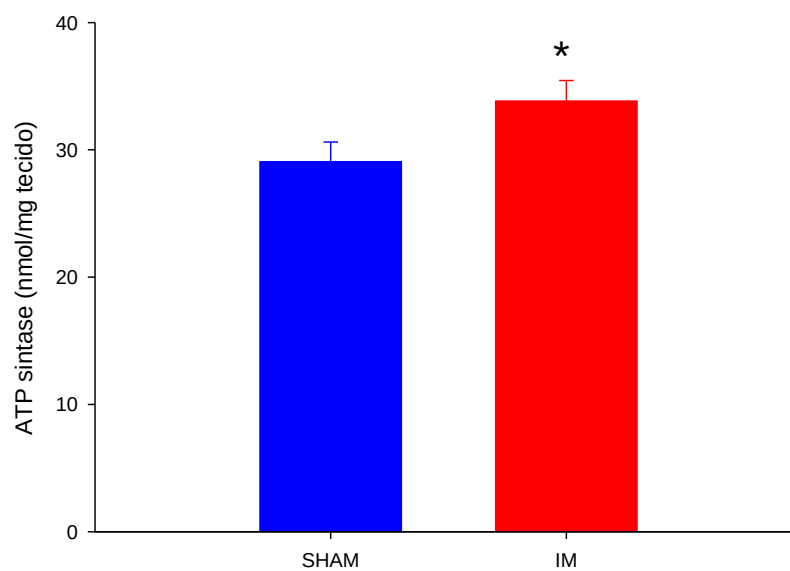
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; Complexo I: Complexo I da cadeia respiratória; Complexo II: Complexo II da cadeia respiratória. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ¹ Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. ² Comparação para o fator Alecrim: animais suplementados com 0,2% diferentes dos animais sem suplementação de alecrim e dos animais suplementados com 0,02%. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos = comparação para o fator Infarto: (a — I≠S entre os grupos A0; b—I≠S entre os grupos A002; c— I≠S entre os grupos A02); comparações para o fator Alecrim: (A — A0≠A002 entre os grupos infartados; B — A002≠A02 entre grupos infartados; C — A0≠A02 entre os grupos infartados).

Figura 23. Atividade da lactato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



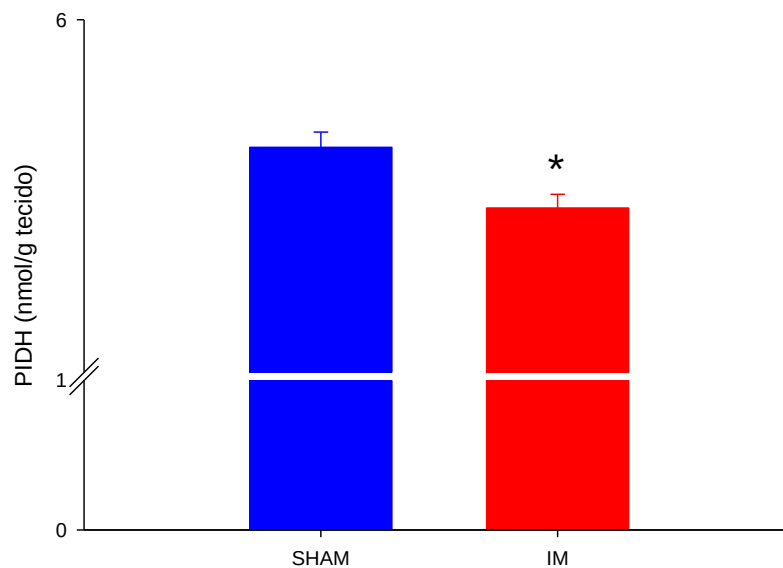
LDH: Lactato desidrogenase; IM: Infarto; A0: sem suplementação; A002: suplementação de 0,02% de alecrim; A02: suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 24. Atividade ATP sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



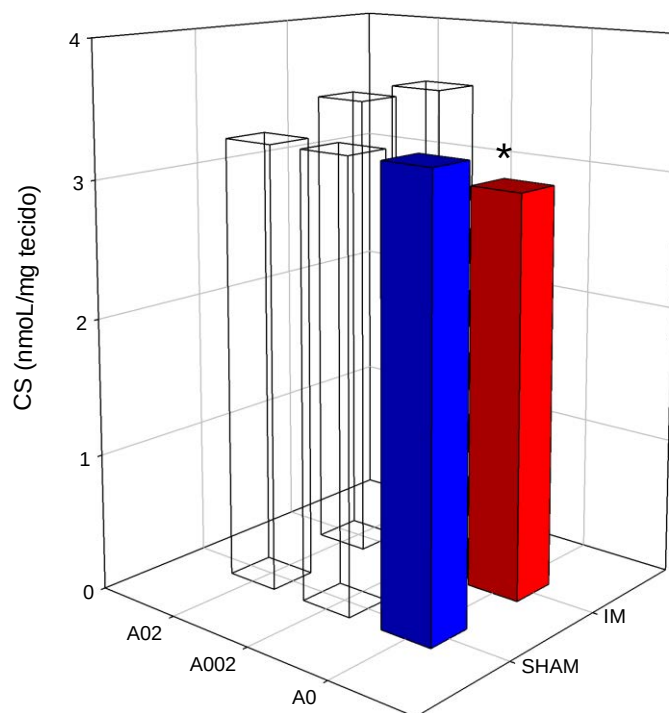
IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 25. Atividade da piruvato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



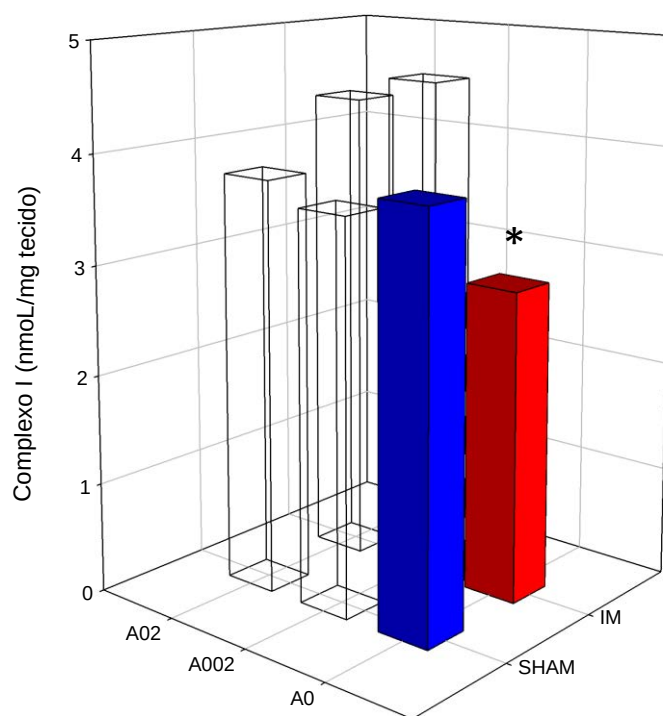
PIDH: Piruvato desidrogenase; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Figura 26. Atividade da citrato sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



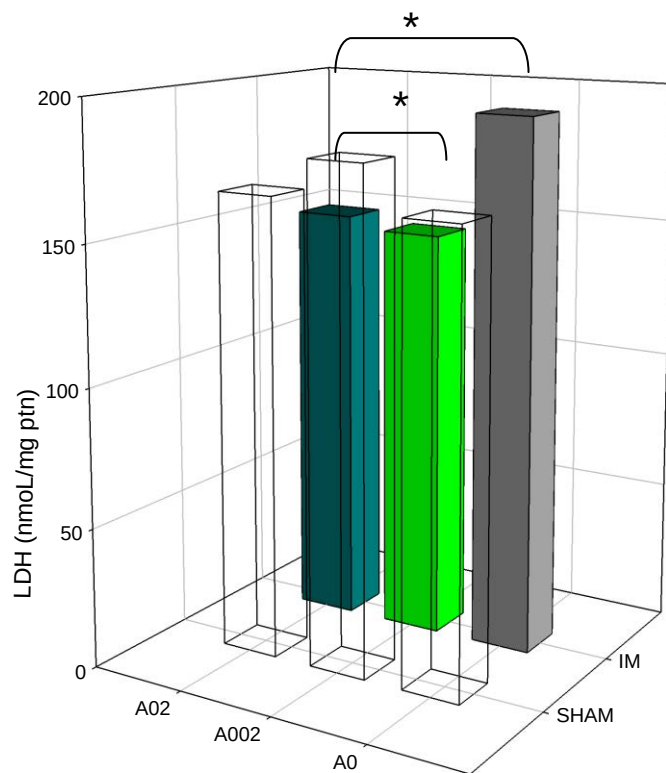
CS: Citrato sintase; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 27. Atividade do Complexo I da cadeia respiratória no miocárdio do VE (bioquímica).



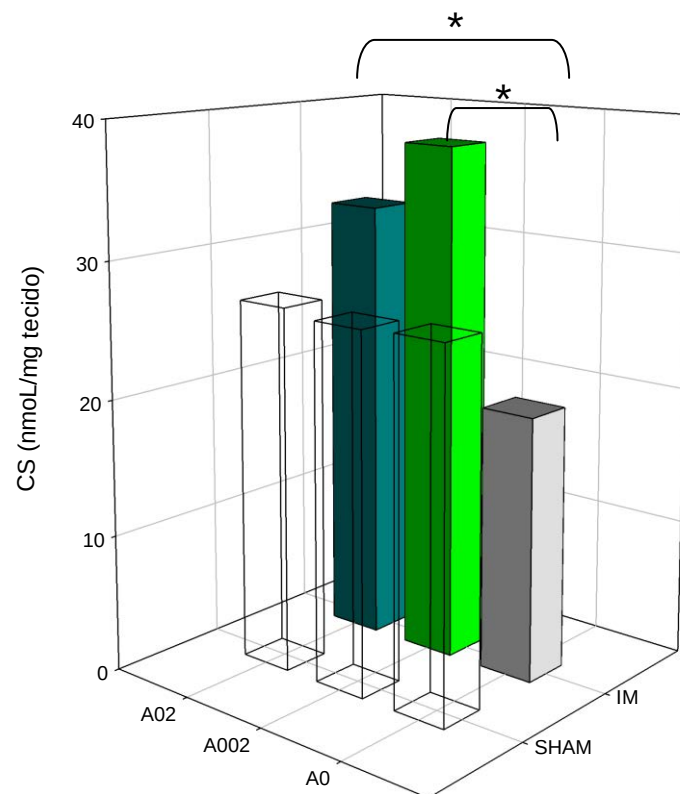
IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 28. Atividade da lactato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



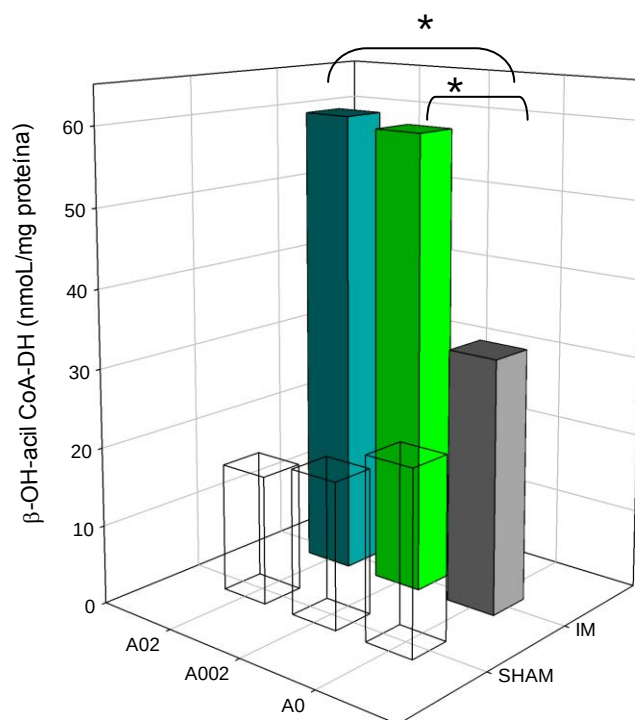
LDH: Lactato desidrogenase; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 29. Atividade da citrato sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



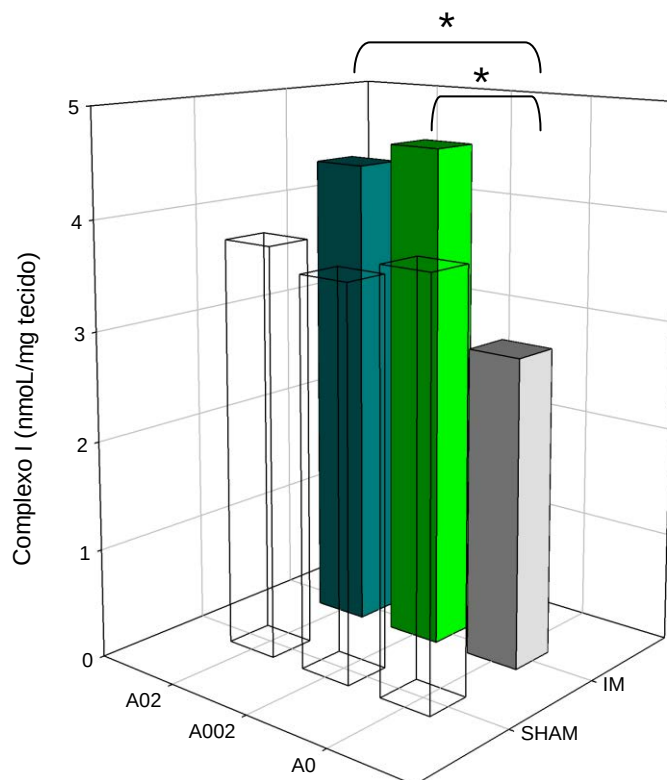
CS: Citrato sintase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 30. Atividade da beta-hidroxiacil coenzima A desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



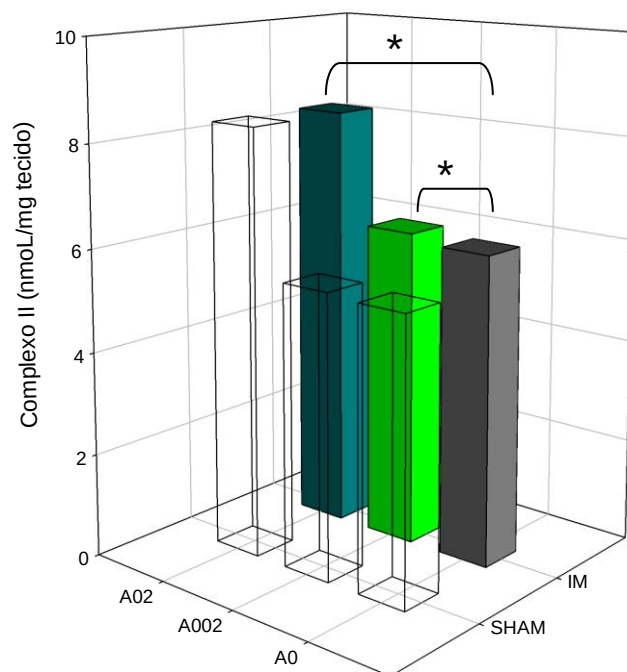
β -OH-acil-coA-DH: Beta hidroxiacil coenzima-A desidrogenase; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$

Figura 31. Atividade do complexo I da cadeia respiratória no miocárdio do VE (bioquímica).



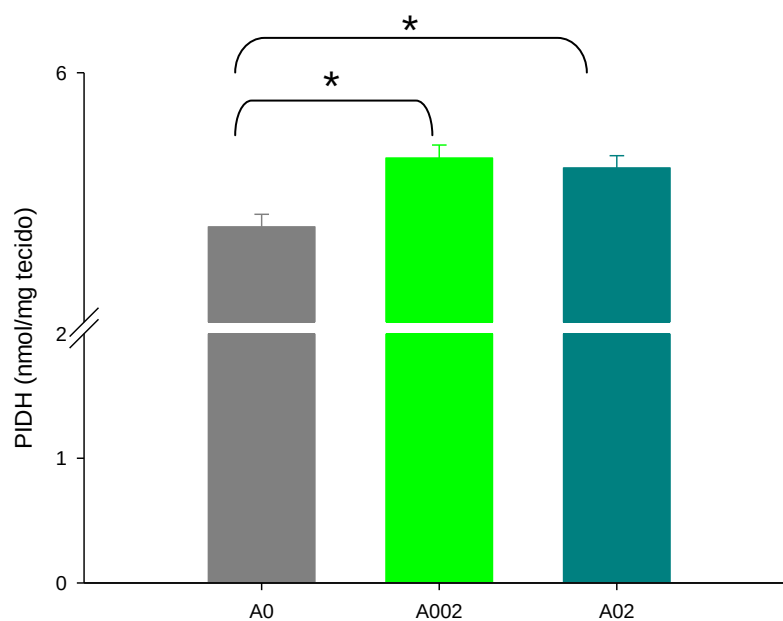
IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 32. Atividade do Complexo II da cadeia respiratória no miocárdio do VE (bioquímica).



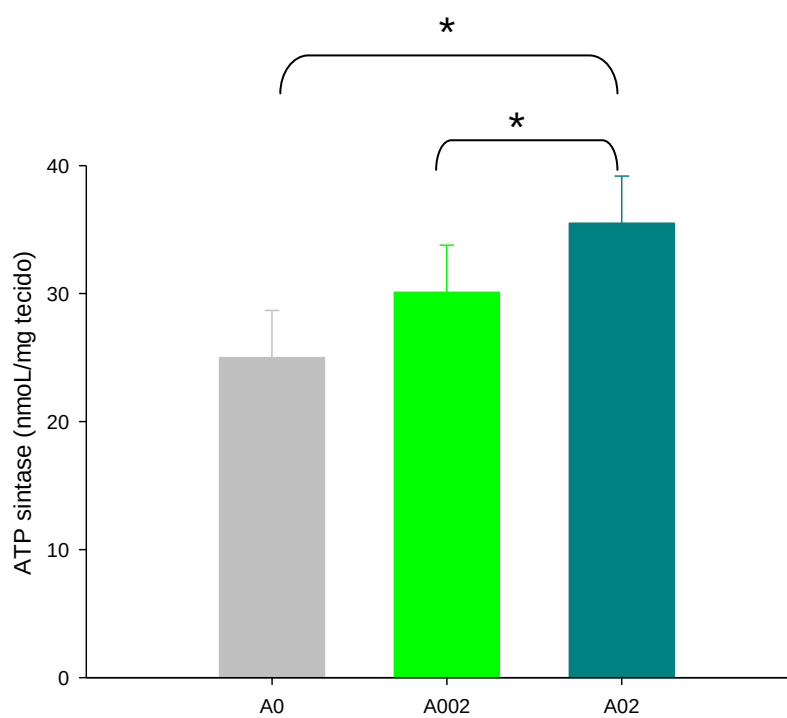
IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 33. Atividade da piruvato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



PIDH: Piruvato desidrogenase; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão. * = $p < 0,05$.

Figura 34. Atividade da ATP sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$.

Avaliação do estresse oxidativo cardíaco no miocárdio do VE

Os resultados para a avaliação bioquímica do estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 10.

Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre os grupos SA0, SA002 e SA02 para as variáveis do estresse oxidativo (interação entre os fatores).

O infarto levou a maior concentração de HL (Figura 35), maior atividade da SOD e menor atividade da GSH-Px (Figuras 36 e 37).

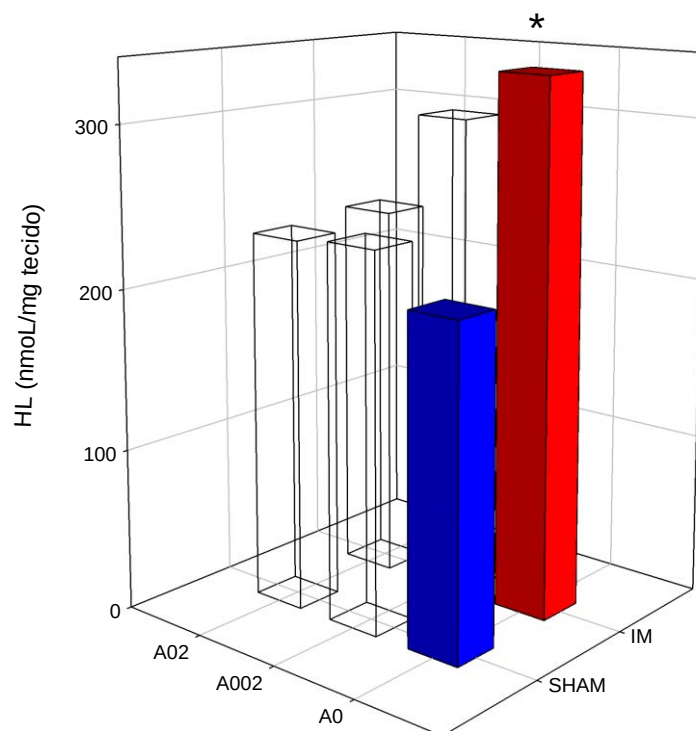
A suplementação de alecrim com ambas as doses nos grupos infartados levou a menor concentração de HL em comparação ao grupo sem suplementação (Figura 38). Os grupos infartados suplementados com alecrim com ambas as doses apresentaram menor atividade da SOD em comparação ao grupo infartado sem alecrim (Figura 39). Apesar da interação, não foi observada diferença significativa na atividade de GSH-Px com a suplementação de alecrim nos grupos infartados.

Tabela 10. Lipoperoxidação e atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no miocárdio do VE.

Grupo	n	Hidroperóxido de lipídeos (nmol/mg tecido)	Catalase (nmol/mg tecido)	SOD* (nmol/mg proteína)	GSH-Px (nmol/g de tecido)
SA0	6	202±10,2 ^a	92,4±7,00	7,15±0,81 ^a	34,0±1,29 ^a
SA002	6	233 ±9,76 ^b	79,2±12,7	8,50±0,75	29,4±1,43
SA02	6	230±10,3	92,1±5,59	8,55±0,91	29,3±2,97
IA0	6	331±12,7 ^{a,C}	67,3±4,28	13,0±0,65 ^{a,A,C}	19,6±0,65 ^a
IA002	6	319±9,58 ^{b,A,B,C,}	87,9±5,81	8,91±0,34 ^A	24,2±3,18
IA02	6	235±9,63 ^{B,C}	77,5±4,28	8,71±0,25 ^C	27,7±3,08
p (I)		<0,001	0,091	<0,001	<0,001
p (A)		<0,001	0,766	0,274	0,712
p (Ix A)		<0,001	0,072	<0,001	0,031

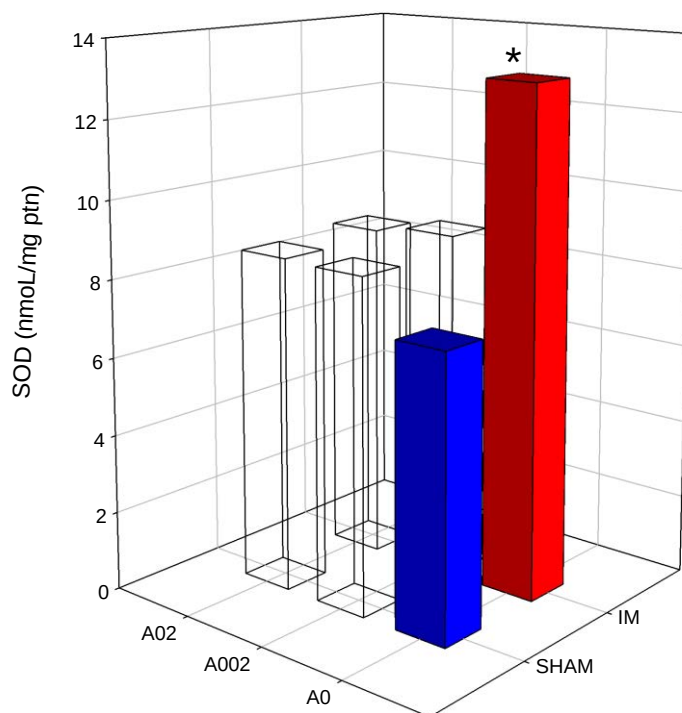
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; SOD: Superóxido dismutase; GSH-Px: Glutathione peroxidase. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.* Logaritmo neperiano da atividade da SOD. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos = comparação para o fator Infarto: (a — I≠S entre os grupos A0; b—I≠S entre os grupos A002; c— I≠S entre os grupos A02); comparações para o fator Alecrim: (A — A0≠A002 entre os grupos infartados; B — A002≠A02 entre grupos infartados; C — A0≠A02 entre os grupos infartados).

Figura 35. Hidroperóxidos de lipídeo no miocárdio do VE (bioquímica).



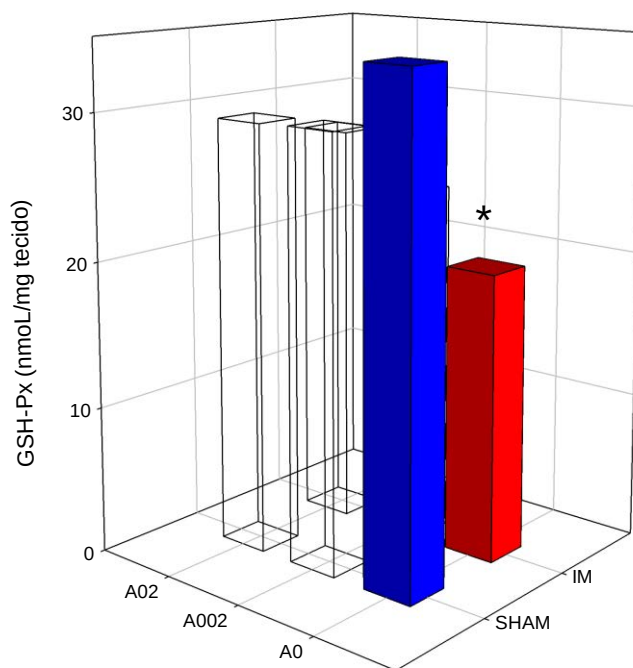
HL: Hidroperóxido de lipídeos; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 36. Atividade de superóxido dismutase no miocárdio do VE (bioquímica).



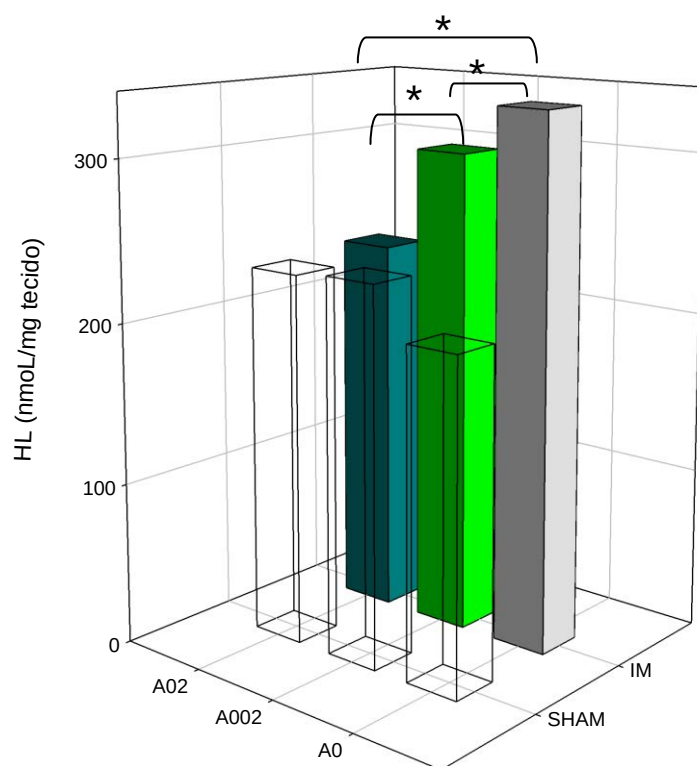
SOD: Superóxido dismutase; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 37. Atividade da glutathiona peroxidase no miocárdio do VE (bioquímica).



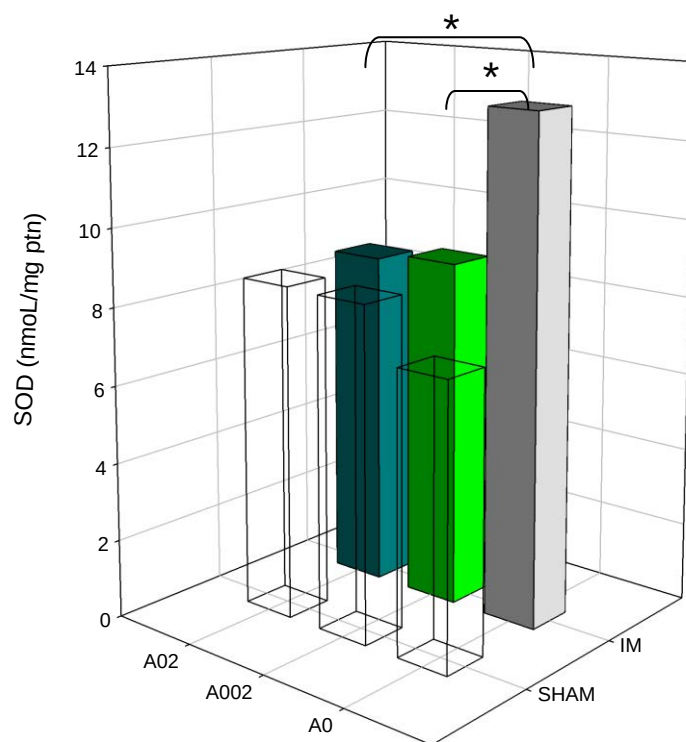
GSH-Px: Glutathiona peroxidase; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 38. Hidroperóxidos de lipídeo no miocárdio do VE (bioquímica).



HL: Hidroperóxido de lipídeos; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Figura 39. Atividade de superóxido dismutase no miocárdio do VE (bioquímica).



SOD: Superóxido dismutase; IM: Infarto; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação de 0,02% de alecrim; A02: Suplementação de 0,2% de alecrim. Os dados são expressos em média. * = $p < 0,05$.

Os resultados obtidos pela avaliação da expressão de proteínas da via do estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 11.

O infarto levou a menor expressão do Nrf-2 e HO-1, como representado nas Figuras 40 e 41. A suplementação de alecrim não teve efeito sobre a expressão do Nrf-2 e da HO-1 (Tabela 11).

Não houve diferença entre os grupos em relação a expressão de GSH-Px no miocárdio do VE (Tabela 11).

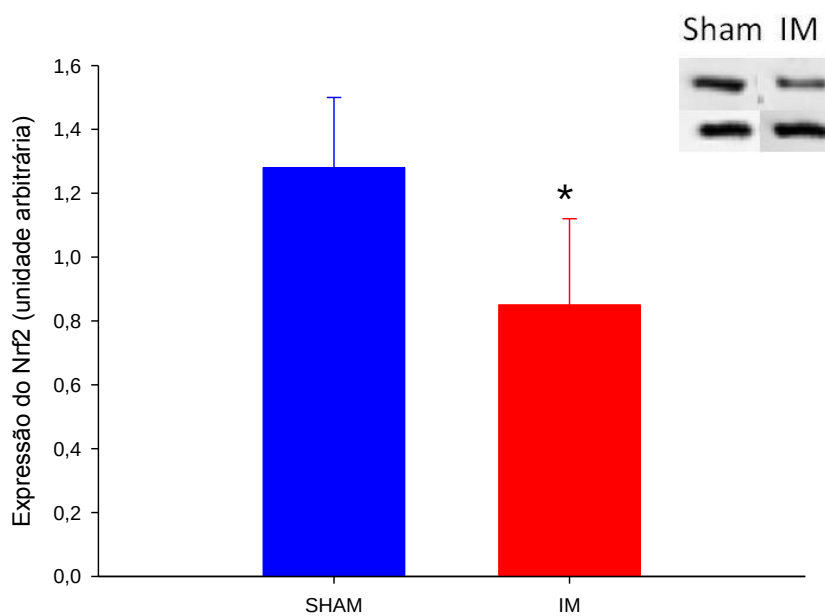
Não foi observado efeito da suplementação de alecrim nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de alecrim para as variáveis (sem interação).

Tabela 11. Expressão de proteínas da via do estresse oxidativo no miocárdio do VE.

Grupo	n	Nrf-2 (unidade arbitrária)	HO-1* (unidade arbitrária)	GSH-Px (unidade arbitrária)
SA0	10	1,61±0,14	1,03±0,30	1,68±0,10
SA002	10	1,23±0,25	0,88±0,13	1,14±0,15
SA02	10	1,01±0,44	0,69±1,12	1,81±0,18
IA0	9	0,82±0,76	0,58±0,61	1,66±0,16
IA002	8	1,09±0,61	1,00±0,26	1,71±0,29
IA02	7	0,66±0,53	0,80±0,18	2,13±0,26
p (I)		0,05	0,04	0,471
p (A)		0,336	0,701	0,552
p (Ix A)		0,448	0,301	0,834

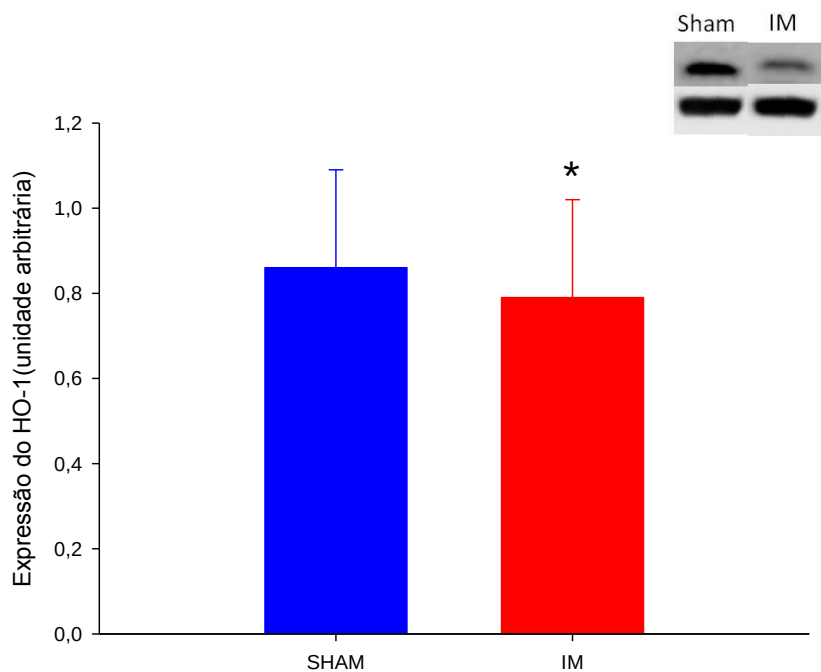
I: Infarto; S: Sham; A: Alecrim; A0: Sem suplementação; A002: Suplementação com 0,02% de alecrim; A02: Suplementação com 0,2% de alecrim; Nrf-2: Fator nuclear derivado de eritróide 2; HO-1: Hemeoxigenase-1; GSH-Px: Glutathione peroxidase. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.* HO-1 transformada por cálculo do recíproco.

Figura 40. Expressão proteica do fator nuclear eritróide 2 no miocárdio do VE (Western blot).



Nrf-2: Fator eritróide-2; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$. A figura no topo à direita representa as bandas do Nrf-2 sobre as bandas do GAPDH fotografadas.

Figura 41. Expressão proteica da heme oxigenase-1 no miocárdio do VE (Western blot).



HO-1: Hemeoxigenase-1; IM: Infarto. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$. A figura no topo à direita representa as bandas da HO-1 sobre as bandas do GAPDH fotografadas.

Discussão

A remodelação cardíaca tem grande relevância clínica, pois pode levar a variações complexas na arquitetura ventricular, que cronicamente podem evoluir para a insuficiência cardíaca(64-67). Por essa razão, diversas estratégias têm sido utilizadas para atenuar esse processo, com destaque para nutrientes e compostos antioxidantes, como o alecrim.

As folhas do alecrim são frequentemente utilizadas como tempero e agente de sabor e, devido à atividade antioxidante de suas folhas secas, são largamente utilizadas como conservante de alimentos. Acredita-se que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade biológica do alecrim. O carnosol e o ácido carnósico são os mais abundantes nas folhas frescas e secas, mas outros compostos também foram identificados, como o ácido rosmarínico e a luteolina(68, 69). Além do potencial antioxidante, alguns estudos descrevem ação anti-inflamatória, antiapoptótica e antiangiogênica dos compostos do alecrim(29, 69, 70). Entretanto, informações sobre seu papel no coração ainda são limitadas, em especial sobre o efeito do consumo das folhas. Um exemplo é o trabalho de Posadas e colaboradores que avaliaram a suplementação de extrato supercrítico de alecrim sobre o estresse oxidativo no coração de ratos idosos(38).

Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar a influência da suplementação de alecrim na ração sobre a remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio em ratos. Em relação ao modelo de agressão cardíaca utilizado no presente estudo, é importante avaliar o tamanho do infarto. O tamanho do infarto pode ser considerado preditor da função e da geometria do ventrículo esquerdo, sendo recentemente considerado o ponto de corte de 36% de área infartada para a presença de remodelação cardíaca em ratos(2). Além disso, o padrão-ouro para aferição do tamanho de infarto é a histologia do VE(67). Portanto, a partir dos dados histológicos, os animais com tamanho de infarto inferior a 36% foram excluídos das análises do presente estudo.

Alecrim no coração sem agressão

Não foi observado efeito da suplementação de alecrim apenas no coração sem agressão.

Morfologia e função do coração infartado

A ecocardiografia constitui uma das ferramentas ideais para a estratificação prognóstica de infarto do miocárdio e fornece informações úteis sobre a morfologia e a função ventricular esquerda(67). No presente trabalho, o estudo morfológico pelo ecocardiograma mostrou que os animais submetidos ao infarto apresentaram sinais de hipertrofia, como maior massa do ventrículo esquerdo e maior espessura da parede ventricular. Os achados de hipertrofia avaliados pelo ecocardiograma são corroborados pelo maior peso do VE e maior área seccional do miócito nos animais infartados. Além das alterações morfológicas, é conhecido que o processo de remodelação após o infarto pode estar associado à piora da função ventricular(64). No presente estudo, a avaliação ecocardiográfica mostrou alterações na função sistólica e diastólica cardíaca, indicadas pela menor fração de variação das áreas da cavidade ventricular, maior átrio esquerdo, menor TDE e maior relação E/E' média nos animais infartados. É importante notar que o menor valor de TDE encontrado no grupo infartado pode caracterizar disfunção ventricular com padrão restritivo. O TDE é utilizado como parte da avaliação do fluxo mitral. No coração normal, o fluxo transmitral predominante ocorre precocemente na diástole, após a abertura da valva mitral (onda E). Conforme se altera o relaxamento ventricular, a onda E diminui de amplitude e o tempo de desaceleração se prolonga. Entretanto, nas formas mais avançadas de disfunção ventricular, devido à baixa complacência do VE e às grandes pressões de enchimento, a curva de velocidade do fluxo mitral passa a ter “padrão restritivo”, com tempo de desaceleração menor(71). Portanto, com base nas alterações encontradas, podemos inferir que nosso protocolo foi eficiente para a indução de alterações morfofuncionais no coração após o infarto experimental.

A partir da análise dos dados ecocardiográficos, a suplementação com alecrim atenuou algumas das alterações causadas pelo IM. A suplementação levou a maior TDE e menor diâmetro do átrio esquerdo corrigido no grupo infartado que recebeu 0,02% de alecrim em relação grupo infartado sem suplementação. O TDE e a medida do átrio esquerdo podem ser utilizadas na avaliação da função diastólica(72). Portanto, os achados do presente estudo sugerem melhora da função diastólica com a suplementação de alecrim na dose de 0,02%. Além dos achados ecocardiográficos, o grupo suplementado com 0,02% de alecrim apresentou menor

área seccional do miócito em comparação ao grupo infartado não suplementado. Esses resultados sugerem que a suplementação com 0,02% de alecrim atuou sobre a remodelação pós-infarto, reduzindo a hipertrofia do VE, com melhora potencial da função diastólica.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a suplementação com as folhas de alecrim sobre a morfologia e função do coração. Alguns autores avaliaram a suplementação de componentes presentes no alecrim, como a luteolina, e descreveram melhora da função cardíaca com a suplementação deste composto em modelos de agressão cardíaca por doxorrubicina e isquemia/reperfusão (73, 74). Assim, o efeito da suplementação das folhas de alecrim sobre a morfologia e função do coração após o infarto do miocárdio no presente trabalho caracteriza achado inédito.

Fibrose cardíaca no coração infartado

A participação da matriz extracelular e seus componentes tem importante papel no processo de remodelação após o infarto do miocárdio. A estrutura e função da matriz extracelular são mantidas pelas MMPs, enquanto que a regulação de sua degradação é realizada pelos TIMPs, destacando-se o TIMP-1(75, 76). A degradação excessiva da matriz extracelular pode levar a expansão do VE e pode estar associada a IC(76).

A ativação das MMPs pode ser identificada 1 hora após a oclusão coronariana, com destaque para as MMP-2 e MMP-9 que degradam o colágeno fibrilar e seus fragmentos(40). Assim, as MMPs, juntamente com a maior tensão parietal gerada após o IM contribuem para o aumento da cavidade. Após 3 a 4 dias da oclusão coronariana, inicia-se o acúmulo de células semelhantes aos fibroblastos, os miofibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno I e III, que começa a acumular-se na região periférica do infarto e torna-se bem organizado 14 dias após o IM(40). O aumento da MMP-2 pode ser detectado um dia após o IM e é documentado na fase crônica do infarto. Por sua vez, o aumento da atividade das TIMPs é associado com menor degradação de colágeno e subsequente fibrose(75). Assim, após o IM, o desbalanço entre a produção e ativação das MMPs e das TIMPs

são parte da resposta a injúria miocárdica e podem levar a degradação do colágeno normal e aumento anormal do colágeno tipo I, com consequente aumento da rigidez miocárdica e disfunção diastólica(65). No presente trabalho houve maior porcentagem de colágeno e maior MMP-2 ativa e total após o IM, característicos da fibrose cardíaca e da disfunção diastólica observadas no presente estudo.

Em relação ao consumo de alecrim, a suplementação não atuou sobre a deposição de colágeno ou a atividade das MMPs no presente estudo, sugerindo a participação de outro mecanismo de atuação do alecrim na remodelação cardíaca e na disfunção diastólica após o IM.

Inflamação no coração infartado

A inflamação constitui processo vital em resposta a dano celular e é acompanhada por sequência de eventos para responder à cicatrização. Esse processo pode envolver a infiltração de diferentes tipos celulares e a contribuição de enzimas que alteram o gradiente das quimiocinas, pequenas citocinas que orientam, por quimiotaxia, a migração dos leucócitos e participam da resposta inflamatória.

O IM localiza a resposta inflamatória na área infartada, como resultado da migração de monócitos, neutrófilos e macrófagos. A remodelação pós-IM pode ser dividida em fase precoce ou resposta inflamatória aguda (dentro de 72h após o evento isquêmico) e em resposta de reparação (além das 72h). Inicialmente após o IM, ocorre aumento da densidade de neutrófilos e macrófagos, com maior produção de INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Após 7 dias do evento isquêmico, ocorre maior produção de citocinas características da fase de reparação, como IL-10 e TGF- β , importantes na cicatrização(77). A resolução da inflamação, ou seja, a recuperação do tecido inflamado para seu estado normal, é considerada um processo ativo que visa restabelecer a função após o IM, de modo a se recuperar do ataque isquêmico. Sendo assim, o perfil da expressão de macrófagos é determinante se a inflamação se tornará crônica, e eventualmente levar a IC(77, 78).

No presente trabalho foi observada redução de IL-10, TNF- α e INF- γ após o IM. Esses resultados se opõem ao esperado de que haveria aumento dessas citocinas após o IM. Isso poderia ser explicado pelo tempo de avaliação das

citocinas três meses após o evento isquêmico. O perfil inflamatório encontrado é compatível com a fase de inflamação crônica que contribui para o aparecimento da IC. Essa conclusão é corroborada por estudos que mostram associação entre IL-10 e atenuação da remodelação após infarto(79) e associação entre a inibição do TNF- α e a piora da insuficiência cardíaca(77).

A suplementação de alecrim não alterou a concentração das citocinas no miocárdio do VE três meses após o infarto, sugerindo que o efeito protetor observado não teve a participação da atividade anti-inflamatória do alecrim, como descrito em outros modelos(29, 32, 80).

Morte celular no coração infartado

A apoptose ou morte celular programada é descrita como possível responsável pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca em corações remodelados(81). A apoptose pode ser regulada pela concentração de algumas proteínas, como a Bax e a Bcl-2. A formação de dímeros Bax-Bax cria poros na membrana mitocondrial e facilita a liberação de citocromo C, proteína localizada na mitocôndria que interage com a procaspase-9, culminando com ativação da caspase-3, indutora de apoptose, estimulando, assim, a apoptose. Por outro lado, a formação de dímeros Bcl-2-Bax previne a formação destes poros, inibindo a apoptose(16). No presente trabalho, três meses após o infarto foi observada diminuição da Bcl-2, o que pode significar a perda do mecanismo de neutralizar a ativação de resposta pró-apoptótica(82). A suplementação de alecrim não atuou sobre a expressão da Bcl-2 no miocárdio do VE no presente estudo.

As caspases são uma família de enzimas efetoras da apoptose. Elas são proteases de cisteína que seletivamente clivam as proteínas em locais da porção C-terminal destinados aos resíduos de aspartato. A caspase-3 é expressa nas células como precursor inativo, em duas subunidades, e a forma madura é encontrada durante o processo de apoptose(83). Entretanto, semelhante a estudo anterior realizado em nosso laboratório(84), não foi observado diferença na expressão da caspase-3 três meses após o IM.

Assim, com base nesses achados, o efeito protetor observado com a suplementação de alecrim também não parece estar associado às vias de morte celular no coração três meses após o IM.

Metabolismo energético no coração infartado

No coração a demanda energética é constante, e a regulação do metabolismo energético é essencial. Em situações de injúria, a utilização preferencial de ácidos graxos, observada em corações normais, pode se inverter com a de glicose, juntamente com outras alterações da homeostase energética(17-19). Além da utilização preferencial de glicose, em condições de isquemia, o coração passa a formar muito lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidratos e a atividade da LDH(85, 86). Também é descrito que a citrato sintase, enzima inicial do ciclo do ácido cítrico, pode estar diminuída na insuficiência cardíaca por incapacidade da mitocôndria em transportar elétrons e realizar a fosforilação oxidativa, comprometendo a produção de energia(87).

Em condições normais, mais de 98% dos elétrons estão ligados à produção de ATP, e somente 2% geram radicais que serão neutralizados pelo sistema antioxidante. Entretanto, o fluxo de elétrons pode ser desviado em situações de injúria e ser reduzido pelos Complexos I e III e gerar uma quantidade grande de superóxido(88). Neste sentido, defeitos no maquinário da CR e nos complexos da fosforilação oxidativa têm sido relacionados a progressão da insuficiência cardíaca(89, 90). Por exemplo, Schwarzer et al. (2014) descreveram dano significativo no Complexo I, não observado nos estágios iniciais da agressão(91).

No presente estudo foi observado menor atividade da PIDH, CS e do Complexo I e maior atividade da LDH após o infarto, sugerindo aumento do uso da glicose e alterações compatíveis com a progressão para IC nos animais infartados. A PIDH integra a via glicolítica e é a primeira enzima participante da conversão do piruvato em acetil-CoA, que será utilizada no ciclo do citrato para produção de ATP na CR. O aumento da PIDH sugere maior oxidação de carboidratos no coração infartado. Esse achado é corroborado pelo aumento da LDH, resultado da maior oxidação anaeróbica de carboidratos(92). O maior uso de glicose como fonte de

energia no processo de remodelação cardíaca ocorre porque a oxidação da glicose gera maior quantidade de ATP por molécula de oxigênio consumida de modo a prevenir mais danos ao coração(93). Essa adaptação poderia explicar a maior atividade da ATP sintase nos animais infartados do presente estudo.

Em relação ao efeito da suplementação de alecrim nos grupos infartados, foi observado maior atividade das enzimas CS e β -OH-acil CoA-DH, menor atividade da LDH e maior atividade do Complexo I após a suplementação com ambas as doses em comparação ao grupo infartado sem suplementação de alecrim. Também foi observado maior atividade da ATP sintase nos animais suplementados com alecrim. A β -OH-acil CoA-DH é responsável oxidação de ácidos graxos em acetil-coA, que no ciclo do citrato irá formar ácido cítrico pela citrato sintase, e gerar NADH e FADH₂ para a CR de elétrons. Além do ciclo do citrato, NADH e FADH₂ são gerados na própria via da β -oxidação. Assim, nossos achados sugerem que a suplementação de alecrim após o IM levou a maior oxidação de ácidos graxos, maior produção de ATP e reversão do dano a cadeia respiratória, compatível com o metabolismo energético de corações normais(18). A maior β -oxidação também foi relatada em ratos que consumiram a ração com o composto ácido carnósico presente no alecrim(94).

Com base nesses achados, a suplementação de alecrim levou a melhora da utilização dos substratos energéticos e maior produção de energia no coração três meses após o infarto. O metabolismo energético poderia constituir um possível mecanismo de atuação do alecrim na remodelação cardíaca após o IM.

Estresse oxidativo no coração infartado

O estresse oxidativo e a sinalização redox são importantes contribuintes para hipertrofia cardíaca(95). Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das EROs podem ser prevenidos em parte pelo sistema enzimático, que inclui as enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase(8). No presente estudo, a concentração de HL foi avaliada como marcador do dano oxidativo, e a atividade das enzimas antioxidantes e a expressão do Nrf-2, da HO-1 e da GSH-Px no miocárdio do VE foram avaliados como marcadores das defesas antioxidantes. Os resultados

mostraram maior concentração de HL nos animais infartados, sugerindo maior estresse oxidativo após o IM.

A SOD é responsável pela dismutação do radical superóxido (O_2^-) para hidroperóxido de hidrogênio (H_2O_2), que a catalase e a GSH-Px posteriormente metabolizam em água e oxigênio(19). A SOD é também considerada a primeira linha de defesa para proteger a mitocôndria contra efeitos deletérios dos radicais superóxido em condições fisiológicas e patológicas(96). No presente trabalho foi encontrada maior atividade da SOD e menor atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase após o IM. O aumento da atividade da SOD observado após o IM no presente estudo poderia ser explicado pela maior produção de radical superóxido na cadeia respiratória, evidenciado pela menor atividade do Complexo I mitocondrial descrito anteriormente. De fato, é documentado maior produção de superóxido e outras espécies reativas na remodelação e na insuficiência cardíaca(97).

No presente trabalho, a suplementação de alecrim com ambas as doses levou a menor concentração de HL e menor atividade da SOD nos grupos infartados quando comparados ao grupo infartado sem suplementação, em concordância com estudos anteriores que relatam efeito antioxidante do alecrim e seus compostos(27, 37, 38). O alecrim tem efeito mimetizador da SOD(98), removendo os radicais superóxido originados com o infarto, o que poderia explicar a menor atividade da enzima no tecido cardíaco. Esse efeito também pode explicar porque o grupo infartado suplementado com 0,2% apresentou menor concentração de HL em relação ao grupo infartado suplementado com 0,02% de alecrim, sugerindo efeito antioxidante mais intenso com o aumento da dose de alecrim.

O Nrf-2 é um fator de transcrição que se liga à região promotora de vários genes da resposta antioxidante, como enzimas antioxidantes e enzimas de fase 2(99, 100). Em condições normais, o Nrf-2 é retido no citoplasma pelo Kelch-like-ECH-associated protein 1 (Keap1) e Cullin 3 (Cul3). A Cullin 3 ubiquitina o Nrf-2 que não é utilizado, e o Keap1 serve de substrato para a ubiquitinação do Nrf-2. Em situações de estresse, o sistema Keap1-Cul3 é rompido, e o Nrf-2 migra para o núcleo, e se combina com uma pequena proteína chamada Maf. Essa combinação forma um heterodímero e se liga a região promotora do ARE, iniciando a transcrição

de genes da resposta antioxidante, como a HO-1 e a GSH-Px. Assim, na fase inicial da patologia, existe a translocação do Nrf-2 para o núcleo e a consequente ativação do ARE para defender o coração do estresse oxidativo. Entretanto, na fase crônica a via do Nrf-2 pode estar exaurida ou suprimida pela expressão gênica anormal do Nrf-2, causando a falha na manutenção da homeostase redox por meio das enzimas mediadas pelo ARE. Estudos anteriores relatam que o Nrf-2 está envolvido na proteção do coração contra hipertrofia cardíaca e IC por meio da supressão do estresse oxidativo(9). Também é descrita a redução do Nrf-2 após o infarto, sugerindo assim a participação desta via no processo de remodelação após IM(10, 101). No presente trabalho foi observada menor expressão do Nrf-2 e também da HO-1 e da atividade da GSH-Px, podendo sugerir menor expressão da proteína, menor função de transcrição do Nrf-2 ou ainda catabolismo da proteína após o IM.

Não houve efeito do alecrim sobre a expressão do Nrf-2 e expressão das enzimas HO-1 e GSH-Px, como era esperado. Estudos prévios relataram efeito protetor mediado pela ativação do Nrf-2 e indução da HO-1 após o pré-tratamento com compostos presentes no alecrim em modelo de lesão miocárdica por isoproterenol (102, 103). A diferença no resultado apresentado em nosso estudo poderia ser explicada pelo uso de compostos isolados, diferenças no modelos de agressão ao coração e diferenças no tempo de avaliação do Nrf-2 em estudos anteriores. Além disso, não podemos excluir o possível efeito da combinação dos diferentes compostos presentes no alecrim com o uso das folhas secas. Como descrito anteriormente, a planta possui diferentes classes de compostos que podem influenciar sua ação fisiológica, dependendo da estrutura, concentração e interação desses fitoquímicos(60).

Pelo exposto, a ação do alecrim sobre o estresse oxidativo cardíaco três meses após o IM está associada ao efeito sobre o sistema antioxidante enzimático, e não envolve a participação das vias do Nrf-2 no presente estudo. A ação antioxidante do alecrim é um possível mecanismo de atuação do alecrim na remodelação cardíaca após o IM.

Alecrim no coração sem e com agressão

Os dados do presente estudo sugerem que a suplementação de alecrim levou a maior produção de energia no coração tanto de animais sem agressão como nos animais infartados. Esses dados têm importância pois mudanças na utilização de substratos energéticos e dificuldades na produção de ATP são passos importantes envolvidos nas mudanças do metabolismo energético associado a remodelação cardíaca após a agressão(93). Portanto, o consumo de alecrim pode constituir medida adjuvante no tratamento ao dano cardíaco.

Dose resposta da suplementação de alecrim no coração infartado

Os achados do presente estudo sugerem ação diferente entre as doses de suplementação utilizadas. Apesar de alguns efeitos semelhantes sobre o estresse oxidativo e o metabolismo energético, constatou-se efeito protetor sobre a morfologia e função cardíaca somente com a dose de 0,02% de alecrim. Considerando que a remodelação, como descrito anteriormente, se define como alterações moleculares, celulares e intersticiais no coração, que se manifestarão clinicamente por mudanças no tamanho, massa, geometria e função do coração, o efeito da suplementação de alecrim sobre o estresse oxidativo e o metabolismo energético poderiam determinar a ação sobre a morfologia e a função do coração relatadas no presente estudo.

Neste sentido, o efeito protetor observado somente com a dose de 0,02% de alecrim poderia ser explicado por um conceito semelhante ao de hormese, ou resposta em forma de “J” ou “U”, em que baixas concentrações de determinado agente levaria à resposta positiva. Recentemente, Forman e colaboradores (2014), ao discutir o papel de antioxidantes presentes em frutas e vegetais na proteção contra doenças, propuseram o nome para-hormese para descrever o processo pelo qual compostos não tóxicos mantêm uma resposta de defesa e adaptação celular, de modo a substituir o termo hormese que, classicamente, designa resposta adaptativa de agentes tóxicos e estressores(104). Adicionalmente, descreve-se conceito análogo para a resposta não linear na formação de EROs mitocondrial, conhecido como hormese mitocondrial ou mitohormese. A mitohormese se opõe a

visão tradicional de que as EROs seriam totalmente deletérias ou indesejadas; ao invés disso, define que alguma produção de EROs são essenciais para garantir a sinalização celular de respostas saudáveis do organismo(105).

Com base nessas informações e nos resultados encontrados, no presente trabalho a menor dose de alecrim teria efeito positivo por “balancear” a produção de EROs e o estresse cardíaco, que devido ao infarto estariam aumentados. Em contrapartida, a dose de 0,2% poderia levar a perda da capacidade de ativar as vias de proteção.

A segunda possível explicação para a ausência de efeito da dose de 0,2% pode estar relacionada ao efeito sobre a CR. Apesar do mesmo efeito da suplementação de alecrim com ambas as doses sobre o Complexo I, somente a suplementação com 0,2% de alecrim levou a maior atividade do Complexo II após o IM, tanto em comparação ao grupo infartado sem suplementação, quanto em comparação ao grupo infartado suplementado com 0,02%. O Complexo II mitocondrial é um complexo enzimático que participa tanto da CR quanto do ciclo do citrato, sendo responsável pela ligação entre os dois processos(106). Porém, contrastando com as demais desidrogenases que fornecem elétrons para a CR, o Complexo II é conhecido por ser totalmente ativado com a redução da CR(107). Entretanto, o papel da inibição ou ativação do Complexo II no coração ainda é pouco esclarecido. Redout e colaboradores (2007) descreveram aumento da atividade do Complexo II no VD de ratos com insuficiência cardíaca, mas não houve alterações no VE(108). Da mesma forma, o uso de inibidores da CR tem mostrado efeito cardioprotetor(109-111). Assim, o aumento da atividade do Complexo II com a maior dose de alecrim poderia ter efeito negativo, e anular o efeito protetor observado com a suplementação em dose menor.

Não podemos descartar ainda a possibilidade de que o alecrim pode atuar sobre outras vias de sinalização que não foram avaliadas no presente estudo. Além disso, não foi realizado nenhum modelo de estudo de causa e efeito, e nossos dados descrevem somente a associação entre os resultados encontrados.

É importante destacar também a relevância clínica dos resultados descritos no presente estudo. Apesar dos avanços na pesquisa cardiovascular, o infarto do miocárdio ainda é uma das principais causas de morbimortalidade no Brasil e no

mundo, podendo levar a disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Neste sentido, a suplementação com folhas de alecrim constitui uma medida simples e facilmente disponível. Em relação a dose de alecrim utilizada, considerando que um rato consome em média 25 g de ração por dia, 0,02% e 0,2% equivalem a 5 e 50 mg de folhas secas e trituradas de alecrim, respectivamente. Utilizando a equação de equivalência de dose proposta por Reagan-Shaw e colaboradores (2008), 5 mg de alecrim no rato equivalem a 11 mg em humanos, enquanto que 50 mg de alecrim no rato equivalem a 110 mg em humanos(112). Onze miligramas de alecrim triturado poderia ser medido aproximadamente por uma colher de café rasa, enquanto que 110 mg equivalem a uma colher de chá rasa de das folhas secas de alecrim.

Conclusão

Conclui-se que a suplementação da ração com 0,02% de alecrim atenuou a remodelação cardíaca causada pelo infarto do miocárdio em ratos, com ação potencial sobre a hipertrofia, a função, a utilização de substratos energéticos e o estresse oxidativo cardíaco. A ativação do Nrf-2 não parece participar do efeito antioxidante do alecrim três meses após o infarto do miocárdio, como proposto na hipótese do trabalho.

Referências

1. Saúde M. DATASUS - Doenças do sistema circulatório - óbitos por residência segundo região: MS - Rede Interagencial de Informações para a Saúde; 2015 [cited 2015 janeiro]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
2. 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;151:242-3.
3. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93:434-40.
4. Zornoff LA, Cicogna AC, Paiva SA, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2002;12:371-8.
5. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81:482-90.
6. Zhou S, Sun W, Zhang Z, Zheng Y. The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:260429.
7. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:150-6.
8. van Deel ED, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD, et al. Extracellular SOD protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:1305-13.
9. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*. 2012;32:687-726.
10. Li J, Ichikawa T, Villacorta L, Janicki JS, Brower GL, Yamamoto M, et al. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1843-50.
11. Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett*. 2005;579:3029-36.
12. Zhu H, Jia Z, Misra BR, Zhang L, Cao Z, Yamamoto M, et al. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc Toxicol*. 2008;8:71-85.
13. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;81:457-64.

14. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:279-92.
15. van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):21-9.
16. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res.* 2002;62:4592-8.
17. Saks V, Favier R, Guzun R, Schlattner U, Wallimann T. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol.* 2006;577:769-77.
18. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005;85:1093-129.
19. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF. Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation.* 2002;105:140-2.
20. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001;110 Suppl 7A:37S-46S.
21. Mei Z, Wang X, Liu W, Gong J, Gao X, Zhang T, et al. Mitochondrial adaptations during myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic constriction. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23:283-8.
22. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation.* 1995;91:10-5.
23. Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and α -tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci.* 2010;86:178-84.
24. Buttros JB, Bergamaschi CT, Ribeiro DA, Fracalossi ACC, Campos RR. Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Pharmacology.* 2009;84:29-37.
25. Zhu YZ, Huang SH, Tan BK, Sun J, Whitemanb M, Zhu YC. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Nat Prod Rep.* 2004;21:478-89.
26. Tada M, Ohkanda T, Kurabe J. Syntheses of carnosic acid and carnosol, antioxidants in rosemary, from pisinferic acid, the major constituent of sawara. *Chem Pharm Bull.* 2010;58:27-9.

27. Pérez-Fons L, Garzón MT, Micol V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J Agric Food Chem*. 2010;58:161-71.
28. Genena AK, Hense H, Junior AS, Souza SM. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Food Sci Tech*. 2008;28:463-9.
29. Peng C, Su J, Chyau C, Sung T, Ho S, Peng C, et al. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71:2223-32.
30. Huang H-C, Huang C-Y, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. Ursolic acid inhibits IL-1b or TNF-a-induced C6 glioma invasion through suppressing the association ZIP/p62 with PKC-z and downregulating the MMP-9 expression. *Mol Carcinog*. 2009;48:517-31.
31. Scheckel K, Degner S, Romagnolo D. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr*. 2008;138:2098-105.
32. Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, Hörnig C, et al. Carnosic acid and carnosol potentially inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:91-7.
33. Lian K-C, Chuang J-J, Hsieh C-W, Wung B-S, Huang G-D, Jian T-Y, et al. Dual mechanisms of NF- κ B inhibition in carnosol-treated endothelial cells. *Toxicol Appl Pharm*. 2010;245:21-35.
34. Haraguchi H, Sait T, Okamura N, Yagi A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med*. 1995;61:333-6.
35. Afonso M, Sant'ana L, Mancini-Filho J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas de oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Nutrire*. 2010;35(1):129-48.
36. Satoh T, Kosaka K, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Shimojo Y, et al. Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *J Neurochem*. 2008;104:1116-31.
37. Tamaki Y, Tabuchi T, Takahashi T, Kosaka K, Satoh T. Activated glutathione metabolism participates in protective effects of carnosic acid against oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Planta Med*. 2010;76:683-8.
38. Posadas SJ, Caz V, Largo C, Gándara BDI, Matallanas B, Reglero G, et al. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol*. 2009;44:383-9.

39. Spadaro J, Fishbein M, Hare C, Pfeffer M, Maroko P. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med*. 1980;104:179-83.
40. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93:434-40.
41. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18:1440-63.
42. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Cloner R, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-12.
43. Sjaastad I, Sejersted O, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000;89:1445-54.
44. Fioretto JR, Queiroz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:H1327-33.
45. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res*. 2002;22:1353-64.
46. Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, et al. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:325-30.
47. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91:2642-54.
48. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:1550-8.
49. Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr*. 1997;10:169-78.
50. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:161-7.

51. Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1131-6.
52. Tyagi S, Matsubara L, Weber K. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem* 1993;26:191-98.
53. Abcam. RIPA buffer (radio immuno precipitation assay) buffer 2015 [cited 2014 Outubro].
54. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328:309-16.
55. Wilkinson JH. Introduccion al diagnostico enzimatico. Barcelona: Ediciones Toray; 1965.
56. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem*. 1969;10:198-206.
57. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal*. 1974;22:123-75.
58. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chem Acta*. 1985;153:23-36.
59. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333:145-51.
60. Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, Newsholme P. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenomedullated rats. *Braz J Med Biol Res*. 1991;31:827-33.
61. Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta*. 1974;358:251-61.
62. Crouch RK, Gandy SC, Kisey G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 1981;30:235-41.
63. Abcam. Cell nuclear protein preparation protocol for Western blot 2015 [cited 2014 Outubro].
64. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling.

Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569-82.

65. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:150-64.

66. Idikio HA. Postmyocardial infarct remodeling and heart failure: potential contributions from pro- and antiaging factors. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:836806.

67. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novak G, Fekete V, Bencsik P, et al. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;61:163-70.

68. López-Lázaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Rev Med Chem*. 2009;9:31-59.

69. Lopez-Jimenez A, Garcia-Caballero M, Medina MA, Quesada AR. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur J Nutr*. 2013;52:85-95.

70. Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep*. 2007;17:1525-31.

71. Studart PCdC, Belém LHJ, Rabischoffski A, Nogueira AC. O Doppler tecidual na avaliação da função diastólica regional do ventrículo esquerdo: Seu valor na detecção das alterações precoces e no entendimento da evolução da disfunção em pacientes com função sistólica normal. *Rev SOCERJ*. 2006;19:232-8.

72. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation*. 2002;105:1503-8.

73. Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N, Hirota S. Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett*. 1997;92:1-7.

74. Sun D, Huang J, Zhang Z, Gao H, Li J, Shen M, et al. Luteolin limits infarct size and improves cardiac function after myocardium ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7:e33491.

75. Minicucci MF, dos Santos PP, Rafacho BP, Goncalves AF, Silva RA, Chiuso-Minicucci F, et al. Mechanisms involved in the beneficial effects of spironolactone after myocardial infarction. *PLoS One*. 2013;8:e76866.

76. Liu Y, Liu K. Effects of spironolactone and losartan on the early neovascularization of acute myocardial infarction. *Exp Ther Med*. 2014;8:978-82.

77. Kain V, Prabhu SD, Halade GV. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2014;109:444.

78. Huang M, Yang D, Xiang M, Wang J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Rev*. 2015;20:25-38.
79. Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res*. 2009;104:e9-18.
80. Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med*. 2008;74:1667-77.
81. Haendchen RV. Apoptose miocárdica: um novo mecanismo de morte celular. *Arq Bras Cardiol*. 1998;70:65-8.
82. Siltanen A, Kitabayashi K, Patila T, Ono M, Tikkanen I, Sawa Y, et al. Bcl-2 improves myoblast sheet therapy in rat chronic heart failure. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:115-25.
83. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326:1-16.
84. Goncalves AF, Santos PP, Rafacho BP, Batista DF, Azevedo PS, Minicucci MF, et al. Vitamin D supplementation intensifies cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014;176(3):1225-6.
85. Nelly JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol*. 1974;36:413-59.
86. Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FL, Donnelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation*. 1993;87:881-92.
87. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1360-72.
88. Azevedo PS, Santos PP, Fernandes AA, Minicucci MF, Zornoff LAM, Paiva SAR. Congestive Heart Failure. In: Dichi I, Bregano JW, Simão ANC, Cecchini R, editors. *Role of oxidative stress in chronic disease*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2013. p. 282-313.
89. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:2029-74.
90. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia respiratória mitocondrial aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. *Arq Med*. 2008;22:49-56.

91. Schwarzer M, Osterholt M, Lunkenbein A, Schrepper A, Amorim P, Doenst T. Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure. *J Physiol*. 2014;592:3767-82.
92. Nelly JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol*. 1974;36:413-59.
93. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiology in review*. 2013;21(3):135-40.
94. Park M-Y, Sung M-K. Carnosic acid attenuates obesity-induced glucose intolerance and hepatic fat accumulation by modulating genes of lipid metabolism in C57B L/6J-ob/ob mice. *J Sci Food Agric*. 2014;doi: 10.1002/jsfa.6973.
95. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2013;61C:473-501.
96. Das KC, Muniyappa H. Age-dependent mitochondrial energy dynamics in the mice heart: role of superoxide dismutase-2. *Exp Gerontol*. 2013;48:947-59.
97. Liu T, Chen L, Kim E, Tran D, Phinney BS, Knowlton AA. Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure. *Life Sci*. 2014;101:27-36.
98. Chohan M, Naughton DP, Opara EI. Determination of superoxide dismutase mimetic activity in common culinary herbs. *SpringerPlus*. 2014;3:578.
99. Zhua H, Itohc K, Yamamoto M, Jay L, Zweiera, Lia Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Letters* 2005;579:3029-36.
100. Bayram B, Ozcelik B, Grimm S, Roeder T, Schrader C, Ernst IMA, et al. A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of samp8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuven Res*. 2012;15:71-81.
101. Gurusamy N, Ray D, Lekli I, Das DK. Red wine antioxidant resveratrol-modified cardiac stem cells regenerate infarcted myocardium. *J Cell Mol Med*. 2010;14:2235-9.
102. Sun GB, Sun X, Wang M, Ye JX, Si JY, Xu HB, et al. Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;265:229-40.
103. Sahu BD, Putcha UK, Kuncha M, Rachamalla SS, Sistla R. Carnosic acid promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress and apoptosis in mice. *Mol Cell Biochem*. 2014;394:163-76.

104. Forman HJ, Davies KJ, Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:24-35.
105. Ristow M. Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med*. 2014;20:709-11.
106. Oyedotun KS, Lemire BD. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J Biol Chem*. 2004;279:9424-31.
107. Rustin P, Munnich A, Rötig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet*. 2002;10:289-91.
108. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, van Hardeveld C, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 2007;75:770-81.
109. Chen YR, Chen CL, Pfeiffer DR, Zweier JL. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem*. 2007;282:32640-54.
110. Wojtovich AP, Smith CO, Haynes CM, Nehrke KW, Brookes PS. Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827:598-611.
111. Drose S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827:578-87.
112. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22:659-61.