

Bruna Paola Murino Rafacho

*Influência da suplementação de vitamina D na dieta
sobre remodelação cardíaca em ratos expostos à fumaça
do cigarro*

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

Orientador: *Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva*

Co-orientador: *Prof. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff*

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rafacho, Bruna Paola Murino.

Influência da suplementação de vitamina D na dieta sobre remodelação cardíaca em ratos expostos à fumaça do cigarro / Bruna Paola Murino Rafacho. - Botucatu, 2011

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

Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva

Co-orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Capes: 40500004

1. Vitamina D. 2. Cigarros. 3. Nutrição.

Palavras-chave: Exposição à fumaça do cigarro; Remodelação cardíaca; Vitamina D.

Dedicatória

Aos meus pais Paulo e Marilene, minha avó Irma e meus avós Hércio e Maria (in memorian) que me ensinaram a lutar com honestidade e pelo 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 namorado Danilo pelo amor, compreensão e por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

À 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. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Leonardo A. M. Zornoff, pelo incentivo e suporte na realização deste projeto.

À todos os docentes do departamento de Clínica Médica, em especial à Dr. Luiz S. Matsubara e Dra. Marina P. Okoshi pelas contribuições no decorrer do projeto e na prova de qualificação.

Ao Dr. Marcos F. Minicucci e Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla, por toda paciência e ensinamentos, além dos grandes exemplos pessoais e profissionais.

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

À todos os funcionários do Departamento e Laboratório Experimental de Clínica Médica, Mário Bruno, José Carlos Georgette, Sandra Fábio, Sueli Clara, Elenize Jamas, Corina Corrêa, Camila Camacho, Vitor Souza, Rogério Monteiro, José Ap. De Souza, Elizângela Silva, Bruno Fajiolli, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Laura Câmara, Mario Dallaqua e Ana Mengue por todo apoio e suma importância no transcorrer do curso.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Heloisa, Maria Tereza, Miriane, Regiane, Aline, Camila B., Daniele, Marcelo, Paula, Silvio, Camila, Dijon e Fernanda pela troca de conhecimentos e por todo o companheirismo, em especial aos amigos Priscila e Ricardo, pelo 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.

À Maria Fernanda Biagioni, Renata Pereira, Leticia Rocio, Bárbara Pagliaci, Mariele Pansani, Lidiane Ardisson, Fabiana Denipote e Ana Carolina Lima, minhas amigas irmãs em Botucatu, pela maravilhosa convivência e por toda compreensão e carinho concedidos até hoje.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”*

Francisco Candido Xavier

Lista de abreviações

1,25 (OH) ₂ D ₃	calcitriol
25(OH)D ₃	25-hidroxivitamina D
AE	átrio esquerdo
ANCOVA	análise de covariância
ANOVA	análise de variância de duas vias
Ao	aorta
ASM	área seccional do miócito
BHT	butil-hidroxitolueno
D ₂	ergocalciferol
D ₃	colecalfiferol
DC	débito cardíaco
DDVE	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DNA	ácido desorribonucléico
DSVE	diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
E/A	onda E/onda A
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EFC	exposição à fumaça do cigarro
ENC	fração de encurtamento
EROs	espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos
FC	frequência cardíaca
FE	fração de ejeção
FeSO ₄	sulfato ferroso
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HE	hematoxilina-eosina
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IC	índice cardíaco
IL-10	interleucina 10
IMVE	índice de massa do ventrículo esquerdo
INF-γ	intérferon gama
Mn-SOD	superóxido dismutase manganês dependente
MVE	massa do ventrículo esquerdo
N EFC	não exposição à fumaça do cigarro
NADPH ₂	metilenotetraidrofolato redutase
NBT	nitroblue-tetrazólico
OMS	Organização Mundial da Saúde

PA	peso dos átrios
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fenazina
PPVE	parede posterior do ventrículo esquerdo
PVD	peso do ventrículo direito
PVE	peso do ventrículo esquerdo
RXR	receptor rexinóide
SOD	superóxido dismutase
TGF- β 1	fator transformador β 1
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TRIV	tempo de relaxamento isovolumétrico
TRIVc	tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca
UI	unidade internacional
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UVB	ultravioleta B
Vao	velocidade na aorta
VD	vitamina D
VD0	sem suplementação de vitamina D
VD1	suplementação com 1000 ui de vitamina D
VD3	suplementação com 3000 ui de vitamina D
VDR	receptor nuclear de vitamina D
VE	ventrículo esquerdo
VS	volume sistólico
VSVE	índice de massa do ventrículo esquerdo
VTI	integral tempo velocidade

Sumário

<i>Resumo</i>	<i>12</i>
<i>Abstract</i>	<i>15</i>
<i>Introdução</i>	<i>18</i>
<i>Hipótese</i>	<i>25</i>
<i>Objetivo</i>	<i>27</i>
<i>Material e Métodos</i>	<i>29</i>
<i>Resultados</i>	<i>42</i>
<i>Referências</i>	<i>87</i>

Índice de Tabelas

Tabela 1. Peso corporal, comprimento da tíbia, consumo de ração e pressão arterial caudal.	49
Tabela 2. Dados de função sistólica pelo ecocardiograma.	50
Tabela 3. Dados de função diastólica pelo ecocardiograma.	51
Tabela 4. Dados estruturais pelo ecocardiograma.	52
Tabela 5. Dados estruturais do ecocardiograma corrigidos pelo comprimento da tíbia.....	53
Tabela 6. Dados morfométricos.	54
Tabela 7. Estresse oxidativo no tecido cardíaco.	55
Tabela 8. Dosagens sanguíneas de cálcio, fósforo e vitamina D ₃	56
Tabela 9. Avaliação da produção de citocinas.....	57

Índice de Figuras

Figura 1. Pressão arterial caudal.....	58
Figura 2. Variável integral tempo velocidade (VTI).....	59
Figura 3. Volume sistólico (VS).	60
Figura 4. Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (PPVE).	61
Figura 5. Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo corrigido pela Tíbia (DDVE).	62
Figura 6. Massa do ventrículo esquerdo (MVE).....	63
Figura 7. Índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE).....	64
Figura 8. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pela Tíbia (AE/t).	65
Figura 9. Peso dos átrios (PA).	66
Figura 10. Peso dos átrios corrigido pela tíbia (PA/tíbia).	67
Figura 11. Área seccional do miócito (μm_2).	68
Figura 12. Porcentagem de Colágeno.	69
Figura 13. Concentração de Hidroperóxido de Lipídeo no Tecido Cardíaco.	70
Figura 14. Atividade de Catalase no Tecido Cardíaco.	71
Figura 15. Atividade de Glutathione Peroxidase no Tecido Cardíaco.	72
Figura 16. Atividade de Superóxido Dismutase.	73
Figura 17. Fosforo sérico.	74
Figura 18. Concentração sérica de 25-hidroxivitamina D.	75

Resumo

A exposição à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e está relacionada com disfunção ventricular. A atenuação da remodelação cardíaca pode ser importante para melhor prognóstico cardiovascular. A vitamina D (VD) tem se destacado por seu papel na função cardíaca e por atenuar a remodelação cardíaca em modelos de sobrecarga de pressão ou de volume.

Objetivo: avaliar a influência da suplementação de VD sobre a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro (EFC) em ratos, se a VD atua de forma dose dependente e verificar se esta atuação é por mecanismos anti-inflamatórios ou antioxidantes.

Métodos: Ratos machos Wistar com 200 a 250g foram alocados em seis grupos: 1) VD0-NEFC, sem suplementação de VD e não EFC; 2) VD1-NEFC, suplementação de 1000 UI VD/kg de ração e não EFC (n=8); 3) VD3-NEFC, suplementação com 3000 UI VD/kg de ração e não EFC; 4) VD0-EFC, sem suplementação de VD e EFC; 5) VD1-EFC, suplementação de 1000 UI VD/kg de ração e EFC; 6) VD3-EFC, suplementação de 3000 UI VD/kg de ração e EFC. Após dois meses, os animais foram submetidos à ecocardiografia e eutanasiados para coleta de material biológico. Foram avaliados porcentagem de colágeno, área seccional do miócito (ASM), estresse oxidativo e marcadores inflamatórios no tecido cardíaco e dosagens sanguíneas de cálcio, fósforo e do metabólito 25-hidroxicolecalciferol. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias e apresentados em media $\pm$ erro-padrão. Foi utilizado teste de tendência (correlação de Spearman) para avaliar a resposta de dose dependência.

Resultados: a EFC promoveu maior valor de parede posterior do ventrículo esquerdo (EFC = $1,38 \pm 0,03$; NEFC = $1,26 \pm 0,03$; $p = 0,009$), maior diâmetro diastólico do VE corrigido pela tibia (EFC = $17,7 \pm 0,20$; NEFC = $17,0 \pm 0,002$; $p = 0,033$), maior massa do VE (MVE) (EFC = 603 ± 23 ; NEFC = 509 ± 25 ; $p = 0,007$), maior índice de MVE (EFC = $1,8 \pm 0,06$; NEFC = $1,5 \pm 0,07$; $p = 0,004$), maior ASM (VD0-NEFC = 183 ± 50 e VD0-EFC=

268 ± 28; p = 0,01). A EFC levou a maior concentração de hidroperóxido de lipídeo (VD0-NEFC = 337 ± 26, VD0-EFC = 716 ± 22; p < 0,01) e menor atividade das enzimas glutathione peroxidase (VD0-NEFC = 37,8 ± 2,9; VD0-EFC = 29,9 ± 2,5; p = 0,05), catalase (VD0-NEFC = 1,1 ± 0,06; VD0-EFC = 0,6 ± 0,05; p < 0,001) e superóxido dismutase (VD0-NEFC = 3,96 (3,8-4,1); VD0-EFC = 2,29 (1,9-2,9); p < 0,001). Não foi observada alterações de colágeno e dos marcadores de inflamação.

A suplementação de VD fez com fossem observados menores valores de ASM (VD0-EFC = 268 ± 28; VD1-EFC = 251 ± 14 e VD3-EFC = 222 ± 11; p = 0,008), menor hidroperóxido de lipídeo (VD0-EFC = 716 ± 82; VD1-EFC = 519 ± 86; VD3-EFC = 426 ± 63; p<0,001) e maior atividade de glutathione peroxidase (VD0-EFC = 29,9 ± 2,5; VD1-EFC = 42,6 ± 2,9; VD3-EFC = 41,3 ± 3,2; p = 0,05), catalase (VD0-EFC = 0,6 ± 0,05; VD1-EFC = 0,8 ± 0,06; VD3-EFC = 0,8 ± 0,07; p < 0,001) e superóxido dismutase (VD0-EFC = 2,29 (1,9-2,9); VD1-EFC=3,83 (3,7-3,9); VD3-EFC = 3,92 (3,6-4,5); p = 0,002) de modo dose dependente.

Conclusão: A suplementação de VD atenuou a remodelação cardíaca induzida pela EFC com atuação na hipertrofia e no estresse oxidativo cardíaco.

Palavras-chave: exposição à fumaça do cigarro; remodelação cardíaca; vitamina D.

Abstract

Exposure to tobacco smoke (ETS) results in cardiac remodeling and it is associated with ventricular dysfunction. Attenuation of cardiac remodeling may be important for better cardiovascular prognosis. Vitamin D (VD) has become known for its role in cardiac function and VD supplementation attenuate cardiac remodeling in models of pressure or volume overload in previous studies.

Objective: To evaluate the influence of VD supplementation on cardiac remodeling induced by ETS in rats and whether VD actions are dose-dependent and if these actions involve anti-inflammatory and antioxidant mechanisms.

Methods: Male Wistar rats with 200 to 250g were allocated into six groups: 1) VD0-NETS, with no supplementation of VD and no ETS, 2)-VD1-NETS, supplementation with 1000 IU VD/kg of diet and no ETS (n = 8); 3) VD3-NETS, supplemented with 3000 IU VD/kg of diet and no ETS, 4) VD0-ETS, no supplementation of VD and ETS, 5)VD1-ETS, VD supplementation with 1000 IU/kg of diet and ETS, 6) VD3-ETS, VD supplementation of 3000 IU/kg of diet and ETS. After two months, the animals underwent echocardiography and euthanized for tissue collection. The collagen percentage, myocyte cross-sectional area (MCA), oxidative stress and inflammation biomarkers in cardiac tissue were determined. Blood levels of calcium, phosphorus and 25-hydroxycholecalciferol were also evaluated. Data were analyzed by two-way ANOVA and presented as mean $\pm$ standard error. Spearman correlation test was used to evaluate the dose dependent response.

Results: ETS promoted greater value of left ventricular posterior wall (ETS = 1.38 ± 0.03 ; NETS = 1.26 ± 0.03 , $p = 0.009$), LV diastolic diameter corrected by the tibia (ETS = 17.7 ± 0.20 , $17.0 \pm$ NETS = 0.002 , $p = 0.033$), higher LV mass (LVM) (ETS = 603 ± 23 ; NETS = 509 ± 25 , $p = 0.007$), higher LMV index (ETS = 1.8 ± 0.06 ; NETS = 1.5 ± 0.07 , $p = 0.004$), increased MCA (VD0- NETS = 183 ± 50 and VD0-ETS = 268 ± 28 , $p = 0.01$). The ETS led to greater concentration of lipid hydroperoxide (VD0-NETS = 337 ± 26 , VD0-ETS =

716 $\pm$ 23, $p < 0.01$) and lower activity of glutathione peroxidase (VD0-NETS = 37.8 $\pm$ 2.9; VD0-ETS = 29.9 $\pm$ 2.5, $p = 0.05$), catalase (VD0-NETS = 1.1 $\pm$ 0.06; VD0-ETS = 0.6 $\pm$ 0.05, $p < 0.001$) and superoxide dismutase (VD0-NETS = 3.96 (3.8-4.1); VD0-ETS = 2.29 (1.9-2.9), $p < 0.001$).

VD supplementation led to lower values of MCA (VD0-ETS = 268 $\pm$ 28; VD1-ETS = 251 $\pm$ 14 and VD3-ETS = 222 $\pm$ 11, $p = 0.008$), lower lipid hydroperoxide (VD0-ETS = 716 $\pm$ 82; VD1-ETS = 519 $\pm$ 86; VD3-ETS = 426 $\pm$ 63, $p < 0.001$) and higher activity glutathione peroxidase (VD0-ETS = 29.9 $\pm$ 2.5, VD1-ETS = 42.6 $\pm$ 2.9; VD3-ETS = 41.3 $\pm$ 3.2, $p = 0.05$), catalase (VD0-ETS = 0.6 $\pm$ 0.05; VD1-ETS = 0.8 $\pm$ 0.06; VD3-ETS = 0.8 $\pm$ 0.07, $p < 0.001$) and superoxide dismutase (VD0-ETS = 2.29 (1.9-2.9); VD1-ETS = 3.83 (3.7-3.9); VD3-ETS = 3.92 (3.6-4.5), $p = 0.002$) in a dose dependent manner.

Conclusion: VD supplementation attenuated cardiac remodeling induced by the ETS with actions on hypertrophy and oxidative stress.

Keywords: exposure to tobacco smoke, cardiac remodeling, vitamin D.

Introdução

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas, sejam fumantes¹. O total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu 4,9 milhões de mortes anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia. Caso as atuais tendências de expansão do seu consumo sejam mantidas, esses números aumentarão para 10 milhões de mortes anuais por volta do ano 2030, sendo metade delas em indivíduos em idade produtiva (entre 35 e 69 anos)². No Brasil, estima-se que cerca de 200.000 mortes/ano são decorrentes do tabagismo. De acordo com o Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis, realizado em 2002 e 2003, entre pessoas de 15 anos ou mais, residentes em 15 capitais brasileiras e no Distrito Federal, a prevalência de tabagismo variou de 12,9 a 25,2% nas cidades estudadas³. O maior número de fumantes estava concentrado na faixa etária dos 20 aos 49 anos².

Entre os riscos à saúde associados ao hábito de fumar, destacam-se as alterações cardiovasculares⁴. A fumaça do cigarro é pro trombogênica e aterogênica, aumentando o risco de infarto agudo do miocárdio, morte súbita, acidente vascular cerebral, aneurisma aórtico e doença vascular periférica. Mesmo doses muito pequenas de exposição aumenta o risco para complicações cardiovasculares⁵. A fumaça do cigarro contém mais de quatro mil substâncias químicas conhecidas e é composta de duas fases: a particulada (condensada) e a fase gasosa⁶. A fumaça tragada pelo fumante ativo é composta por gases combustíveis com alta concentração de radicais livres, oxidantes e pró-oxidantes⁷.

Estudos de exposição à fumaça do cigarro em animais mostraram que este leva a alterações funcionais e estruturais no coração^{4, 8, 9}, dentre elas, hipertrofia cardíaca, com aumento da dimensão diastólica do ventrículo esquerdo e redução da função sistólica^{8, 10}. Essas alterações de tamanho, forma, composição e funções cardíacas têm sido estudadas com

o nome de remodelação cardíaca¹¹. Assim, estudos mostram que a exposição à fumaça do cigarro pode levar à remodelação cardíaca e intensificar remodelação iniciada por outros estímulos, como hipertensão arterial e lesão tecidual^{8, 9, 12}. A fumaça do cigarro está associada ao aumento do estresse oxidativo, considerado agente do processo de remodelação, causado por radicais livres presentes na mistura de gases do cigarro, que induzem dano estrutural e funcional aos miócitos cardíacos¹⁰.

Uma das características mais marcantes da remodelação é que esse processo resulta, frequentemente, em queda progressiva da função ventricular⁹. Logo, estratégias podem ser utilizadas para atenuação do processo de remodelação e, assim, alterar a mortalidade consequente às doenças cardiovasculares. Para tanto, sabe-se que a manutenção da função cardíaca apropriada depende de adequado e contínuo fluxo de nutrientes¹³.

A vitamina D tem se destacado pelo seu papel na função cardíaca e sua deficiência é descrita como potencial risco para doenças cardiovasculares¹⁴⁻¹⁷. Alguns autores observaram que concentrações reduzidas de vitamina D ativa e do metabólito 25-hidroxicoilecalciferol (25[OH]D₃) são comuns em pacientes com insuficiência cardíaca^{18, 19}, bem como presença de função ventricular comprometida e cardiomiopatia dilatada em pacientes pediátricos com raquitismo^{20, 21}.

A vitamina D compreende as vitaminas D₂ (ergocalciferol) e D₃ (coilecalciferol) e é obtida a partir da pele após exposição solar, ou via ingestão alimentar por dieta ou suplementos. É sintetizada no fígado para 25-hidroxicoilecalciferol e nos rins é ativada pela enzima 25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilase (CYP27B1) para se tornar 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D₃], designada vitamina D ativa ou calcitriol²². A maior parte da ação molecular da vitamina D ativa é mediada por um receptor nuclear de vitamina D, conhecido como VDR. A ligação da vitamina D ativa com o VDR nuclear leva a ativação do receptor e sua heterodimerização com receptor rexinóide (RXR) e outros cofatores, que, por

sua vez, se ligam a elementos resposta de genes alvo para regulação de transcrição gênica. A vitamina D ativa também se liga a receptores de membranas celulares e regulam ações não-genômicas, por meio de vias de segundos mensageiros. Os receptores para vitamina D foram identificados em outros tecidos, além de ossos, intestino e rins, como sistema imune e coração²³.

A presença de receptores para vitamina D ativa foi identificada em miócitos de ratos e camundongos²⁴⁻²⁸. Ratos com deficiência de vitamina D intrauterina apresentaram aumento do ventrículo esquerdo e hipertrofia dos miócitos cardíacos²⁹. Przybylski e colaboradores (2010) mostraram que concentrações reduzidas de vitamina D estão associadas com a progressão da insuficiência cardíaca em ratos³⁰. A deleção dos genes que expressam receptores de vitamina D levou a hipertrofia e fibrose cardíaca em camundongos, com efeito de aumento no crescimento e alteração da estrutura dos miócitos^{25, 31, 32}. Rahman e colaboradores estudaram a remodelação da matriz extracelular em camundongos com genes VDR deletados, e concluíram que a razão entre peso cardíaco e corporal aumentou 41% nos animais sem a expressão do receptor³³. É descrito que a vitamina D é capaz de modular a contratilidade cardíaca, hipertrofia e fibrose, alterações que também ocorrem na insuficiência cardíaca em humanos e que caracterizam o processo de remodelação³².

A vitamina D regula as funções celulares por diferentes vias de sinalização³¹. Green e colaboradores (2006) sugerem que a vitamina D influencia a contratilidade cardíaca por diversas vias, incluindo ação direta na transcrição e ação genômica em proteínas celulares e no ciclo de cálcio celular, ou ainda por meio de vias não genômicas, como ativação de proteínas quinase. Esses autores estudaram a ação da vitamina D ativa em isolados de miócitos de ratos e concluíram que a vitamina D ativa a fosforilação do ciclo de cálcio mediada pela proteína quinase C e proteínas de miofilamentos, resultando em redução do pico de encurtamento e aceleração da contração e relaxamento dos cardiomiócitos³¹.

Além de atuar na contratilidade, a vitamina D tem efeito anti hipertrófico e pode alterar a expressão de genes conhecidos por contribuir para a hipertrofia ventricular³⁴. Mancuso e colaboradores mostraram que o tratamento com vitamina D em ratos com insuficiência cardíaca resultou em melhor função cardíaca, indicada por menor diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) avaliado pelo ecocardiograma²⁶. Em modelo de hipertensão, a vitamina D reduziu peso e espessura da parede do coração e pressão diastólica final³⁴. Estudo *in vitro* com miócitos de ratos recém-nascidos mostrou que o tratamento com vitamina D ativa reduziu variáveis associadas à hipertrofia induzida por endotelina²⁸. A endotelina é considerada moduladora da hipertrofia e sua expressão gênica é ativada em cardiomiócitos por estímulos que promovem a hipertrofia, como, por exemplo, sobrecarga hemodinâmica. O estímulo para hipertrofia leva a ativação de genes conhecidos como protooncogenes²⁸. Wu e colaboradores descrevem que a vitamina D regula a expressão desses protooncogenes, além do crescimento celular e a mitogênese²⁸. O efeito anti hipertrófico da vitamina D também pode ser explicado por sua atuação no sistema renina angiotensina (SRA) e peptídeos natriuréticos³⁵. O SRA tem papel na regulação da homeostase de pressão e volume sanguíneos e sua super ativação é fator patogênico para hipertensão, aterosclerose e hipertrofia cardíaca²³. A vitamina D tem sido considerada regulador negativo do SRA e o tratamento com a vitamina reduziu a expressão de peptídeo natriurético e renina no coração de ratos^{23, 35, 36}.

A remodelação da matriz extracelular é outro fator que pode estar envolvido na progressão da remodelação, dilatação e insuficiência cardíacas²³. Simpson e colaboradores descreveram que a deficiência de vitamina D induz o depósito de colágeno no coração de ratos²⁵. Em ratos nefrectomizados, a vitamina D ativa reduziu a expressão de fator de crescimento transformador β -1 (TGF- β 1) e a acumulação de colágeno I e III³⁷. Evidências

sugerem que o TGF- β 1 estimula a síntese de componentes da matriz extracelular e reduzem a produção de collagenase²³.

Outros fatores em estudo envolvidos no processo de remodelação são o estresse oxidativo e a inflamação^{38, 39}, sendo que algumas citocinas inflamatórias estão claramente elevadas nos estados congestivos, como interleucina-6, da interleucina-1 β e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)⁴⁰. O aumento do estresse oxidativo tem sido considerado um dos principais mecanismos de dano causado pela exposição ao cigarro^{38, 41, 42}. Alguns autores descreveram o potencial papel da vitamina D como antioxidante^{43, 44}. Goodwin e colaboradores (2006) relataram que a suplementação com vitamina D e micronutrientes em ratos com aldosteranismo preveniu o estresse oxidativo nos animais⁴⁵. Alguns autores sugerem também que a vitamina D possui efeito anti-inflamatório, sendo uma das ações indiretas da vitamina no tecido cardíaco^{35, 46}. Estudo clínico com a suplementação de vitamina D mostrou que o tratamento com a vitamina reduziu a concentração de TNF- α , uma citocina inflamatória, e aumentou a de interleucina-10 (IL-10), citocina anti-inflamatória, em pacientes com insuficiência cardíaca⁴⁷.

Apesar da vitamina D ser promissora em diferentes modelos de agressão, não está estabelecida a dose adequada para suplementação. Na ausência de dados adicionais o National Research Council (1978) recomendou a quantidade de 1000 UI de colecalciferol/kg de dieta para ratos⁴⁸. Alguns estudos sobre a vitamina D e a função cardíaca utilizaram diferentes doses de tratamento. Weishaar e Simpson (1987), ao estudarem papel da vitamina no coração, suplementaram ratos deficientes em vitamina D com 2000 UI de colecalciferol/kg de dieta²⁴. Em estudo realizado por Morris e colaboradores (1995), os animais foram suplementados com 3000 UI/kg de dieta para estudar o metabolismo e a contratilidade do coração⁴⁹. Em estudos de toxicidade, foi relatado o uso de doses desde 1000UI por dia (~30.000 UI/kg de dieta) a

100.000UI/kg^{50, 51}. Além disso, Wu e colaboradores (1996) relataram também que a vitamina D pode atuar de forma dose dependente nos miócitos cardíacos²⁸.

Assim, com base nas alterações induzidas pelo fumo e na ação da vitamina D em modelos de agressão ao coração, a suplementação com a vitamina D pode atenuar a remodelação cardíaca induzida em ratos expostos à fumaça do cigarro de forma dose dependente.

Hipótese

A suplementação com vitamina D₃ (colecalfiferol) nas doses de 1000 UI/ kg e 3000 UI/kg de ração atenua a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro em ratos Wistar de forma dose dependente por atuação na inflamação e no estresse oxidativo.

Objetivo

Analisar se a suplementação de vitamina D₃ (colecalfiferol) nas doses 1000 UI/kg e 3000 UI/kg de ração têm influência sobre função e estrutura cardíacas em animais expostos à fumaça do cigarro de forma dose dependente e verificar se esta atuação é por mecanismos anti-inflamatórios ou antioxidantes.

Material e Métodos

O protocolo experimental do presente trabalho (695/2008) foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) de nossa instituição, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Delineamento do estudo

Foram utilizados ratos machos, raça Wistar, pesando aproximadamente 200-250g, condicionados no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu. Os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Permaneceram em gaiolas individuais, com livre acesso à água e comida controlada. O consumo de alimento foi avaliado diariamente por meio da razão entre o ofertado e o consumido. A ração foi ofertada para todos os animais de acordo com a ingestão do grupo exposto à fumaça do cigarro e suplementado com 3000 UI/kg de ração, assim todos os animais consumiram a mesma quantidade de ração. Os animais foram alocados em seis grupos, de acordo com a exposição à fumaça do cigarro (EFC) e à dose de suplementação de vitamina D (VD). Para a suplementação, foram utilizadas três doses da vitamina: VD0 (sem adição de vitamina D), VD1 (adição de 1000 UI de vitamina D por quilo de ração) e VD3 (adição de 3000 UI de vitamina D por quilo de ração). Assim, foram formados seis grupos de estudo: 1) grupo controle, alimentado com dieta padrão e sem exposição à fumaça do cigarro (n=8), denominado VD0-NEFC; 2) grupo alimentado com dieta padrão suplementada com 1000 UI/kg de ração de colecalciferol e sem exposição à fumaça do cigarro (n=8), denominado VD1-NEFC; 3) grupo alimentado com dieta padrão suplementada com 3000 UI/kg de ração de colecalciferol e sem exposição à fumaça do cigarro (n=8), denominado VD3-NEFC; 4) grupo controle exposto à fumaça do cigarro,

alimentado com dieta padrão sem suplementação e exposto à fumaça do cigarro (n=12), denominado VD0-EFC; 5) grupo alimentado com dieta padrão suplementada com 1000 UI/kg de ração de colecalciferol e com exposição à fumaça do cigarro (n=10), denominado VD1-EFC; 6) grupo alimentado com dieta padrão suplementada com 3000 UI/kg de ração de colecalciferol e com exposição à fumaça do cigarro (n=8), denominado VD3-EFC; (UI= unidades internacionais).

Dieta e suplementação de vitamina D

A suplementação de vitamina D foi feita sobre ração padrão utilizada no laboratório, com vitamina D₃ (colecalciferol), adquirida comercialmente (Sigma Chemical CO, St Louis, EUA), por um período de 60 dias.

Exposição ao fumo

Para expor os animais à fumaça de cigarro, foi utilizado o método proposto por Wang e colaboradores⁵², e padronizado em nosso laboratório(4, 11, 12). Castardeli e colaboradores (2008) estudaram a remodelação cardíaca em animais expostos à fumaça do cigarro por dois meses e observaram alterações cardíacas significativas neste período, portanto, optou-se observar os animais por dois meses⁵³.

Os ratos foram colocados em câmara transparente, cujas medidas são, aproximadamente, 95, 80 e 65 cm. A câmara foi conectada ao dispositivo para produção de fumaça dos cigarros, aspirada por vácuo e veiculada para câmara em que estiveram alojados os animais, durante período de 30 minutos. Após esse período, a fumaça foi exaurida e o procedimento repetido. Na primeira semana, a fumaça foi obtida a partir de cinco cigarros,

duas vezes por dia no período da tarde, com intervalos de 10 minutos. O número de cigarros foi aumentado para o total de 10 cigarros, duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde. No fim do período de estudo experimental, os animais foram expostos à fumaça de 40 cigarros/dia. O cigarro utilizado, comercial comum, apresenta a seguinte composição: 1,0 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono.

Avaliação estrutural e funcional pelo ecocardiograma

Após dois meses de observação, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) via intramuscular. Em seguida foi feita tricotomia no tórax dos animais, que, prontos, foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do ecocardiograma. O ecocardiógrafo utilizado foi do modelo HDI-5000 Sonos CT da Philips, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-12 MHz, utilizando método recomendado pela European Society of Echocardiography⁵⁴. As estruturas cardíacas foram medidas em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos, obtendo-se a média aritmética em seguida.

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

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

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

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

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

O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o final do fluxo sistólico pela VSVE e o início do fluxo diastólico transmitral. As áreas dos átrios esquerdo (Área AE) e direito (Área AD) foram obtidas a partir da planimetria na janela apical 4 câmaras, no final da sístole ventricular, quando as dimensões dos átrios são máximas. Posteriormente o TRIV foi ajustado pela frequência cardíaca por meio da fórmula: $TRIV_c = TRIV/RAIZ(RR/1000)$, sendo $RR = (60000/FC)$.

As outras variáveis foram derivadas das formulações descritas a seguir:

- ✓ Massa do ventrículo esquerdo (MVE) = $[1,04 \times (DDVE + 2 \times EPP)^3 - (DDVE)^3]$, em que 1,04 representa a gravidade específica do miocárdio.
- ✓ Relação entre espessura de parede posterior do ventrículo esquerdo e o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo: $PPVE/DDVE$
- ✓ Índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) = MVE/PC
- ✓ Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) = $(DDVE^3 - DSVE^3)/DDVE^3$
- ✓ Porcentagem de encurtamento (% ENC) = $[(DDVE - DSVE)/DDVE] \times 100$
- ✓ Volume sistólico (VS) = $[VTI \times \pi \times (VSVE/2)^2]$, sendo VTI a integral da velocidade/tempo do fluxo sistólico na VSVE
- ✓ Débito cardíaco (DC) = $VS \times FC$

✓ Índice cardíaco (IC) = DC/peso corporal

Algumas variáveis estruturais foram normalizadas pelo comprimento da tíbia em milímetros (AE, DDVE e DSVE).

Estudo Morfométrico

Após o estudo funcional, foi realizado estudo morfométrico, segundo técnica já padronizada^{9, 53, 55}. Os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de pentobarbital sódico intraperitoneal e os corações foram retirados, dissecados e os átrios, ventrículos direito (VD) e o esquerdo (VE), incluindo o septo interventricular, foram separados e pesados. A tíbia de todos os animais foi retirada e seu comprimento foi aferido por meio de paquímetro. Os pesos dos átrios (PA), ventrículo esquerdo (PVE) e ventrículo direito (PVD) normalizados pelo comprimento da tíbia (mm) foram utilizados como índice de hipertrofia. O conteúdo de água do pulmão e fígado foi avaliado pela relação entre peso úmido e seco dos tecidos.

Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução de formol a 10% por período de 24 horas, segundo relato prévio, com modificações^{8, 9, 11}. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes histológicos coronais de 4 µm. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução Hematoxilina-Eosina (HE) para aferição de áreas da secção seccional transversa dos miócitos (ASM), empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente, com forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localização na camada subendocárdica da parede muscular do ventrículo esquerdo. Este cuidado visa uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes

grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 μm e corados pela técnica de *Picro Sirius* red, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. A leitura foi feita utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo e programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cyberetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo, utilizando objetiva de 40X^{9, 53}.

Dosagem de cálcio e fósforo séricos

-Dosagens Bioquímicas de cálcio: as concentrações séricas de cálcio foram dosadas em laboratório veterinário, por meio de método arzenazo III, com kit Bioclin.

-Dosagens Bioquímicas de Fósforo: as concentrações séricas de fósforo foram dosadas em laboratório veterinário, por meio de método ultravioleta, com kit Ebram.

Dosagem das concentrações de vitamina D

As concentrações de 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D₃] no soro foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito por Asknes (1994)⁵⁶. O aparelho empregado foi cromatógrafo Waters 2695, com detector Waters 2996-fotodiodo. A análise foi feita por coluna C18 de fase reversa para todos os experimentos. A fase móvel foi composta por água e metanol (850:150, v/v). O comprimento do detector de onda ultra-violeta (UV) foi fixado em 265 nm e fluxo de 0,5ml/min.

-Extração e determinação da vitamina D sérica: a análise de 25-hidroxicoлекаlCIFerol foi feita em alíquotas de 500 µL de soro. O soro foi colocado em tubo de 16x125 mm e foi adicionado 500 µL de solução metanol:isopropanol (90:10 v/v) e agitado em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de hexano e centrifugado a 3000 rpm por 3 minutos. A seguir, foi coletado o sobrenadante e colocado para secagem em nitrogênio e após a secagem, foi feita ressuspensão com 150 µL de metanol. Por fim, esta solução foi injetada no HPLC, com tempo de corrida de 15 minutos⁵⁶.

Avaliação do estresse oxidativo

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no tecido cardíaco. A oxidação foi medida por meio da determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo no tecido cardíaco. As análises foram realizadas após a determinação das proteínas totais do tecido. Amostras de 200 mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugado a 12000 x g, por 30 minutos a -4°C, segundo descrito por Pereira e colaboradores (1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (g/100g de tecido)⁵⁷.

-Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9): a atividade da GSH-Px foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura e colaboradores (1974), em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutathione reduzida (GSH) e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metileno-tetraidrofolato redutase (NADPH₂) a 340 nm na presença de glutathione redutase, a qual catalisa a redução da

glutathiona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px, expressa em nmol/mg de tecido⁵⁸.

-Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1.): a atividade da SOD foi determinada pela técnica de Crouch e colaboradores (1981), tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. a atividade foi expressa em nmol/mg de proteínas totais⁵⁹.

-Determinação da atividade da Catalase (EC.1.11.1.6.): as atividades da catalase foram determinadas em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm. Os resultados, expressos μ mol/mg de proteínas totais⁶⁰.

-Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo: foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) medida por hidroperóxido, com 100 μ l da amostra e 900 μ l de mistura reagente de sulfato ferroso ($FeSO_4$), 250 μ M, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25 mM, xilenol orange 100 μ M 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 tecido⁶¹.

Avaliação da produção de citocinas

Foram avaliadas as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10). Amostras de tecido cardíaco na quantidade de 60 mg foram homogeneizados e solubilizados em 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4; 0,3 M de sacarose; 0,5 mM DTT; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,3 mM fenil-metil-sulfonil-fenazina (PMSF); 10 mM NaF, e 1:100 inibidor de protease. Concentrações de citocinas em homogeneizado cardíaco foram avaliadas por técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA)⁶².

Pressão sistólica caudal

A medida da pressão arterial sistólica caudal foi realizada duas semanas antes da eutanásia. Os animais fumantes não foram submetidos à exposição à fumaça do cigarro por período de 24 horas antes das aferições. Foi utilizado pletismógrafo de cauda, constituído por um polígrafo (Byo-Sistem PE 300, NARCO) com sensor colocado na região proximal da cauda e um eletroesfigmomanômetro, possibilitando assim o registro gráfico da pressão arterial. Os animais foram aquecidos em caixa de madeira a 37°C com o calor gerado por duas lâmpadas de filamentos, por quatro minutos, e transferidos para um suporte cilíndrico de ferro, especialmente desenhado para permitir a completa exposição da cauda do animal. Na região proximal da cauda foi colocado o sensor (KSM-microfone) ligado ao pletismógrafo⁶³.

Análise Estatística

Os resultados de cada variável para cada grupo experimental foram submetidos à verificação da normalidade e de igualdade de variância. Quando essas condições foram atendidas foi realizada a análise de variância (ANOVA) de dois fatores. Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média.

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. No presente estudo, o primeiro fator correspondeu à exposição à fumaça de cigarro (EFC) e o segundo fator, à suplementação da dieta com vitamina D (VD).

Quando ocorre interação significativa entre os fatores ($p < 0,05$), torna-se importante identificar os grupos que apresentam diferença estatística entre si. Para tanto, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Quando não existe interação entre os tratamentos, o que importa é saber se animais EFC diferem dos Não EFC e se os suplementados com VD diferem dos Não VD. Para a variável VTI no ecocardiograma para a variável morfométrica peso do átrio, concentração de hidroperóxido de lipídeo e atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase e fósforo foram observadas interações estatisticamente significantes entre os tratamentos. Nestes casos, os dados foram representados em gráficos tridimensionais, em que se permite visualizar a influência de cada fator sobre as variáveis nos seis grupos de estudo.

Para demais variáveis analisadas nesse estudo não existiram interações estatisticamente significantes entre os dois fatores. Nesses casos, foram analisados os dados marginais, ou seja, a influência dos fatores EFC e VD foi analisada separadamente. Para o fator EFC, os animais foram reagrupados em não expostos (NEFC) e expostos à fumaça do cigarro (EFC) para as comparações e apresentados em gráficos de barras. Da mesma forma, para o fator VD, os animais foram reagrupados de acordo com a dose de suplementação

(VD0, VD1 e VD3) e apresentados em gráficos de barras. Para todos os casos, optou-se por representar em gráficos as variáveis com diferença estatística.

No caso dos valores das variáveis que não preencheram os critérios de normalidade e de igualdade de variância, foram realizadas as transformações matemáticas necessárias. Para aquelas que mesmo após a transformação não passaram no teste de normalidade (área seccional do miócito, porcentagem de colágeno e superóxido dismutase), optou-se pela realização de comparações entre os diferentes grupos não expostos ao cigarro (VD0-NEFC, VD1-NEFC e VD3-NEFC) e entre os diferentes grupos expostos ao cigarro (VD0-EFC, VD1-EFC e VD3-EFC) por meio de teste ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis, além das comparações entre grupos VD0-NEFC e VD0-EFC, grupos VD1-NEFC e VD1-EFC e grupos VD3-NEFC e VD3-EFC pelo teste t Student ou Mann Whitney. Assim para cada variável foram realizadas cinco comparações e o nível de significância (α) adotado foi menor ou igual a 0,01, segundo ajuste por Bonferroni (0,05/5). Os dados foram expressos em média e erro padrão da média e representados em gráficos de barras para dados paramétricos e gráficos de três pontos para os dados não paramétricos.

Para avaliar a resposta dose dependente foi utilizado o teste de tendência (correlação de Spearman). Os resultados dos testes estão descritos juntamente com os resultados das análises de cada variável, no decorrer do texto.

Para realização dos referidos testes estatísticos foi empregado o pacote estatístico SigmaStat for Windows v2.03 da SPSS. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05 para todos os testes, com exceção daquelas citadas no anteriormente. Para construção dos gráficos foi utilizado software Sigma Plot versão 11.0 da SPSS.

Considerando-se que foi encontrada diferença na pressão arterial nos animais expostos à fumaça do cigarro e que a pressão arterial poderia explicar os achados ecocardiográficos, foi realizado o teste de análise de covariância (ANCOVA). Na ANCOVA, além dos fatores

exposição à fumaça de cigarro e suplementação VD, a co-variável pressão arterial foi acrescentada com a finalidade de corrigir os valores das variáveis estudadas de modo a anular a influência da pressão sobre elas. A ANCOVA mostrou que a co-variável pressão arterial não exerceu influência sobre os valores das variáveis estudadas, de modo que essa análise não foi mencionada nos resultados do presente estudo. O teste de ANCOVA foi realizado com pacote estatístico Systat versão 13.0 da *Cranes Software International* Ltda.

Resultados

Os animais não apresentaram diferença significativa em relação ao peso corporal final, comprimento da tíbia ou consumo alimentar para ambos os fatores.

A pressão sistólica caudal dos animais fumantes foi maior em comparação aos não fumantes (EFC = $122,5 \pm 11,8$; NEFC = $111,8 \pm 12,7$; $p = 0,005$). Não houve diferença para o fator Vitamina D. Esses dados estão apresentados na Tabela 1 e representados na Figura 1. Pelo teste de tendência, foi observado efeito dose dependente entre a pressão arterial e a suplementação de vitamina D nos animais expostos à fumaça do cigarro (coeficiente de correlação = $-0,388$; $p = 0,04$; $n = 29$). Porém, não foi observado esse efeito nos animais não expostos à fumaça do cigarro.

Estudo ecocardiográfico

Os dados referentes a função sistólica do coração pelo ecocardiograma estão representados na Tabela 2. Para as variáveis funcionais do ecocardiograma houve interação entre os fatores somente para a variável integral tempo-velocidade (VTI), sendo diferente entre os animais suplementados com 1000UI de VD controle e fumantes. Os animais expostos ao cigarro apresentaram maior VTI (VD1-NEFC = $4,1 \pm 0,29$; VD1-EFC = $5,4 \pm 0,26$; $p = 0,035$) (Figura 2). Para as variáveis de função sistólica, o volume sistólico (VS) apresentou-se significativamente maior nos animais expostos a fumaça do cigarro em relação aos animais não fumantes (EFC = $0,206 \pm 0,007$; NEFC = $0,180 \pm 0,008$; $p = 0,024$) (Figura 3), sem diferença para as demais variáveis. Não houve interação para as demais variáveis. Em relação às variáveis de função diastólica, não houve diferença significativa entre os fatores (Tabela 3).

As variáveis de estrutura do ecocardiograma estão apresentadas na Tabela 4 e 5. A parede posterior do VE (PPVE) (EFC = $1,38 \pm 0,03$; NEFC = $1,26 \pm 0,03$; $p = 0,009$)

(Figura 4), o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pela tíbia (DDVE/T) (EFC = $17,7 \pm 0,20$; NEFC = $17,0 \pm 0,002$; $p = 0,33$) (Figura 5), a massa do VE (MVE) (EFC = 603 ± 23 ; NEFC = 509 ± 25 ; $p = 0,007$) (Figura 6) e o índice de massa do VE (IMVE) (EFC = $1,8 \pm 0,06$; NEFC = $1,5 \pm 0,07$; $p = 0,004$) (Figura 7) foram maiores nos animais fumantes em comparação àqueles não expostos ao cigarro. Na análise para as demais variáveis, não foram encontradas diferenças entre animais EFC e não EFC. Para o fator Vitamina D, foi encontrada diferença somente no átrio corrigido pela tíbia, que se apresentou menor nos animais tratados com vitamina D na dose de 1000UI em relação àqueles tratados com 3000UI (VD0 = $0,102 \pm 0,0018$; VD1 = $0,098 \pm 0,0018$; VD3 = $0,104 \pm 0,00193$; $p = 0,047$) (Figura 8).

Pelo teste de tendência, não foi observado efeito dose dependente entre as variáveis ecocardiográficas e a suplementação de vitamina D nos animais expostos e não expostos à fumaça do cigarro.

Estudo morfométrico

Os dados relativos ao estudo morfométrico estão apresentados na Tabela 6. Houve interação entre os fatores para o peso dos átrios (VD0-NEFC = $3,7 \pm 0,11$; VD1-EFC = $3,5 \pm 0,11$; VD3-NEFC = $3,3 \pm 0,11$; VD0-EFC = $3,5 \pm 0,09$; VD1-EFC = $3,7 \pm 0,09$; VD3-EFC = $3,6 \pm 0,09$; $p = 0,031$) (Figura 9) e para peso dos átrios corrigido pela tíbia (VD0-NEFC = $2,3 \pm 0,11$; VD1-NEFC = $2,1 \pm 0,11$; VD3-NEFC = $2,0 \pm 0,11$; VD0-EFC = $2,1 \pm 0,09$; VD1-EFC = $2,4 \pm 0,09$; VD3-EFC = $2,3 \pm 0,11$; $p = 0,031$) (Figura 10). Porém o teste não detectou os grupos diferentes entre si para ambas as variáveis. Não houve diferença entre os animais quanto ao peso do ventrículo esquerdo e ventrículo direito para ambos os fatores. Em relação ao conteúdo de água de pulmão e

fígado, não foram observadas diferenças entre os animais para ambos os fatores. Pelo teste de tendência, não foi observado efeito dose dependente entre as variáveis e a suplementação de VD.

Em relação a área seccional do miócito (ASM), foi observado valor maior entre os grupos sem suplementação de VD exposto e não exposto à fumaça do cigarro (VD0-EFC = 268 ± 28 e VD0-NEFC = 183 ± 50 ; $p = 0,01$) (Figura 11). Na comparação entre todos os grupos expostos à fumaça do cigarro, a suplementação com 3000UI de VD reduziu significativamente a ASM em relação ao grupo sem suplementação (VD0-EFC = 268 ± 28 ; VD1-EFC = 251 ± 14 e VD3-EFC = 222 ± 11 ; $p = 0,008$), de maneira dose dependente, com coeficiente de correlação de 0,718 e valor de p de 0,002 ($n=15$). (Figura 11). Para a porcentagem de colágeno, não foi observado diferença significativa entre fumantes e não fumantes e também para tratamento com vitamina D e também não foi observado efeito dose dependente entre as variáveis e a suplementação (Figura 12).

Estresse oxidativo

As determinações para estresse oxidativo estão apresentadas na Tabela 7. Houve interação entre os fatores EFC e VD para concentração de hidroperóxido de lipídeo e atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase.

Em relação a concentração de hidroperóxido de lipídeo, o grupo sem suplementação e com EFC apresentou maior concentração de hidroperóxido em relação ao grupo sem suplementação e sem EFC (VD0-EFC = $715,9 \pm 22,1$; VD0-NEFC = $336,7 \pm 25,6$; $p < 0,01$) e também maior concentração no grupo suplementado com 1000UI de vitamina D e com EFC em relação ao grupo suplementado com 1000UI e sem EFC (VD1-EFC = $518,7 \pm 85,5$; VD1-NEFC = $438,6 \pm 52,8$; $p < 0,001$) (Figura

13). Houve redução das concentrações de hidroperóxido de lipídeo entre os grupos EFC suplementados com vitamina D em ambas as doses e o grupo não suplementado e com EFC ($VD0-EFC = 716 \pm 81,9$; $VD1-EFC = 518,7 \pm 85,5$; $VD3-EFC = 425,9 \pm 63,2$; $p < 0,001$) (Figura 13), de forma dose dependente, com coeficiente de correlação de -0,883 e valor de $p < 0,01$ ($n=19$).

Para a enzima catalase, entre os grupos não suplementados com VD, o grupo EFC apresentou menor atividade da enzima em relação ao grupo não exposto ($VD0-NEFC = 1,1 \pm 0,06$; $VD0-EFC = 0,6 \pm 0,05$; $p < 0,01$). Houve aumento da atividade nos grupos EFC suplementados com vitamina D em relação ao grupo EFC e sem suplementação ($VD0-EFC = 0,6 \pm 0,05$; $VD1-EFC = 0,8 \pm 0,06$; $VD3-EFC = 0,8 \pm 0,07$; $p < 0,001$) (Figura 14). Pelo teste de tendência, foi observado efeito dose dependente entre a atividade da enzima e a suplementação de vitamina D nos animais expostos à fumaça do cigarro (coeficiente de correlação = 0,676 $p < 0,01$; $n = 19$).

Da mesma forma, para a atividade da enzima glutationala peroxidase foi observado tendência de diferença nos grupos fumantes suplementados com VD em relação ao grupo fumante não suplementado ($VD0-EFC = 29,9 \pm 2,5$; $VD1-EFC = 42,6 \pm 2,9$; $VD3-EFC = 41,3 \pm 3,2$; $p = 0,056$) e redução da atividade no grupo fumante sem suplementação em relação ao grupo sem exposição ao cigarro e sem suplementação ($VD0-NEFC = 37,8 \pm 2,9$; $VD0-EFC = 29,9 \pm 2,5$; $p = 0,056$) (Figura 15). Foi observado efeito dose dependente entre a atividade da enzima e a suplementação de vitamina D nos animais expostos à fumaça do cigarro (coeficiente de correlação = 0,66 $p = 0,002$; $n = 19$).

Para a atividade da enzima superóxido dismutase, não foi possível testar a interação entre os fatores. Pelo teste ANOVA de uma via entre os grupos expostos à fumaça do cigarro, foi observada diferença significativa entre os grupos sem

suplementação exposto e não exposto à fumaça do cigarro (VD0-EFC = 2,29 (1,9-2,9); VD0-NEFC = 3,96 (3,8-4,1); $p < 0,001$) (Figura 16). Foi observada também diferença significativa entre o grupo suplementado com 3000 UI de VD e o grupo sem suplementação de VD (VD0-EFC = 2,29 (1,9-2,9); VD3-EFC = 3,92 (3,6-4,5); $p = 0,002$) (Figura 16) e entre os grupos suplementados com 1000 UI de VD exposto e não exposto à fumaça do cigarro (VD1-NEFC = $4,12 \pm 0,19$; VD1-EFC = $3,79 \pm 0,16$; $p = 0,009$) (Figura 16). O teste de tendência mostrou reposta dose dependente entre os animais fumantes, com coeficiente de correlação de 0,798 e valor de $p < 0,01$ ($n = 19$).

Dosagens de cálcio, fósforo e vitamina D

As dosagens séricas realizadas estão apresentadas na Tabela 8. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados para dosagens de cálcio sérico. Em relação as dosagens séricas de fósforo, houve interação entre os fatores EFC e VD. O grupo suplementado com 3000 UI de VD e não exposto ao cigarro apresentou concentração de fósforo aumentada significativamente em relação ao grupo suplementado com 1000 UI de VD e sem exposição a fumaça do cigarro e em relação ao grupo suplementado com 3000 UI de VD e exposto a fumaça do cigarro (VD3-NEFC = $7,62 \pm 0,39$; VD1-NEFC = $6,11 \pm 0,39$; VD3-EFC = $5,99 \pm 0,39$; $p = 0,039$) (Figura 17). O teste de tendência não mostrou efeito dose dependente entre as dosagens para os animais expostos e não expostos à fumaça do cigarro.

Em relação às dosagens séricas de vitamina D, foi observada diferença significativa entre os grupos somente para o fator VD (Figura 18). Os animais suplementados com 3000 UI e 1000 UI apresentaram valores maiores de 25(OH)D₃ em relação aos animais sem suplementação, e aqueles com suplementação de 3000 UI

também apresentaram maiores valores em relação aos de 1000 UI ($VD0 = 5,41 \pm 0,097$; $VD1 = 5,82 \pm 0,093$; $VD3 = 6,13 \pm 0,097$; $p < 0,001$). O teste de tendência mostrou efeito dose dependente entre os valores encontrados e as diferentes doses de vitamina D, tanto entre os grupos sem exposição ao cigarro como entre os grupos expostos ao cigarro (Animais EFC: coeficiente de correlação = 0,869, $p < 0,01$, $n = 15$; Animais NEFC: coeficiente de correlação = 0,840, $p < 0,01$, $n = 16$).

Avaliação da produção de citocinas

Os resultados referentes à produção de citocinas estão apresentados na Tabela 9. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados para ambos os fatores. Também não foi observada resposta dose dependente entre as variáveis e as diferentes doses de vitamina D.

Tabela 1. Peso corporal, comprimento da tíbia, consumo de ração e pressão arterial caudal.

Dieta	Fumo	N	Peso corporal (g)	Tíbia (mm)	Consumo Ração (g)	Pressão caudal (mmHg)
VD0	N EFC	8	337±0,006	39±0,31	20±0,43	110±4,3
VD1	N EFC	8	341±0,005	39±0,31	21±0,43	112±4,3
VD3	N EFC	8	329±0,006	38±0,31	20±0,43	112±4,3
VD0	EFC	12	339±0,006	38±0,27	21±0,37	126±3,6
VD1	EFC	10	332±0,006	39±0,28	21±0,39	124±3,8
VD3	EFC	8	337±0,006	39±0,31	21±0,43	115±4,3
P1 (EFC)			0,981	0,107	0,354	0,005
P2 (VD)			0,747	0,188	0,06	0,433
P3 (EFCxVD)			0,373	0,321	0,869	0,219

VD: vitamina D; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 2. Dados de função sistólica pelo ecocardiograma.

Dieta	Fumo	N	FC (bpm)	Vao (cm/s)	VTI (cm)	FE	% ENC	DC (l/min)	IC (l/min/kg)	VS (l/ml)
VD0	N EFC	8	320±61	85±5,0	4,66±0,30	0,93±0,12	0,59±0,24	58±5,3	0,17±0,17	0,18±0,14
VD1	N EFC	8	338±43	76±4,2	4,10±0,25	0,93±0,12	0,59±0,24	54±5,3	0,16±0,17	0,16±0,14
VD3	N EFC	8	321±56	85±5,4	4,54±0,30	0,94±0,12	0,62±0,24	64±5,3	0,2±0,017	0,20±0,14
VD0	EFC	12	316±33	85±4,5	4,72±0,26	0,92±0,10	0,59±0,2	62±4,5	0,18±0,15	0,20±0,12
VD1	EFC	10	321±65	95±5,0	5,43±0,30	0,93±0,10	0,59±0,21	70±4,7	0,2±0,15	0,20±0,13
VD3	EFC	8	315±56	90±5,0	4,49±0,30	0,93±0,12	0,59±0,24	64±5,3	0,2±0,17	0,20±0,14
P1 (EFC)			0,528	0,049	0,064	0,475	0,457	0,130	0,144	0,024
P2 (VD)			0,771	0,865	0,678	0,782	0,838	0,731	0,615	0,772
P3 (EFCxVD)			0,847	0,134	0,035	0,932	0,788	0,259	0,225	0,067

VD: vitamina D; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; FC: frequência cardíaca; Vao: velocidade do sangue na aorta; VTI: integral tempo-velocidade; FE: fração de ejeção; % ENC: porcentagem de encurtamento; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 3. Dados de função diastólica pelo ecocardiograma.

Dieta	Fumo	N	TRIVc (ms/bpm)	Onda E (cm/s)	Onda A (cm/s)	E/A
VD0	N EFC	8	0,080±1,5	81±5	62±22	1,4±0,16
VD1	N EFC	8	0,066±1,7	71±5	61±16	1,3±0,16
VD3	N EFC	8	0,072±1,5	80±5	61±19	1,4±0,16
VD0	EFC	12	0,074±1,3	81±4	58±12	1,5±0,13
VD1	EFC	10	0,084±1,4	78±4	55±15	1,5±0,14
VD3	EFC	8	0,082±1,6	69±5	54±23	1,5±0,16
P1 (EFC)			0,162	0,668	0,250	0,271
P2 (VD)			0,937	0,269	0,827	0,926
P3 (EFCxVD)			0,146	0,185	0,791	0,683

VD: vitamina D; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca; E/A: relação entre onda E e onda A. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 4. Dados estruturais pelo ecocardiograma.

Dieta	Fumo	N	VSVE (mm)	AE (mm)	Ao (mm)	AE/Ao (mm/mm)	DDVE (mm)	PPVE (mm)	DSVE (mm)	Área AE (cm ²)	Área AD (cm ²)	MVE (mg)	IMVE (mg/g)	PPVE/DDVE (mm/mm)
VD0	N EFC	8	0,22±0,006	4,0±0,11	3,5±0,09	1,14±0,04	6,7±0,17	1,3±0,06	2,7±0,2	0,17±0,011	0,14±0,0096	539±42,84	1,59±0,12	0,19±0,01
VD1	N EFC	8	0,22±0,006	3,7±0,11	3,4±0,09	1,09±0,04	6,7±0,17	1,3±0,06	2,7±0,2	0,18±0,011	0,16±0,0096	524±42,84	1,53±0,12	0,19±0,01
VD3	N EFC	8	0,24±0,006	4,0±0,11	3,5±0,09	1,17±0,04	6,5±0,17	1,2±0,06	2,5±0,2	0,19±0,011	0,15±0,0096	462±42,84	1,40±0,12	0,19±0,01
VD0	EFC	12	0,23±0,005	3,9±0,09	3,5±0,08	1,12±0,03	6,8±0,15	1,4±0,05	2,8±0,18	0,20±0,009	0,15±0,0081	621±36,54	1,83±0,10	0,2±0,008
VD1	EFC	10	0,23±0,006	3,9±0,1	3,4±0,08	1,16±0,03	6,6±0,15	1,3±0,05	2,7±0,17	0,19±0,01	0,15±0,0081	531±38,32	1,60±0,11	0,2±0,009
VD3	EFC	8	0,24±0,006	4,0±0,11	3,4±0,09	1,18±0,04	5,7±0,17	1,4±0,06	2,9±0,2	0,20±0,011	0,16±0,0096	656±42,84	1,95±0,12	0,21±0,01
P1 (EFC)			0,351	0,569	0,856	0,572	0,221	0,009	0,294	0,086	0,454	0,007	0,004	0,077
P2 (VD)			0,063	0,139	0,612	0,396	0,953	0,444	0,890	0,429	0,272	0,433	0,438	0,700
P3 (EFCxVD)			0,859	0,271	0,962	0,465	0,254	0,197	0,556	0,752	0,637	0,093	0,130	0,639

VD: vitamina D; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; Ao: diâmetro da aorta; AE/Ao: relação entre diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; PPVE: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; AD: átrio direito; MVE: massa do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; PPVE/DDVE: relação entre espessura e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo;. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 5. Dados estruturais do ecocardiograma corrigidos pelo comprimento da tibia.

Dieta	Fumo	N	AE/Tibia (mm/mm)	DDVE/Tibia (mm/mm)	DSVE/Tibia (mm/mm)
VD0	N EFC	8	0,102±0,003	0,17±0,004	0,069±0,005
VD1	N EFC	8	0,093±0,003	0,17±0,004	0,069±0,005
VD3	N EFC	8	0,104±0,003	0,17±0,004	0,064±0,005
VD0	EFC	12	0,102±0,002	0,18±0,003	0,073±0,004
VD1	EFC	10	0,102±0,002	0,17±0,004	0,071±0,004
VD3	EFC	8	0,104±0,003	0,18±0,004	0,075±0,005
P1 (EFC)			0,192	0,033	0,174
P2 (VD)			0,047	0,684	0,920
P3 (EFCxVD)			0,140	0,394	0,632

VD: vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; AE: átrio esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 6. Dados morfométricos.

Dieta	Fumo	N	PVE (mg)	PA (mg)	PVE/tíbia (mg/mm)	PVD/tíbia (mg/mm)	PA/tíbia (mg/mm)	Água pulmão (%)	Água fígado (%)
VD0	N EFC	8	682±20	3,7±0,11	176±6	171±10	11±5	44±3	28±0,25
VD1	N EFC	8	701±20	3,5±0,10	178±6	184±10	9±2	46±3	30±0,25
VD3	N EFC	8	671±20	3,3±0,11	174±6	164±10	8±3	43±3	31±0,25
VD0	EFC	12	697±17	3,5±0,09	182±5	182±9	9±2	47±2	29±0,21
VD1	EFC	10	671±18	3,7±0,10	174±5	199±9	11±2	52±2	36±0,22
VD3	EFC	8	714±20	3,6±0,11	187±6	178±10	10±2	47±3	31±0,25
P1 (EFC)			0,536	0,482	0,244	0,104	0,209	0,042	0,247
P2 (VD)			0,941	0,272	0,709	0,112	0,551	0,295	0,269
P3 (EFCxVD)			0,184	0,031	0,311	0,971	0,031	0,835	0,388

VD: vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PA: peso dos átrios; PVD: peso do ventrículo direito. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 7. Estresse oxidativo no tecido cardíaco.

Dieta	Fumo	N	Hidroperóxido de lipídeo (nmol/g tecido)	Catalase (μ mol/mg proteína)	Glutathiona peroxidase (nmol/mg tecido)
VD0	N EFC	8	336,7 $\pm$ 25,8	1,1 $\pm$ 0,06	37,8 $\pm$ 2,9
VD1	N EFC	8	438,6 $\pm$ 25,8	0,9 $\pm$ 0,06	36,8 $\pm$ 2,9
VD3	N EFC	8	359,0 $\pm$ 25,8	0,9 $\pm$ 0,06	46,2 $\pm$ 2,9
VD0	EFC	12	716,0 $\pm$ 22,1	0,6 $\pm$ 0,05	29,9 $\pm$ 2,5
VD1	EFC	10	518,7 $\pm$ 25,8	0,8 $\pm$ 0,06	42,6 $\pm$ 2,9
VD3	EFC	8	425,9 $\pm$ 28,0	0,8 $\pm$ 0,05	41,3 $\pm$ 3,2
P1 (EFC)			<0,001	<0,001	0,335
P2 (VD)			<0,001	0,969	0,006
P3 (EFCxVD)			< 0,001	< 0,001	0,056

VD: vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Tabela 8. Dosagens sanguíneas de cálcio, fósforo e vitamina D₃.

Dieta	Fumo	N	Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	Vitamina D3*
VD0	N EFC	5	8,82±0,27	6,27±0,44	5,25±0,14
VD1	N EFC	5	8,64±0,24	6,11±0,39	5,79±0,12
VD3	N EFC	5	8,8±0,24	7,62±0,39	6,05±0,14
VD0	EFC	5	9,15±0,36	6,26±0,22	5,58±0,14
VD1	EFC	5	9,22±0,24	6,53±0,39	5,85±0,14
VD3	EFC	5	8,54±0,24	5,99±0,39	6,21±0,14
P1 (EFC)			0,287	0,220	0,116
P2 (VD)			0,389	0,339	<0,001
P3 (EFCxVD)			0,221	0,039	0,595

VD: vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; Vitamina D3: metabólito 25-hidroxicoalciferol. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. * Dados transformados para teste ANOVA de duas vias: logarítimo neperiano da concentração de VD em ng/ml.

Tabela 9. Avaliação da produção de citocinas.

Dieta	Fumo	N	TNF- α (pg/ml)	INF- γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
VD0	N EFC	6	2,9 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,3	15,4 $\pm$ 5,4
VD1	N EFC	6	2,8 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3	18,9 $\pm$ 5,4
VD3	N EFC	6	3,1 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,3	22,7 $\pm$ 5,4
VD0	EFC	6	2,6 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3	13,6 $\pm$ 4,4
VD1	EFC	6	3,4 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,3	23,4 $\pm$ 4,9
VD3	EFC	6	3,0 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	17,7 $\pm$ 5,4
P1 (EFC)			0,709	0,630	0,862
P2 (VD)			0,460	0,256	0,379
P3 (EFCxVD)			0,370	0,149	0,656

VD: vitamina D; N EFC: não exposição à fumaça do cigarro; EFC: exposição à fumaça do cigarro; VD0: dieta sem suplementação; VD1: dieta com suplementação de 1000UI/kg de vitamina D; VD3: dieta com suplementação de 3000UI/kg de vitamina D; P1: valor de p para o fator EFC; P2: valor de p para o fator VD; P3: valor de p para interação entre fatores EFC e VD; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; INF- γ : interferon gama. Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

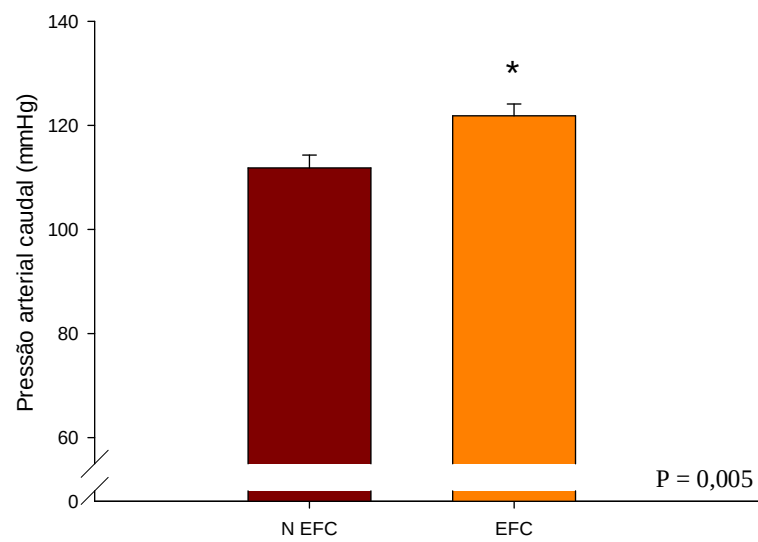


Figura 1. Pressão arterial caudal.
N EFC = animais sem exposição a fumaça do cigarro; EFC = animais com exposição a fumaça do cigarro. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator EFC.

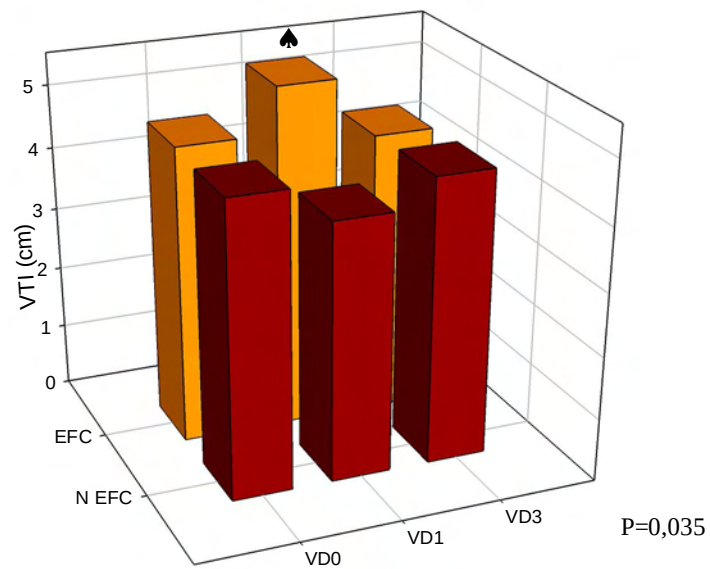


Figura 2. Variável integral tempo velocidade (VTI).

N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; interação estatisticamente significante entre VD e EFC ($p < 0,05$); ♠: $p < 0,05$ em relação a VD1-NEFC.

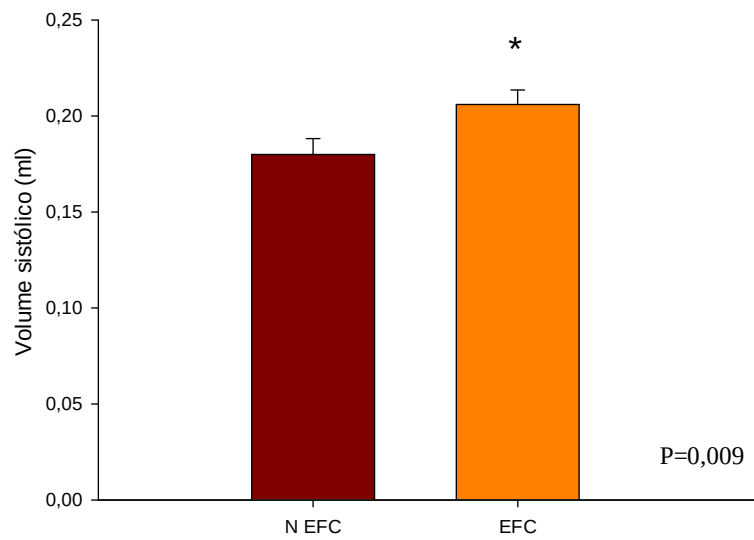


Figura 3. Volume sistólico (VS).

N EFC = animais sem exposição a fumaça do cigarro; EFC = animais com exposição a fumaça do cigarro. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator EFC.

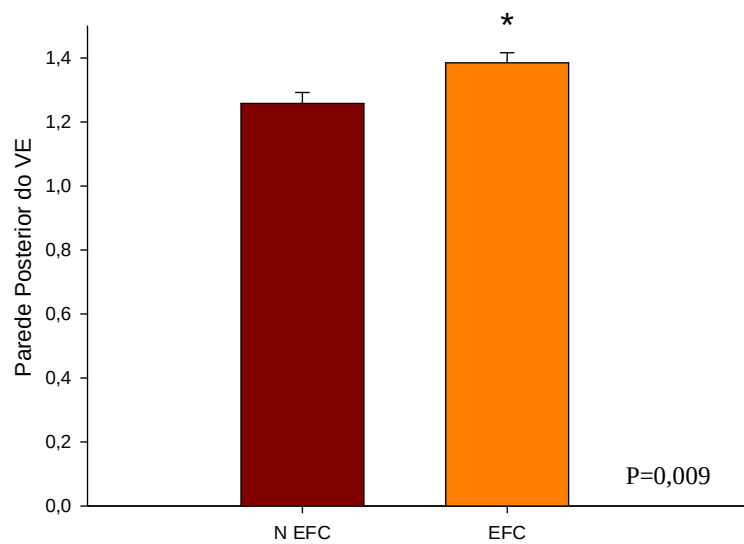


Figura 4. Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo (PPVE).
N EFC = animais sem exposição a fumaça do cigarro; EFC = animais com exposição a fumaça do cigarro. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator EFC.

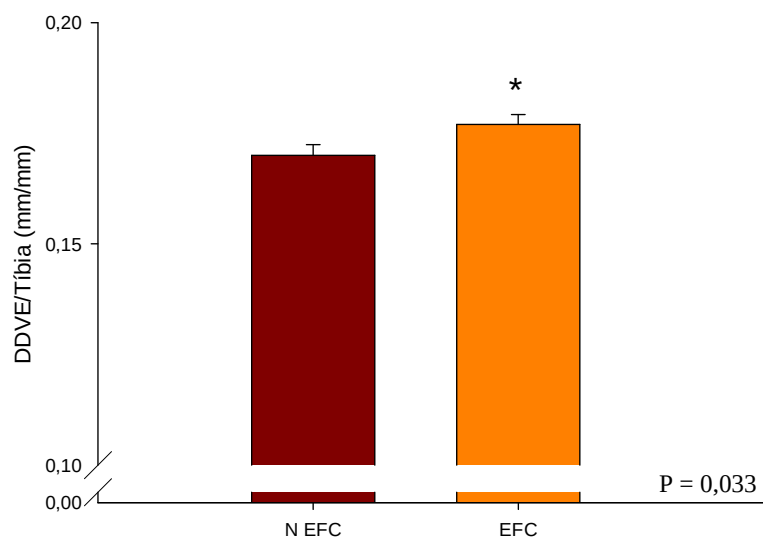


Figura 5. Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo corrigido pela Tíbia (DDVE). N EFC = animais sem exposição a fumaça do cigarro; EFC = animais com exposição a fumaça do cigarro. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator EFC.

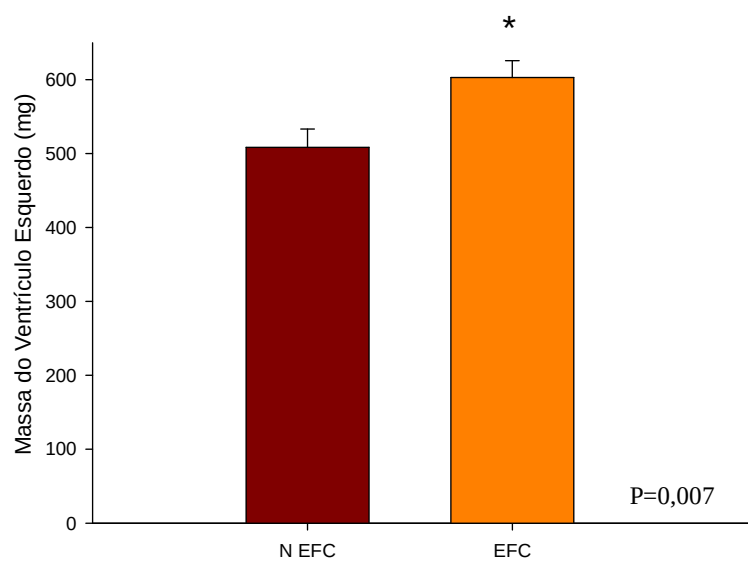


Figura 6. Massa do ventrículo esquerdo (MVE).

N EFC = animais sem exposição a fumaça do cigarro; EFC = animais exposição a fumaça do cigarro. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator EFC.

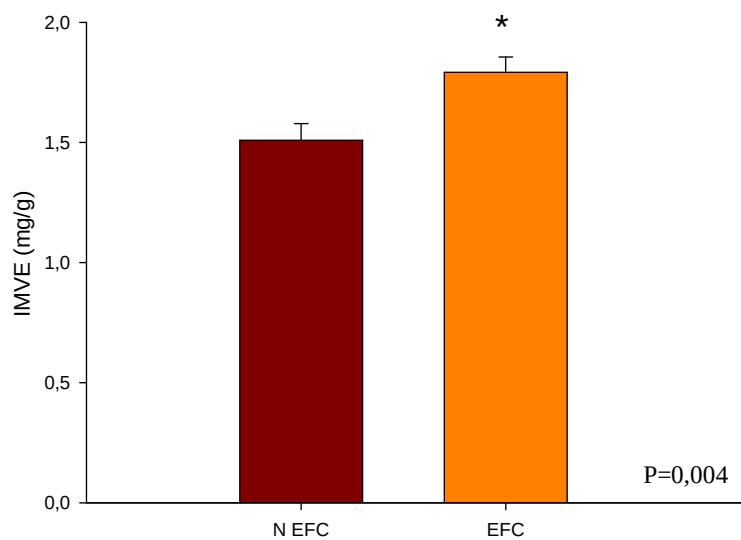


Figura 7. Índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE).
N EFC = animais sem exposição a fumaça do cigarro; EFC = animais com exposição a fumaça do cigarro. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator EFC.

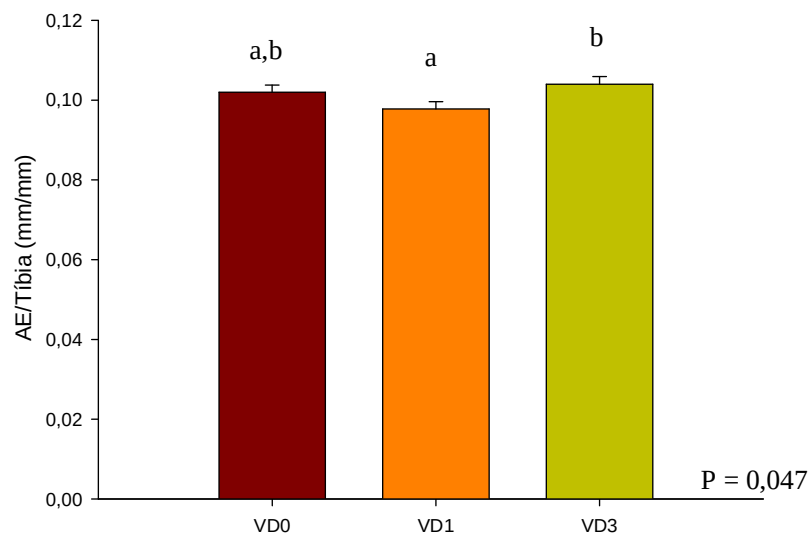


Figura 8. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pela Tíbia (AE/t).
VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator VD.

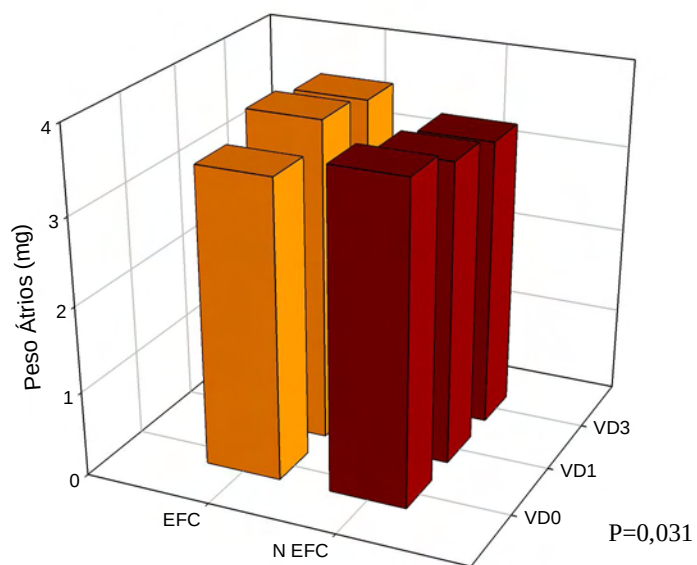


Figura 9. Peso dos átrios (PA).

N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; interação estatisticamente significante entre VD e EFC ($p < 0,05$).

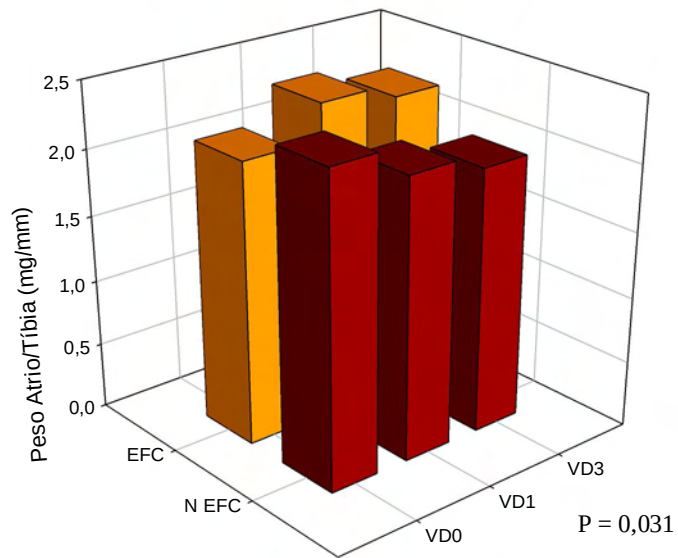


Figura 10. Peso dos átrios corrigido pela tibia (PA/tibia).

N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; interação estatisticamente significante entre VD e EFC ($p < 0,05$).

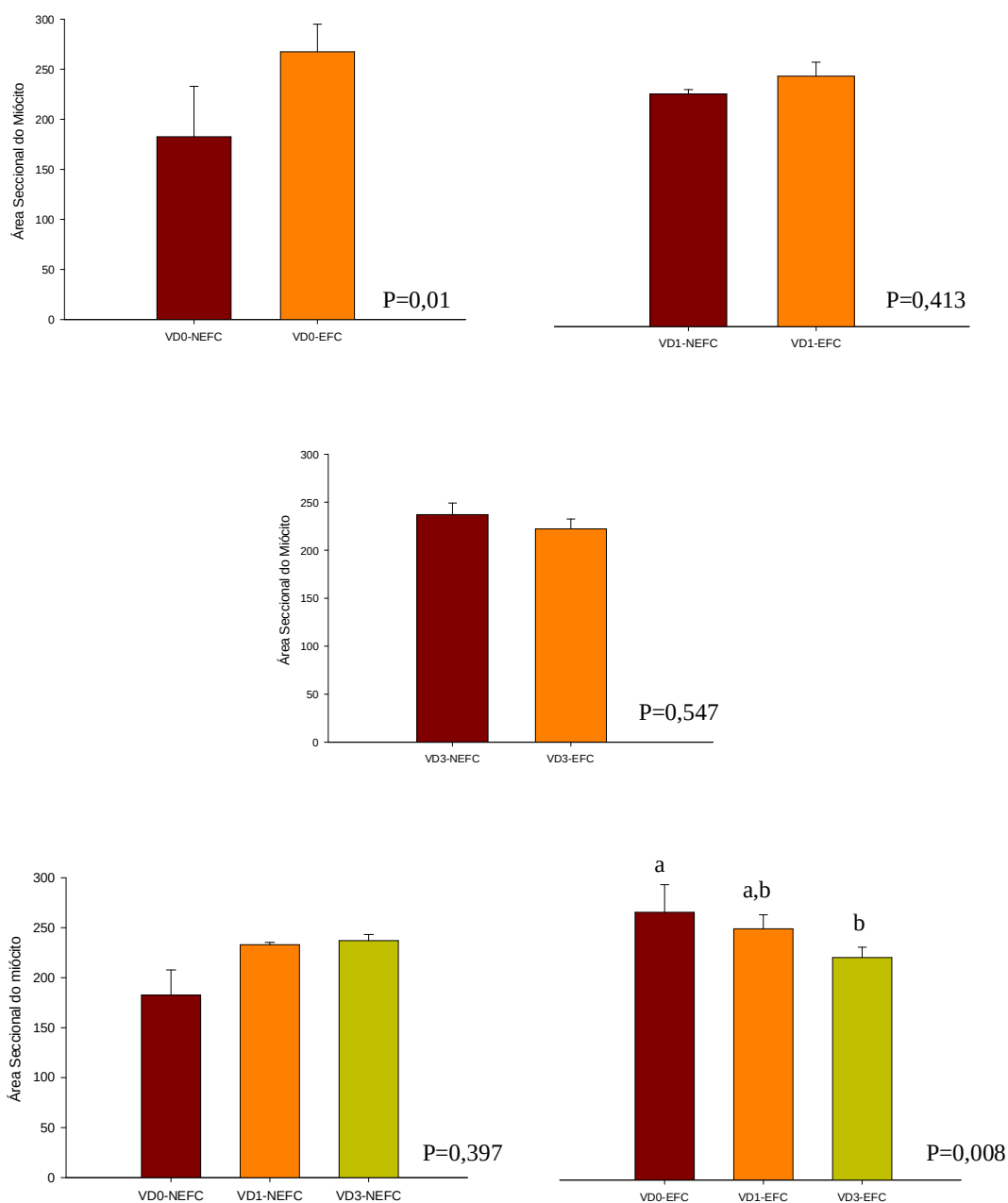


Figura 11. Área seccional do miócito (μm_2).

VD0-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e sem suplementação de vitamina D; VD0-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e sem suplementação de vitamina D; VD1-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e com suplementação de 1000UI de vitamina D; VD1-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e com suplementação de 1000UI de vitamina D; VD3-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e com suplementação de 3000UI de vitamina D; VD3-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e com suplementação de 3000UI de vitamina D. ANOVA de uma via, teste t Student; diferença estatística significativa $p \leq 0,01$ por Bonferroni.

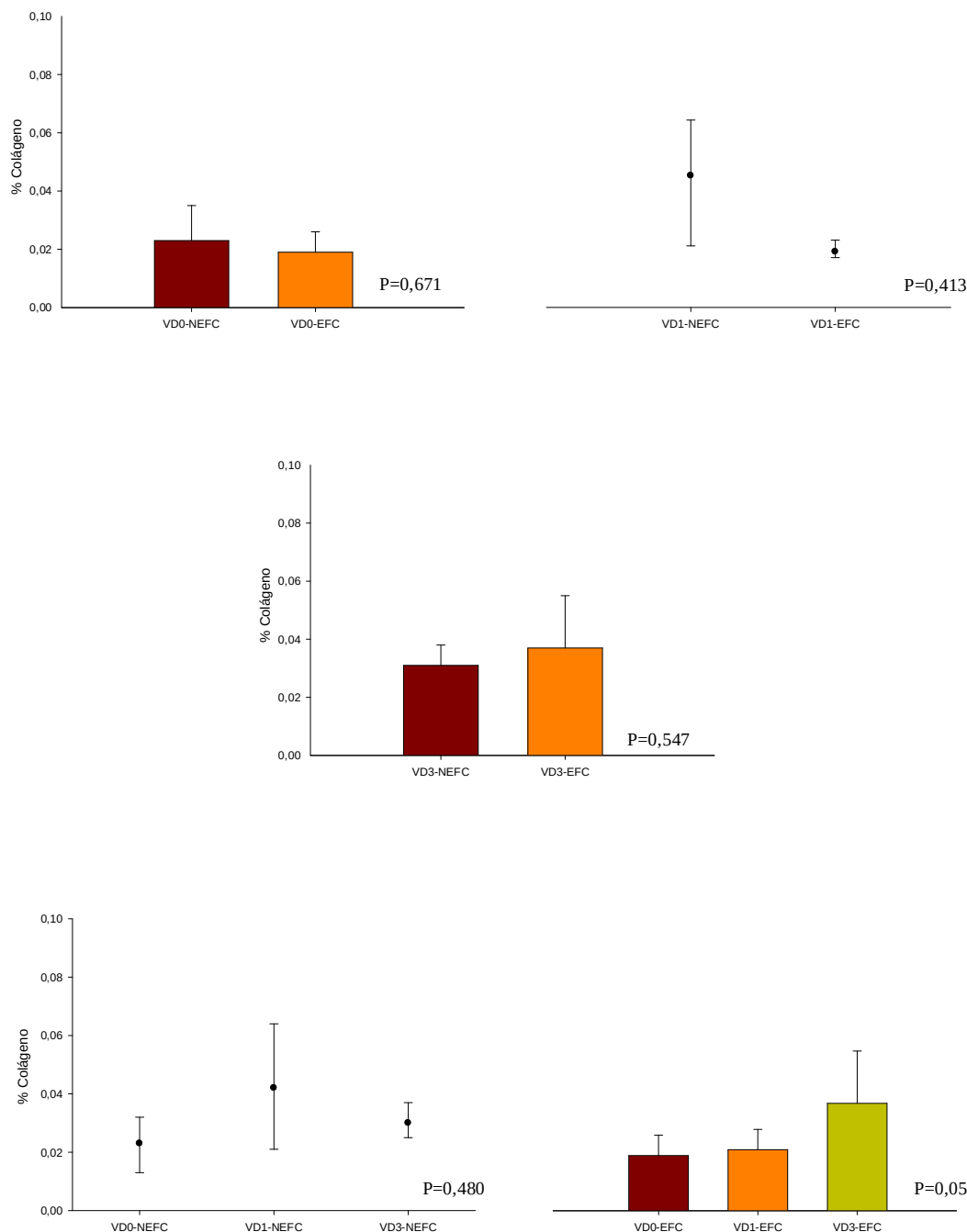


Figura 12. Porcentagem de Colágeno.

VD0-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e sem suplementação de vitamina D; VD0-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e sem suplementação de vitamina D; VD1-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e com suplementação de 1000UI de vitamina D; VD1-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e com suplementação de 1000UI de vitamina D; VD3-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e com suplementação de 3000UI de vitamina D; VD3-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e com suplementação de 3000UI de vitamina D. ANOVA de uma via; diferença estatística significativa $p \leq 0,01$ por Bonferroni.

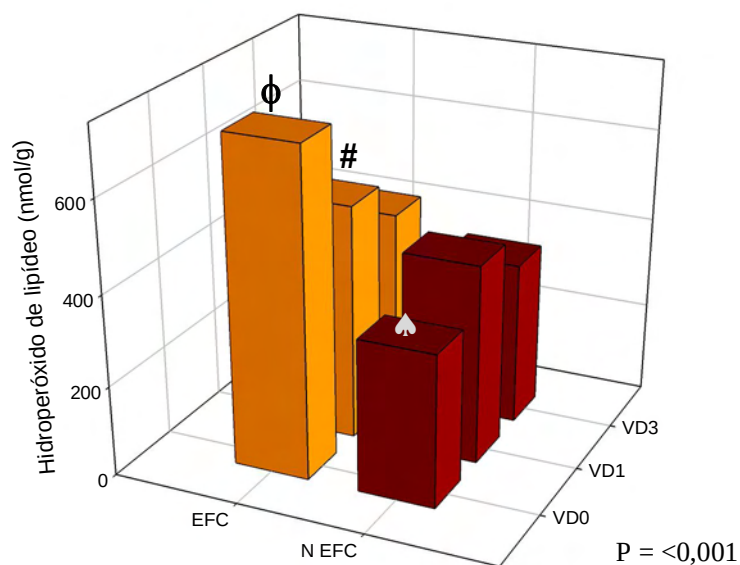


Figura 13. Concentração de Hidroperóxido de Lipídeo no Tecido Cardíaco. N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; interação estatisticamente significativa entre VD e EFC ($p < 0,05$); ♠: $p < 0,05$ em relação a VD1x N EFC; ϕ : $p < 0,05$ em relação a VD0-NEFC, VD1-EFC e VD3-EFC; #: $p < 0,05$ em relação a VD3-EFC.

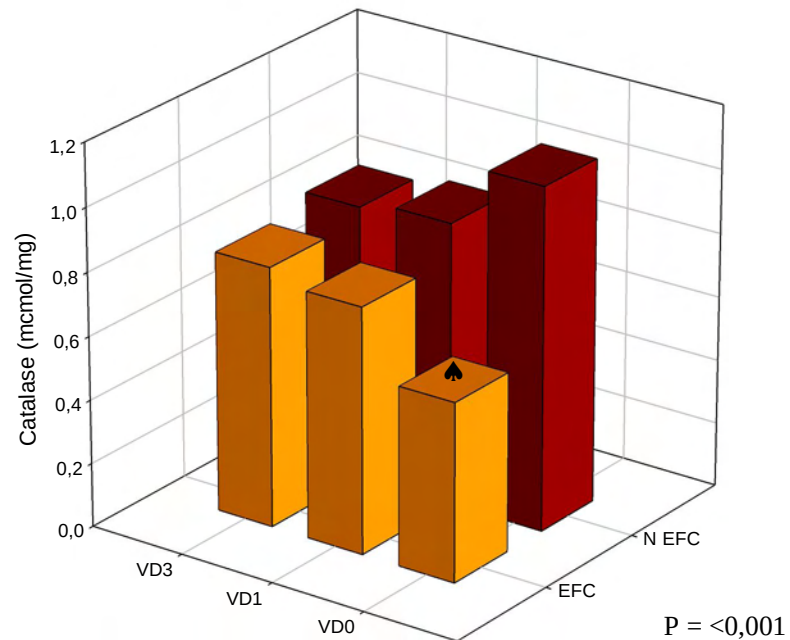


Figura 14. Atividade de Catalase no Tecido Cardíaco.

N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; interação estatisticamente significativa entre VD e EFC ($p < 0,05$); ▲: $p < 0,05$ em relação a VD0-NEFC, VD1-EFC e VD3-EFC.

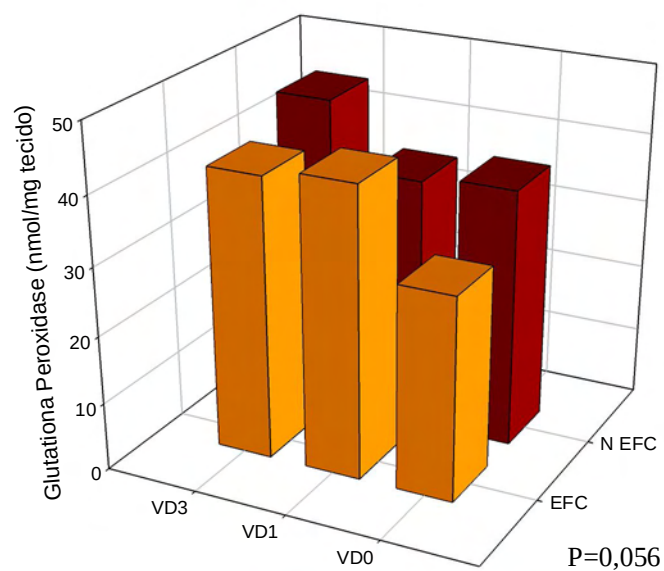


Figura 15. Atividade de Glutathione Peroxidase no Tecido Cardíaco.

N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias.

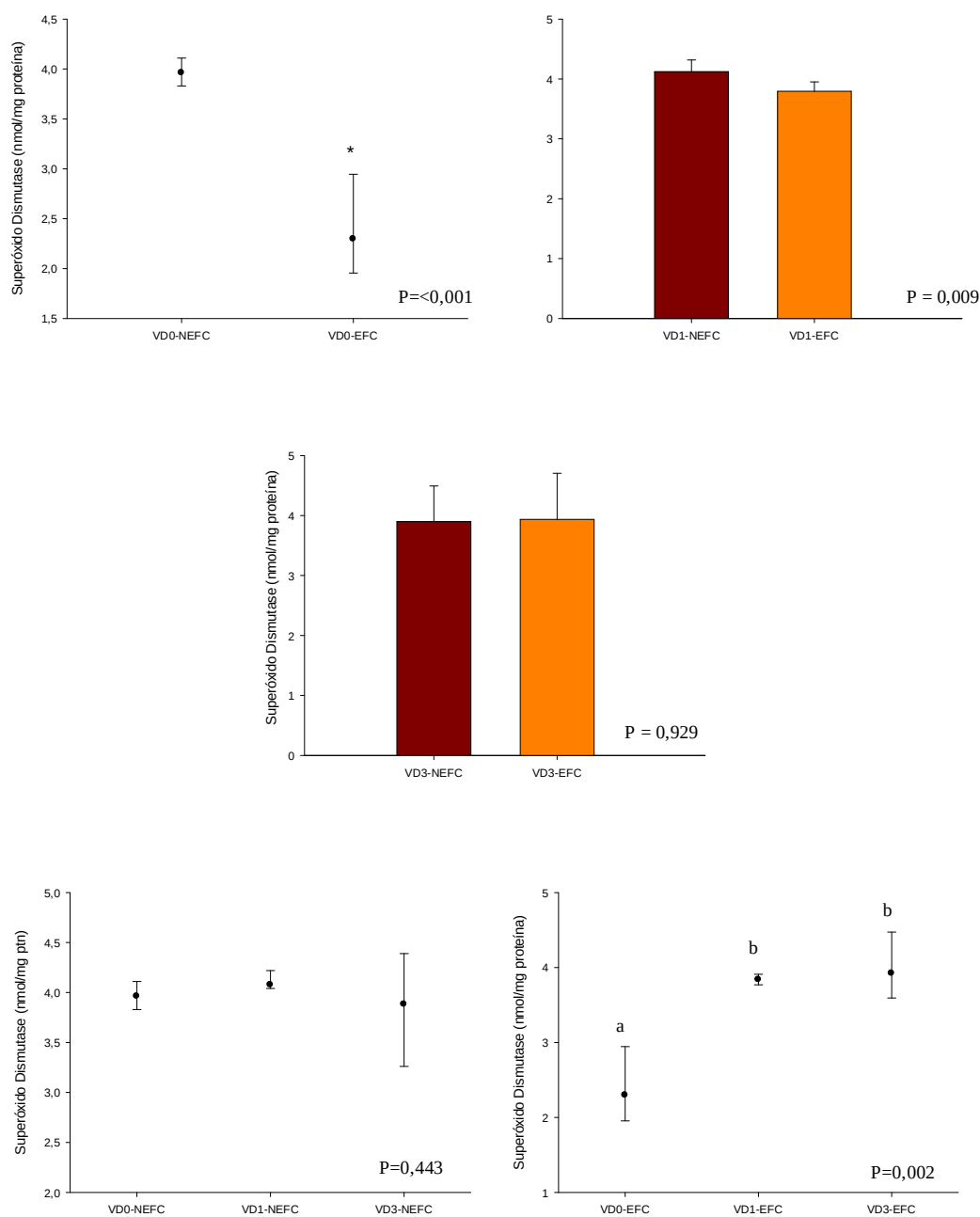


Figura 16. Atividade de Superóxido Dismutase.

VD0-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e sem suplementação de vitamina D; VD0-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e sem suplementação de vitamina D; VD1-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e com suplementação de 1000UI de vitamina D; VD1-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e com suplementação de 1000UI de vitamina D; VD3-NEFC: grupo sem exposição à fumaça do cigarro e com suplementação de 3000UI de vitamina D; VD3-EFC: grupo exposto à fumaça do cigarro e com suplementação de 3000UI de vitamina D. ANOVA de uma via, teste t Student; diferença estatística significativa $p \leq 0,01$ por Bonferroni.

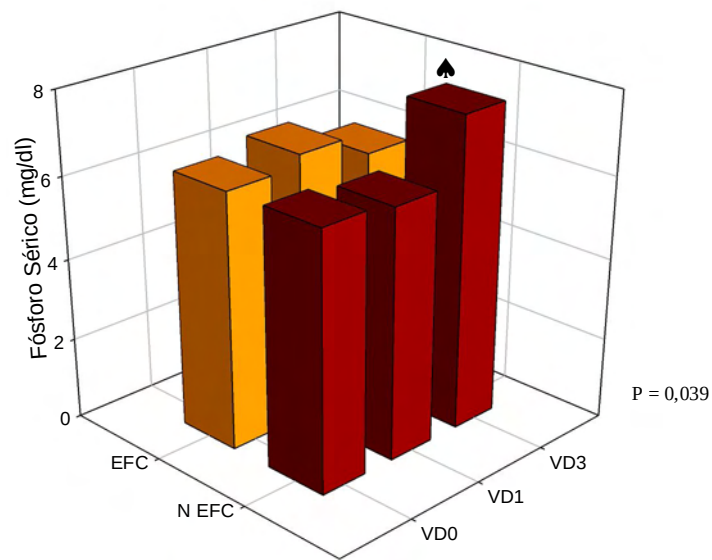


Figura 17. Fosforo sérico.

N EFC = não exposição a fumaça do cigarro; EFC = exposição a fumaça do cigarro; VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; interação estatisticamente significativa entre VD e EFC ($p < 0,05$); ♠: $p < 0,05$ em relação a VD1-NEFC e VD3-EFC.

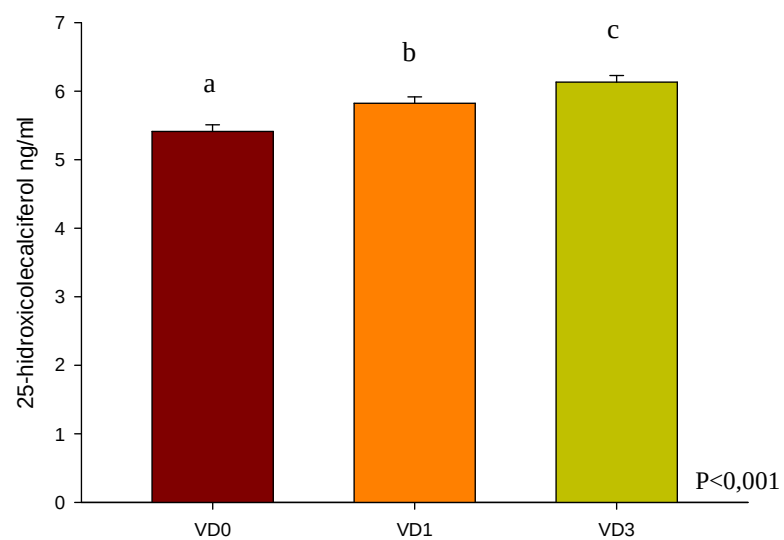


Figura 18. Concentração sérica de 25-hidroxivitamina D.
VD0 = sem suplementação de vitamina D; VD1 = suplementação com 1000UI/kg de vitamina D; VD3 = suplementação com 3000UI/kg de vitamina D. ANOVA de duas vias; $p < 0,05$ para fator VD.

Discussão

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da vitamina D no processo de remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro. Nossos dados indicam que a suplementação de vitamina D não atenuou as alterações ecocardiográficas causadas pela fumaça do cigarro no protocolo de 2 meses de exposição, mas reverteu a hipertrofia do miócito com a maior dose e protegeu o coração do dano oxidativo de maneira dose dependente. A vitamina D não causou alterações nos grupos sem exposição à fumaça do cigarro.

Remodelação cardíaca e exposição à fumaça do cigarro

Em nosso estudo, observou-se que a exposição à fumaça do cigarro causou alterações na estrutura cardíaca, com aumento da espessura da parede posterior do VE, massa do VE, índice de massa do VE, diâmetro diastólico do VE e aumento da área seccional do miócito, além da alteração do perfil oxidativo, com maior concentração de hidroperóxido de lipídeo e depleção das enzimas antioxidantes catalase, SOD e GSH-Px. Também foi observado aumento significativo na pressão arterial dos animais fumantes em relação aos não fumantes. Essas observações estão de acordo com estudos prévios, que descreveram aumento da espessura da parede posterior e índice de massa do VE, maior diâmetro diastólico do VE e elevação da pressão arterial após a exposição à fumaça do cigarro ^{4, 8, 9, 64, 65}.

É bem conhecido que a exposição à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e função cardíaca comprometida ^{4, 8, 9, 11, 53, 55, 64, 65}. As alterações induzidas pela fumaça do cigarro se caracterizam por hipertrofia de miócitos, aumento da cavidade ventricular e redução da função sistólica e diastólica ^{8, 53}.

A remodelação cardíaca pode ser definida como mudanças genéticas, estruturais e bioquímicas após agressão cardíaca, que resulta na deterioração da capacidade funcional do coração. Ocorre em resposta a diversos estímulos, como hipertensão, ativação de sistemas neurohumorais e mutações genéticas, sendo inicialmente compensatório, uma vez que é necessário para adaptação do coração às alterações pós-injúria⁵³. Entre os diversos fatores de agressão ao coração, destaca-se a exposição ao cigarro³⁹.

Alguns fatores podem desempenhar papel fisiopatológico na progressão da disfunção ventricular no coração remodelado, destacando-se ³⁹:

- *Fibrose*: o tecido colágeno é um importante modulador tanto da função cardíaca diastólica quanto da função sistólica. As fibras de colágeno encontradas no interstício do tecido cardíaco são predominantemente dos tipos I e III (95% do colágeno total). Em condições patológicas, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular^{39, 66, 67}. No presente trabalho, não foi encontrado aumento significativo do colágeno após a exposição à fumaça do cigarro. Da mesma forma, estudo anterior mostrou que não houve diferença na porcentagem de colágeno entre animais expostos e não expostos ao cigarro, apesar das alterações cardíacas encontradas nos animais fumantes⁶⁴.

-*Inflamação*: as citocinas têm sido descritas por desempenhar papel na progressão da disfunção ventricular e na consequente piora da insuficiência cardíaca. Experimento com ratos transgênicos com produção excessiva de TNF- α mostraram o desenvolvimento de cardiomiopatia nesses animais, porém o mecanismo pelo qual as citocinas promovem alterações na função miocárdica ainda está sob investigação. Alterações na resposta ao estímulo beta-adrenérgico, alterações no equilíbrio do cálcio intracelular, além de alterações na estrutura miocárdica, como hipertrofia de miócitos, estímulo à apoptose e fibrose miocárdica, são possíveis mecanismos pelos quais as

citocinas promovem alterações estruturais e funcionais do coração⁴⁰. No presente trabalho, não foram observadas alterações na produção de citocinas com a exposição à fumaça do cigarro, em concordância com estudo anterior que não evidenciou alterações nas concentrações de INF- γ e TNF- α em animais expostos à fumaça do cigarro⁶⁸.

- *Hipertrofia e alterações geométricas*: um dos principais mecanismos pelos quais o miócito se adapta a um determinado estímulo é o processo de hipertrofia. Miócitos cardíacos respondem a estímulos de crescimento por meio da hipertrofia das células miocárdicas existentes ao invés de aumentar seu número, como na hiperplasia, uma vez que não tem capacidade mitótica²⁸. Atualmente, é aceito que mudanças geométricas poderiam mudar as condições de carga a que o coração é submetido e comprometer a função global do coração⁶⁷. No presente trabalho, foram observadas alterações na cavidade, aumento da massa e de espessura do VE e aumento significativo da ASM, em conformidade com estudos anteriores que evidenciaram as mesmas alterações após a exposição à fumaça do cigarro^{8, 55}.

- *Estresse oxidativo*: o estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs), e as reservas antioxidantes do miocárdio³⁸. Estudos experimentais têm mostrado que o estresse oxidativo pode induzir mudanças no tecido cardíaco que contribuem com a remodelação cardíaca e afetar a matriz extracelular e proteínas contráteis por meio da lipoperoxidação, modificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e oxidação de proteínas^{38, 63, 67, 69}. No presente estudo, a exposição à fumaça do cigarro causou aumento do estresse oxidativo, com maior geração de hidroperóxido de lipídeo, produto da lipoperoxidação, e depleção das defesas antioxidantes, sugerindo a participação do estresse oxidativo nas alterações encontradas. Estudos clínicos e experimentais sugerem que o estresse oxidativo e as EROs constituem mecanismo envolvido na causa de

doenças cardiovasculares associadas ao tabagismo e desempenha papel crítico na remodelação ventricular após injúria cardíaca^{70, 71}. Estudos anteriores em ratos expostos à fumaça do cigarro relataram aumento de hidroperóxido de lipídeo no tecido hepático e redução da relação entre glutathione reduzida e oxidada, sugerindo a participação do estresse oxidativo neste modelo^{10, 70}. A fumaça do cigarro pode ativar enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase, principais fontes de radicais superóxido, além de induzir estresse mitocondrial por prejudicar a função da mitocôndria, no coração e em outros tecidos⁷². Zornoff e colaboradores descreveram alterações mitocondriais no coração após a exposição ao cigarro¹⁰.

Assim, é possível concluir que a exposição à fumaça do cigarro levou à remodelação cardíaca nos animais, caracterizada por hipertrofia e aumento do estresse oxidativo no coração. Porém os mecanismos responsáveis por essas alterações cardíacas induzidas pelo fumo não estão totalmente elucidados^{8, 53}. Existem alguns mecanismos propostos pelos quais os componentes da fumaça do cigarro, como alcatrão, monóxido de carbono, nicotina e radicais livres, podem causar danos ao coração, entre eles hipertrofia, hipóxia, lesão endotelial e peroxidação lipídica^{4, 10, 63, 64, 72, 73}. Uma possibilidade seria o efeito hemodinâmico do cigarro, como vasoconstrição e aumento da pressão⁵³. Estudos prévios com exposição à fumaça do cigarro mostraram aumento significativo da pressão arterial em animais fumantes^{9, 53, 68, 74}. Esses dados sugerem que a ativação de fatores neurohormonais pode, em parte, explicar as alterações estruturais encontradas no presente trabalho. Assim, para verificar a influência da pressão arterial nas variáveis cardíacas estudadas, foi realizado teste ANCOVA, porém a pressão não mostrou ação significativa nas demais variáveis estudadas. Concluímos que outros mecanismos devem estar envolvidos no processo de remodelação induzida pela fumaça do cigarro, como por exemplo, aumento do estresse oxidativo.

Assim, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de remodelação é de grande importância, pois o bloqueio dos moduladores possibilita a prevenção ou atenuação de suas consequências na estrutura e função cardíacas. Neste sentido, têm-se destacado o uso de nutrientes que possam modular processos inflamatórios, proliferação celular, apoptose e geração de radicais livres, entre eles a vitamina D⁷⁵.

Exposição à fumaça do cigarro e Vitamina D

No presente trabalho, a suplementação de colecalciferol via dieta foi eficiente, uma vez que elevou a concentração de 25-hidroxicolecalciferol nos animais tratados. Além disso, a resposta à suplementação foi dose dependente.

A suplementação de vitamina D reduziu a área seccional do miócito e alterou o perfil oxidativo nos animais expostos à fumaça de cigarro. A suplementação com 3000 UI preveniu a hipertrofia dos miócitos após a exposição à fumaça do cigarro e o tratamento com ambas as doses evitou a peroxidação lipídica e reverteu a depleção de enzimas antioxidantes de forma dose dependente. Porém, neste protocolo de 2 meses, o tratamento com a vitamina não atenuou as alterações ecocardiográficas de estrutura após a exposição ao cigarro.

Recentemente, a vitamina D tem sido destacada por seu papel em outros sistemas do organismo, além da saúde óssea. A vitamina D pode ser obtida a partir de fontes alimentares ou sintetizada pela pele após reação fotoquímica por raios ultravioleta B (UVB). Para se tornar ativa, necessita de duas hidroxilações, nas ligações

25- e 1α -, no fígado e rins, respectivamente. Seu transporte é feito pela proteína ligadora de vitamina D⁷⁶.

Atualmente, a vitamina D é considerada um hormônio secoesteróide com ação genômica mediada por um receptor nuclear, denominado receptor nuclear de vitamina D ou VDR. O VDR se liga a sequências específicas do DNA como um heterodímero com RXR e a um maquinário transcricional basal ligante dependente (TFIIA) e independente (TFIIB). Genes com elementos de resposta para vitamina D influenciam direta ou indiretamente o ciclo, a proliferação e a diferenciação celulares, bem como a apoptose⁷⁶. Os receptores VDR foram identificados em diversos tecidos, incluindo miócitos cardíacos³². Foi mostrado também a presença da 1α -hidroxilase e 24-hidroxilase no miocárdio de ratos Wistar, enzimas necessárias para ativação da vitamina D⁴⁶. O VDR é regulado por estímulos pro hipertrofos e tem sido associado a expressão de outros genes hipertrofos⁷⁷.

A vitamina D tem sido considerada importante mediador em doenças cardiovasculares, e sua suplementação pode reduzir o risco para essas doenças, inclusive insuficiência cardíaca^{46, 77, 78}. O tratamento com vitamina D indica papel protetor no sistema cardiovascular após agressão ao coração⁷⁷. Estudos *in vitro* sugeriram atenuação da hipertrofia em miócitos tratados com endotelina e inibição da proliferação celular em miócitos HL-1, por ação direta no tecido cardíaco^{28, 32, 35}. A suplementação com vitamina D ativa em ratos Dahl sensíveis a sal foi associada à menor peso cardíaco e redução da massa do VE, menor espessura da parede posterior e pressão diastólica final e aumento da fração de encurtamento³⁴.

No presente trabalho, foi evidenciado hipertrofia e aumento da pressão arterial após a exposição ao cigarro. A hipertrofia pode ser ativada em situações de sobrecarga hemodinâmica, devido em parte a tensão mecânica sobre os cardiomiócitos e em parte

pela ativação neuroendócrina reflexa (como atividade adrenérgica ou sistema renina-angiotensina), que acompanha a sobrecarga²⁸. A maior dose da vitamina D reduziu significativamente a área seccional do miócito após a exposição à fumaça do cigarro, em concordância ao observado por outros autores em estudos prévios. Kong e colaboradores (2010) relataram redução da espessura da parede posterior do VE pelo ecocardiograma e por histologia seccional do VE, bem como redução do diâmetro de cardiomiócitos em ratos espontaneamente hipertensos após o tratamento com vitamina D⁷⁹. Ensaios clínicos em pacientes em hemodiálise tratados com vitamina D mostraram redução da hipertrofia do VE⁸⁰. O efeito anti hipertrófico da vitamina D pode ser explicado em parte pela supressão do sistema renina-angiotensina e pela ação da vitamina na proliferação e diferenciação celulares³⁵. Porém, no presente trabalho, a suplementação com vitamina D não atenuou as alterações na estrutura cardíaca pelo ecocardiograma, nem reduziu a pressão arterial nos animais expostos ao cigarro. Uma vez que a pressão arterial e a renina são moduladores da remodelação cardíaca⁷⁷ e que a vitamina é considerada regulador negativo da renina^{36, 79, 81}, esperava-se que a suplementação da vitamina D reduzisse a pressão e atenuasse as alterações na parede ventricular evidenciadas pelo ecocardiograma. Uma possível explicação é o tempo de suplementação, que pode não ter sido suficiente para promover as alterações ecocardiográficas. Esses achados também sugerem que a vitamina D pode atuar na função cardíaca por outros mecanismos.

Assim, existem evidências de que a vitamina D participe de outros processos moduladores da remodelação cardíaca, como o estresse oxidativo⁴⁴. O estresse oxidativo tem efeito direto na função e estrutura celulares e podem ativar moléculas sinalizadoras na remodelação cardíaca, resultando em fenótipo caracterizado por hipertrofia e apoptose em miócitos cardíacos⁸². A primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo

são as enzimas antioxidantes, principalmente catalase, SOD e GSH-Px⁸³. Existem relatos do papel da vitamina D como antioxidante em tecidos como fígado, rins, pâncreas e também no coração^{43, 84}. Wiseman relatou o efeito protetor de metabólitos da vitamina D na peroxidação lipídica em membranas celulares⁴⁴. Sardar e colaboradores sugeriram ação antioxidante da vitamina D por redução da peroxidação lipídica e aumento nas concentrações hepáticas de glutathione após administração de vitamina D₃ em ratos⁸⁵. Em ratos urêmicos, a terapia com vitamina D melhorou o estresse oxidativo cardíaco, prevenindo a depleção de SOD e GSH-Px⁸⁶. Estes dados vão de encontro aos achados do presente trabalho, em que a suplementação de vitamina D influenciou o estresse oxidativo, com menor peroxidação lipídica e maior atividade das enzimas antioxidantes catalase, SOD e GSH-Px de forma dose dependente após a exposição à fumaça do cigarro. Hoeck e Pall (2010) descrevem que a vitamina D ativa é capaz de reduzir a fluidez das membranas celulares e prevenir a peroxidação ferro-dependente por apoiar a síntese de glutathione, induzir a síntese de GSH-Px e superóxido dismutase manganês-dependente (Mn-SOD)²².

Assim, pelo exposto, foi observado que a vitamina D modula o processo de remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro por sua capacidade antioxidante, atuando também na hipertrofia cardíaca.

Conclusão

A exposição à fumaça de cigarro acarreta remodelação cardíaca. Entretanto a inflamação não participa do processo de remodelação no presente estudo.

A suplementação de vitamina D₃ em ratos atenuou a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça cigarro por ação na hipertrofia e no estresse oxidativo cardíaco de maneira dose dependente.

Referências

Estilo revista New England Journal of Medicine

1. WHO. Report on the global tobacco epidemic 2009: implementing smoke-free environments. In: World Health Organization; 2009:1-568.
2. INCA. Tabagismo: um grave problema de saúde pública. In: All Type Assessoria Editorial Ltda. Rio de Janeiro; 2007.
3. IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: tabagismo. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2008.
4. Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol* 2003;81:221-8.
5. Bullen C. Impact of tobacco smoking and smoking cessation on cardiovascular risk and disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:883-95.
6. Paiva SA, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS, Minicucci MF, Campana AO, Zornoff LA. Beta-carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *J Nutr* 2005;135:2109-13.
7. Counts ME, Hsu FS, Laffoon SW, Dwyer RW, Cox RH. Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39:111-34.
8. Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Camapanha AO, Paiva SA. Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:276-82.
9. Castardeli E, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, Zornoff LA. Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:320-4.

10. Zornoff LA, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Pai-Silva MD, Carvalho RF, Cicogna AC, Padovani CR, Novelli EL, Novo R, Campana AO, Paiva SA. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicological Sciences* 2006;90:259-66.
11. Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, Cicogna AC, Campana AO. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:2242-6.
12. Zhu BQ, Sun YP, Sievers RE, Glantz SA, Parmley WW, Wolfe CL. Exposure to environmental tobacco smoke increases myocardial infarct size in rats. *Circulation* 1994;89:1282-90.
13. Sole MJ, Jeejeebhoy KN. Conditioned nutritional requirements and the pathogenesis and treatment of myocardial failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:417-24.
14. Michos ED, Melamed ML. Vitamin D and cardiovascular disease risk. *Clin Nutr Metab Care* 2008;11:7-12.
15. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men - a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174-80.
16. Mansur AP, Marinho de Souza MF, Timerman A, Avakian SD, Aldrighi JM, Ramires JA. Trends in the risk of death from cardiovascular, cerebrovascular and ischemic diseases in thirteen states of Brazil from 1980 to 1998. *Arq Bras Cardiol* 2006;87:586-93.
17. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin J, D'Agostino RB, Wolf M, Vasan RS. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-11.

18. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83:754-9.
19. Alsafwah S, Laguardia SP, Nelson MD, Battin DL, Newman KP, Carbone LD, Weber KT. Hypovitaminosis D in African Americans residing in Memphis, Tennessee with and without heart failure. *Am J Med Sci* 2008;335:292-7.
20. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz M. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340-9.
21. Maiya S, Sullivan I, Allgrove J, Yates R, Malone M, Brain C, Archer N, Mok Q, Daubeney P, Tulloh R, Burch M. Hypocalcaemia and vitamin D deficiency: an important, but preventable, cause of life-threatening infant heart failure. *Heart* 2008;94:5581-4.
22. Hoeck AD, Pall ML. Will vitamin D supplementation ameliorate diseases characterized by chronic inflammation and fatigue? *Med Hypotheses* 2011;76:208-13.
23. Covic A, Voroneanu L, Goldsmith D. The effects of vitamin D therapy on left ventricular structure and function - are these the underlying explanations for improved CKD patient survival? *Nephron Clin Pract* 2010;116.
24. Weishaar RE, Simpson RU. Vitamin D3 and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest* 1987;79:1706-12.
25. Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin d receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:521-4.

26. Mancuso P, Rahman A, Hershey SD, Dandu L, Nibbelink KA, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 treatment reduces cardiac hypertrophy and left ventricular diameter in spontaneously hypertensive heart failure-prone (cp/+) rats independent of changes in serum leptin. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:559-64.
27. Wu J, Garami M, Cao L, Li Q, Gardner DG. 1,25(OH)2D3 suppresses expression and secretion of atrial natriuretic peptide from cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1995;268:1108-13.
28. Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25(OH)2 vitamin D3, and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1996;97:1577-88.
29. Gezmish O, Tare M, Parkington HC, Morley R, Porrello ER, Bubb KJ, Black MJ. Maternal vitamin D deficiency leads to cardiac hypertrophy in rat offspring. *Reprod Sci* 2010;17:168-76.
30. Przybylski R, McCune S, Hollis B, Simpson RU. Vitamin D deficiency in the spontaneously hypertensive heart failure [SHHF] prone rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:641-6.
31. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:350-9.
32. Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)2-vitamin D3 actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:533-7.
33. Rahman A, Hershey S, Ahmedb S, Nibbelink K, Simpson RU. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:416-9.

34. Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, Shivalingappa V, Ke Q, Chen YS, Rigor DL, Stillman I, Tamez H, Kroeger PE, Wu-Wong RR, Karumanchi SA, Thadhani R, Kang PM. Activated vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16810-5.
35. Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Dekker JM, Marz W. Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol Nutr Food Res* 2010;54:1103-13.
36. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110:229-38.
37. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Gross M. Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotaly nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:778-87.
38. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* 2009;81:482-90.
39. 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.
40. Ramires FA, Fernandes F, Mady C. Ativação neuro-hormonal na disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2002;3:379-85.
41. Yamada S, Zhang XQ, Kadono T, Matsuoka N, Rollins D, Badger T, Rodesch CK, Barry WH. Direct toxic effects of aqueous extract of cigarette smoke on cardiac myocytes at clinically relevant concentrations. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009;236:71-7.
42. Knight-Lozano CA, Young CG, Burow DL, Hu ZY, Uyeminami D, Pinkerton KE, Ischiropoulos H, Ballinger SW. Cigarette smoke exposure and

hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. *Circulation* 2002;105:849-54.

43. Kuzmenko AI, Morozova RP, Nikolenko IA, Korniets G.V, Kholodova YD. Effects of vitamin D3 and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation. *Biochemistry* 1997;62:609-12.

44. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. 1993;326:285-8.

45. Goodwin KD, Ahokas RA, Bhattacharya SK, Sun Y, Gerling IC, Weber KT. Preventing oxidative stress in rats with aldosteronism by calcitriol and dietary calcium and magnesium supplements. *Am J Med Sci* 2006;332:73-8.

46. Mizobuchi M, Nakamura H, Tokumoto M, Finch J, Morrissey J, Liapis H, Slatopolsky E. Myocardial effects of VDR activators in renal failure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:188-92.

47. Vieth R, Kimball S. Vitamin D in congestive heart failure. *Am J Clin Nutr* 2006;83:731-2.

48. Institute for Laboratory Animal Research. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Fourth Revised Edition ed: Institute for Laboratory Animal Research; 1995.

49. Morris GS, Zhou Q, Hegsted M, Keenan MJ. Maternal consumption of a low vitamin D diet retards metabolic and contractile development in the neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1245-50.

50. Shepard R, Deluca H. Plasma concentrations of vitamin D3 and metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1980;1.

51. Walentynowicz O, Kubasik-Juraniec J, Rudzinska-Kisiel T. Myocardial necrosis due to vitamin D3 overdose -- scanning electron microscopic observations. *Folia Morphol (Warsz)* 2004;63:439-44.

52. Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:60-6.
53. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SA, Zornoff LA. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit* 2008;14:62-6.
54. Lang RM, Bierig M, Devereaux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ, Chamber Quantification Writing G. 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.
55. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SA, Zornoff LA. Tobacco smoke-induced left ventricular remodelling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *Eur J Heart Fail* 2007;9:1081-5.
56. Aksnes L. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, and 25-hydroxyvitamin D in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18:339-43.
57. 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.

58. Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974;358:251-61.
59. Crouch RK, Gandy SC, Kisey G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981;30:235-41.
60. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. New York:Verlag Chemic Weinheim 1974.
61. Diniz YS, Rocha KK, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Novelli Filho JL, Cicogna AC, Novelli EL. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;543:151-7.
62. Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira SA, Martinez PF, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, Justulin LA, Matsubara LS, Matsubara BB, Paiva SA, Zornoff LA. Tissue vitamin A insufficiency results in adverse ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:523-30.
63. Duarte DR, Oliveira LC, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SA, Zornoff LA. Effects of the administration of beta-blockers on ventricular remodeling induced by cigarette smoking in rats. *Arq Bras Cardiol* 2009;92: 479-83.
64. Gu L, Pandey V, Geenen DL, Chowdhury SA, Piano MR. Cigarette smoke-induced left ventricular remodelling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *Eur J Heart Fail* 2008;10:1057-64.
65. Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiovascular remodeling induced by passive smoking. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:334-39.
66. Matsubara BB, Ferreira ALA, Matsubara LS. Aspectos anatomopatológicos da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2002;3:361-70.

67. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol* 2009;92:150-6.
68. Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SA, Zornoff LA. Influence of lisinopril on cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Med Sci Monit* 2010;16:255-9.
69. Sia YT, Lapointe N, Parker TG, Tsoporis JN, Deschepper CF, Calderone A, Pourdjabbar A, Jasmin JF, Sarrazin JF, Liu P, Adam A, Butany J, Rouleau JL. Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat. *Circulation* 2002;105:2549-55.
70. Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Novelli EL, Paiva SA, Zornoff LA. The role of oxidative stress and lipid peroxidation in ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure after myocardial infarction. *Clinics* 2009;67:691-7.
71. Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2010;In press:Acesso em 01/11/2010.
72. Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci* 2009;14:3128-44.
73. Izzotti A, D'Agostini F, Balanskya R, Deganc P, Pennisia TM, Steele VE, De Floraa S. Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta. *Mutation Research* 2008;644 38-42.
74. Tanaka T, Ohno N, Kita T, Kubo K, Yonetani Y, Nakashima T. Pharmacodynamic effects of chronic cigarette smoke exposure in spontaneously hypertensive rats. *Methods Fin Exp Clin Pharmacol* 2004;26:9-18.

75. Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther* 2007;3:225-30.
76. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition* 2010.
77. Meems LM, van der Harst P, van Gilst WH, de Boer RA. Vitamin D biology in heart failure: molecular mechanisms and systematic review. *Curr Drug Targets* 2011;12:29-41.
78. Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD. Systematic review: vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Ann Intern Med* 2010;152:315-23.
79. Kong J, Kim GH, Wei M, Sun T, Li G, Liu SQ, Li X, Bhan I, Zhao Q, Thadhani R, Li YC. Therapeutic effects of vitamin D analogs on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Pathol* 2010;177:622-31.
80. Artaza JN, Rajnish M, Norris KC. Vitamin D and the cardiovascular system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1515-22.
81. Mansur SJ, Hage FG, Oparil S. Have the renin-angiotensin-aldosterone system perturbations in cardiovascular disease been exhausted? *Curr Cardiol Rep* 2010;12:450-63.
82. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovascular Research* 2009;81:449-56.
83. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997;81:291-5.
84. Noyan T, Balaharoglu R, Komuroglu U. The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. *Clin Exp Med* 2005;5:31-6.

85. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague–Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996;66.
86. Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E. Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *Am J Nephrol* 2009;29:465-72.