



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

RENAN FLORET TURINI CLARO

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
REMODELAÇÃO CARDÍACA INDUZIDA
PELO ÁCIDO RETINÓICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zomoff
Coorientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

**Botucatu
2015**

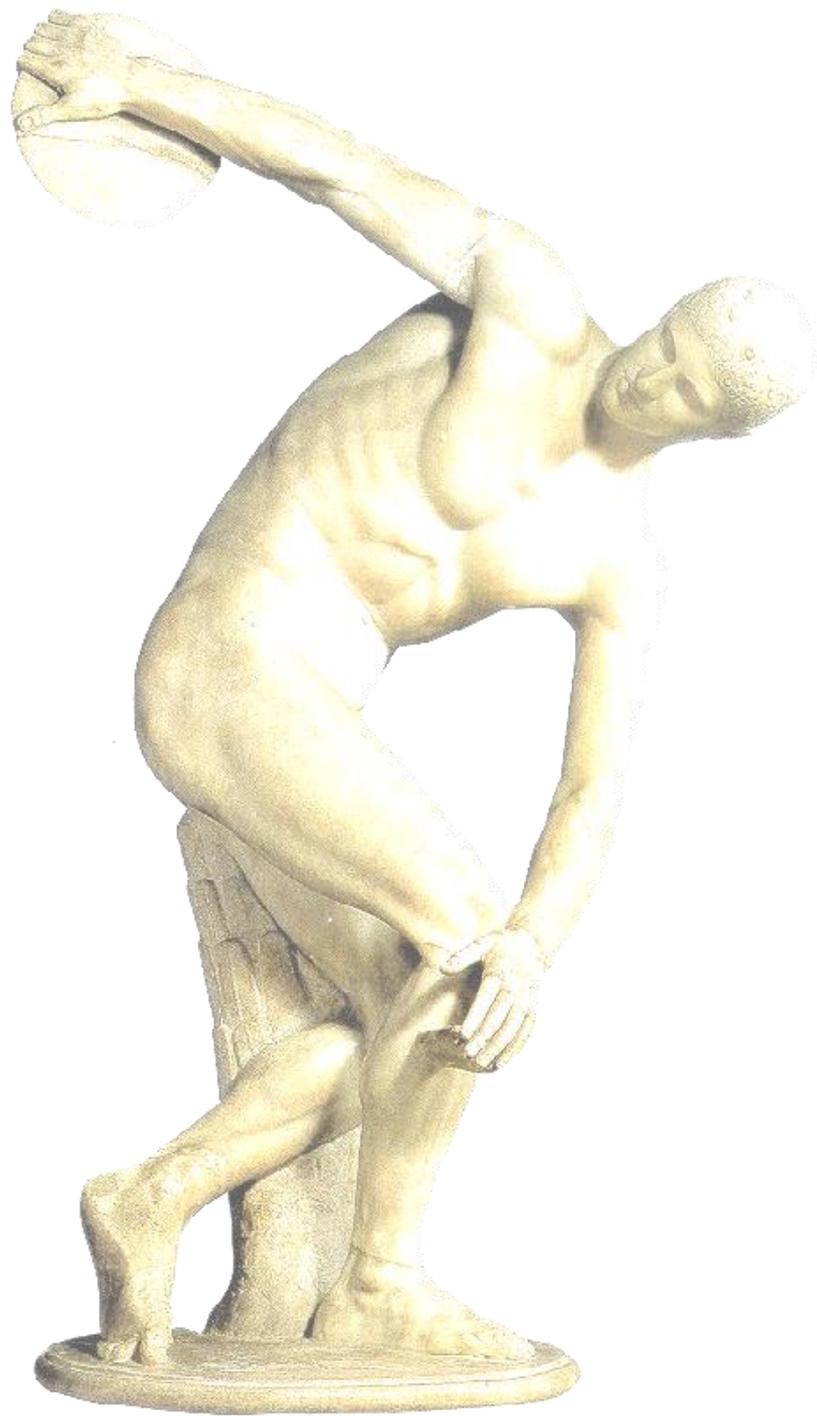
RENAN FLORET TURINI CLARO

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
REMODELAÇÃO CARDÍACA INDUZIDA PELO ÁCIDO
RETINÓICO

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

Orientador: Prof.Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff
Coorientadora: Profa.Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Botucatu
2015



DEDICATÓRIA

À minha esposa CARLA, companheira de vida, dedico todo amor e cumplicidade.

Ao meu tão desejado e amado filho GABRIEL, que trouxe mais sentido e motivação aos meus dias, dedicação e desejo de torna-lo um homem distinto.

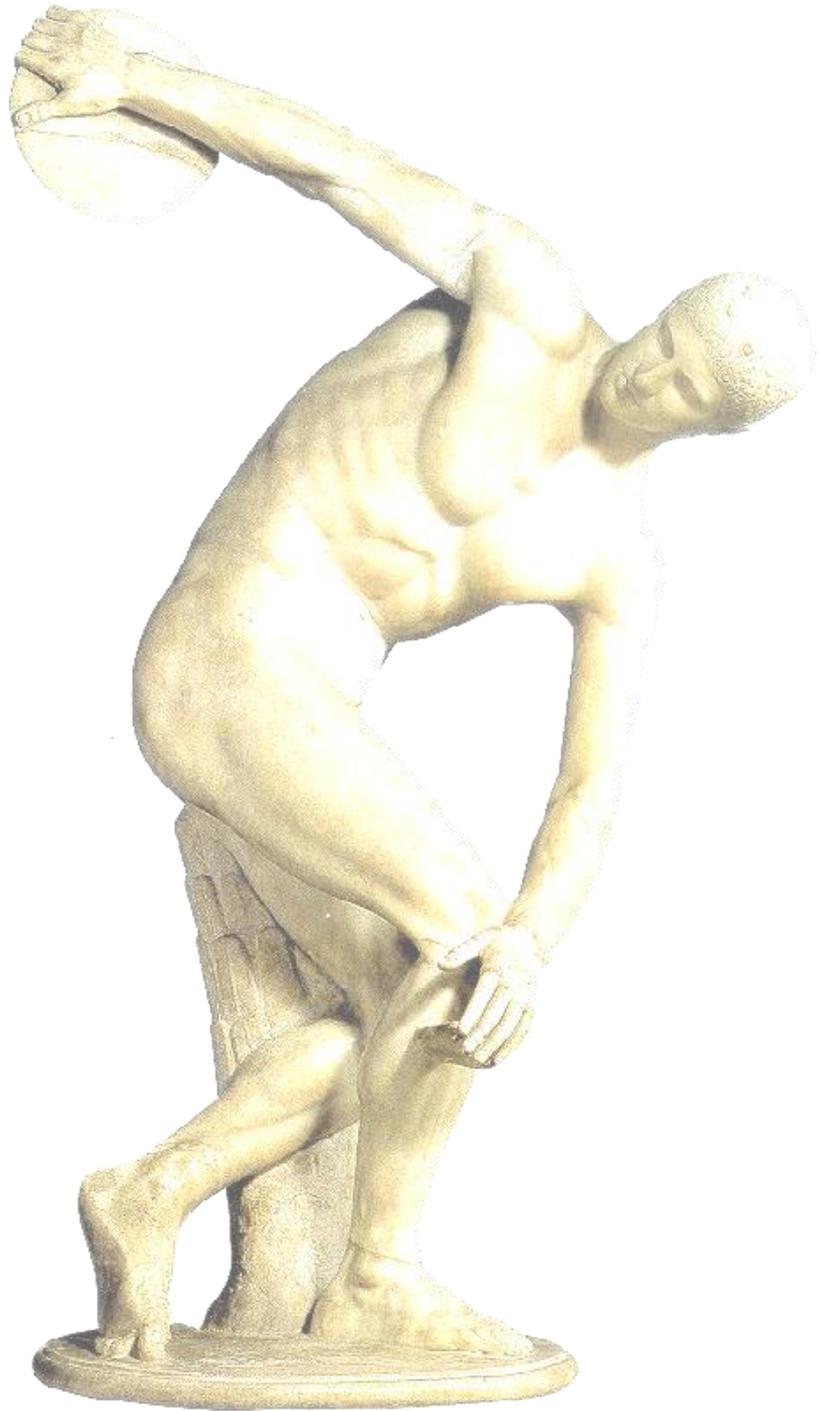
Aos meus pais NORIVAL e RUTH por toda a sua dedicação em me fornecer além de condições para me desenvolver, lições de vida que serão levadas a diante.

Para meu irmão RODRIGO, amigo e companheiro, que possa seguir o caminho do saber e desenvolver a ciência da Educação Física.

Aos meus avós RUTH, OSMAR (in memoriam) e LIDIA (in memoriam), por terem sido fundamentais na minha formação e, mesmo distantes continuam me influenciando pela conduta honesta e digna. Minha absoluta reverência.

Aos meus sogros PAULO e MARIA HELENA, pelo apoio e dedicação em auxiliar nos afazeres diários, preenchendo a ausência que deixei para me dedicar ao trabalho.

À toda minha família que é exemplo de união e amizade.



AGRADECIMENTOS

Á DEUS por proporcionar constantemente a essência que me guia pelos caminhos desta vida.

Aos meus amigos de laboratório Diego, Renata, Bruna Letícia, Priscila, Andréa, Bruna, Ana Carolina e Amanda que prontamente me ajudaram na realização deste trabalho e pelos vários momentos que passamos juntos. Vocês foram fundamentais.

Ao Prof. Dr. Katashi Okoshi por ter realizados os ecocardiogramas e prontamente aceitado participar da prova de qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicci e ao Prof. Dr. Sergio A. R. Paiva, pelos ensinamentos e pela ajuda que fizeram a diferença na minha formação.

À Dra. Bertha Furlan Polegato pela realização do estudo do coração isolado e pela paciência em me ensinar os conceitos deste estudo.

A prof^a. Dra. Ana Angélica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP pela participação na realização de análises descritas nesse trabalho e ter oferecido ajuda colocando a disposição seu laboratório.

Aos funcionários da UNIPEX que me auxiliaram nos procedimentos durante o período de execução do trabalho: Mário Bruno, José Carlos Georgete, Sandra Fábio, Sueli Clara, Elenize Jamas, Corina Corrêa, Camila Camacho, Vitor Souza, Rogério Monteiro, José Aparecido de Souza, Elizangela Silva, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Laura Andrade Câmara, Mario Augusto Dallaqua e Diego Generoso.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação que sempre foram solícitos às necessidades: Regina Spadin, Lílian Nunes, Andréa Devidé, Janete Nunes Silva e Nathanael Salles.

À bibliotecária Meire e Élida, pelo auxílio na revisão bibliográfica e confecção da ficha catalográfica deste trabalho. A FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e auxílio para realização desse projeto.

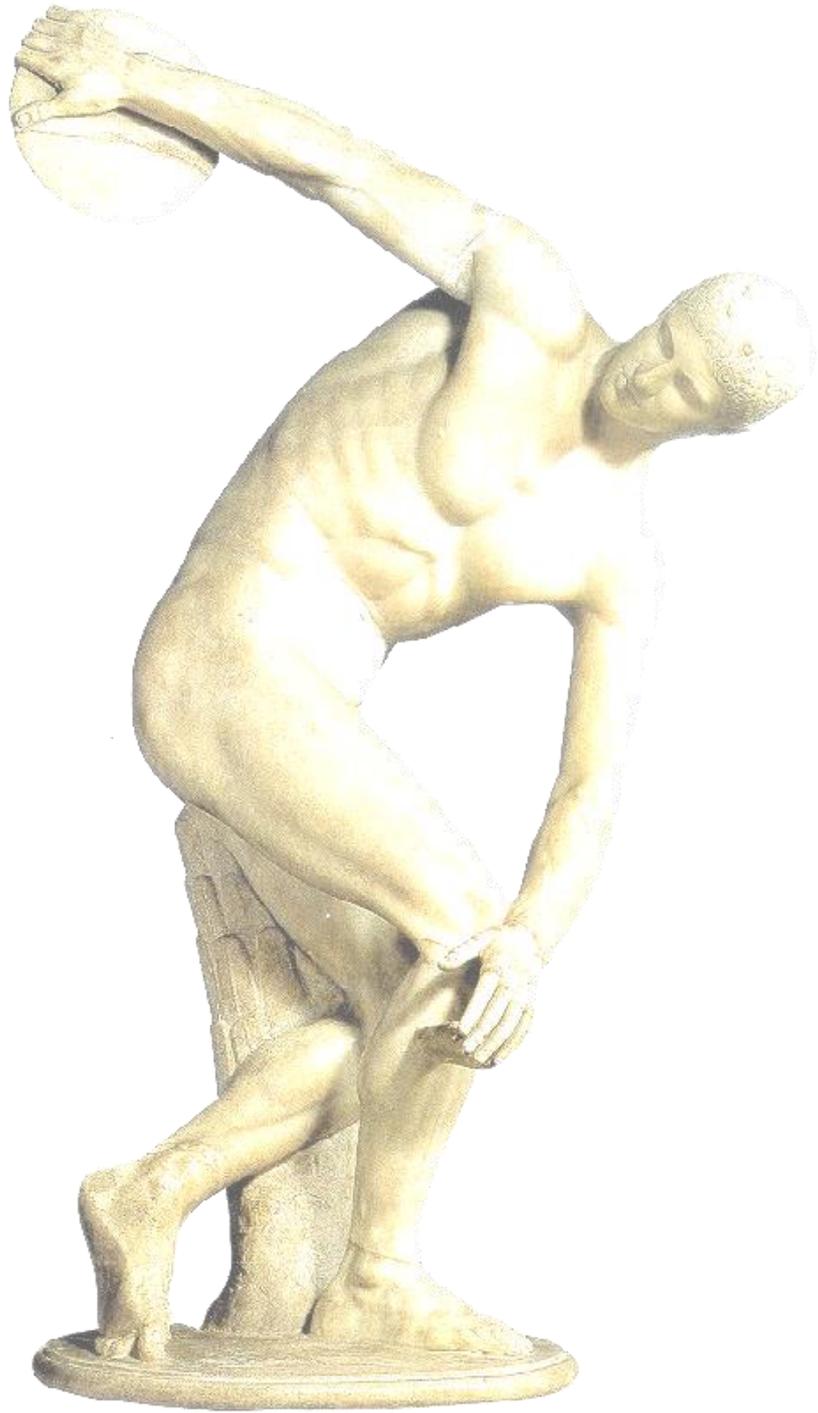


**AGRADECIMENTOS
ESPECIAIS**

Ao Prof. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff pela competência, tranquilidade e sabedoria durante a orientação deste trabalho. Referência na docência.

À Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla pela participação na coautoria dessa dissertação.

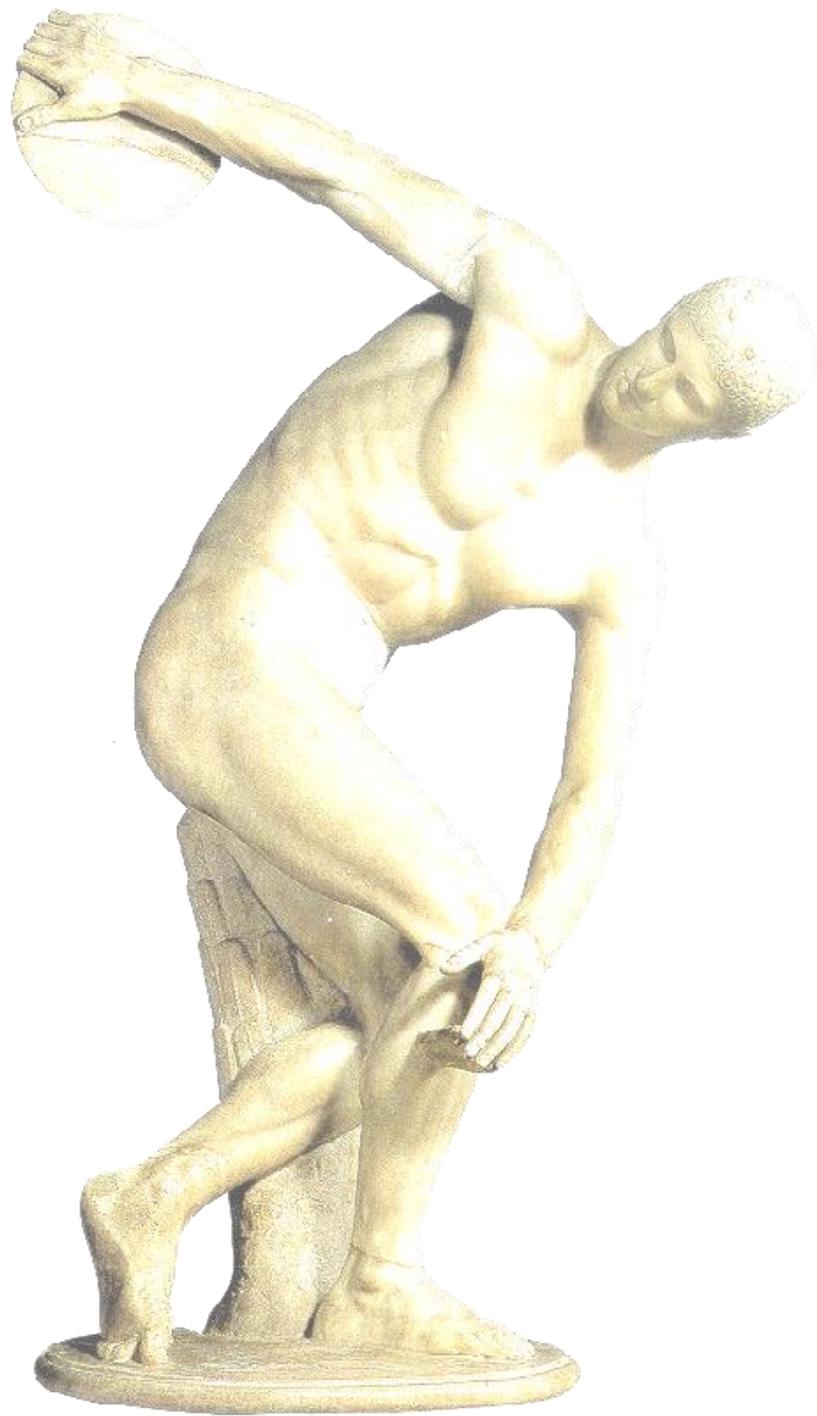
Ao Prof. Dr. Gustavo Ribeiro da Mota pela amizade, pelo exemplo profissional, por dividir seus conhecimentos de vida e por prontamente aceitar o convite para participar da banca de defesa deste trabalho.



ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza.”

Mário Sergio Cortella



LISTA DE ABREVIATURAS

AE – átrio esquerdo

AR – ácido retinóico

ATRA – Todo Trans Ácido Retinóico

DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

EROS – Espécies reativas de oxigênio

EF – exercício físico

FC – frequência cardíaca

IC – Insuficiência Cardíaca

IL-6 – Interleucina 6

PC – peso corporal do rato

RAR – receptor do ácido retinóico

RE – equivalente de retinol

RXR – receptor rexinóide

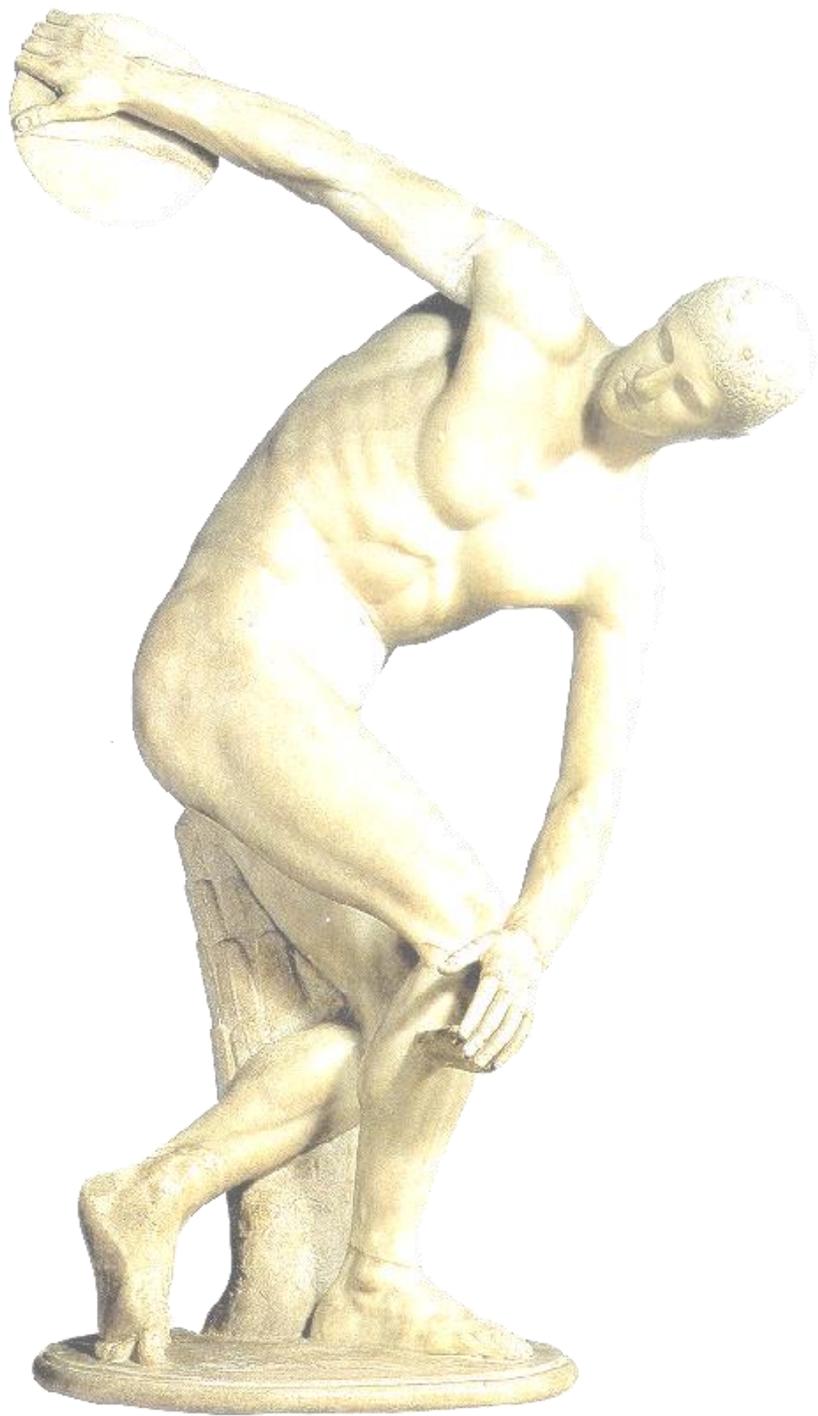
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

$\dot{V}O_2$ – Volume de oxigênio

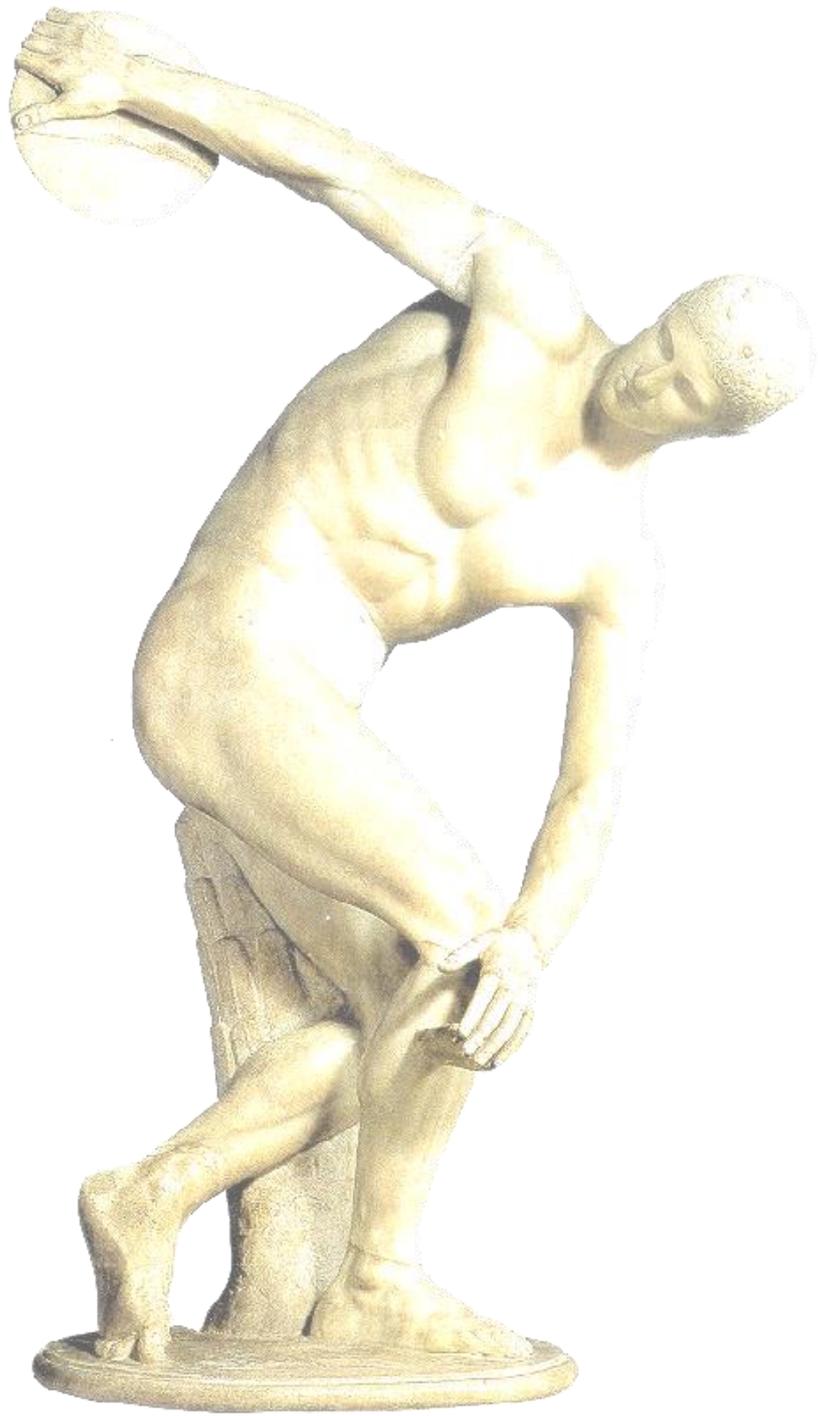
$\dot{V}O_2$ Máx – Volume Máximo de Oxigênio



SUMÁRIO

Sumário

Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
1. Introdução.....	19
2. Hipótese.....	24
3. Objetivo.....	26
4. Material e Métodos.....	28
5. Resultados.....	36
6. Discussão.....	53
7. Conclusões.....	58
8. Referências.....	60



RESUMO

Resumo

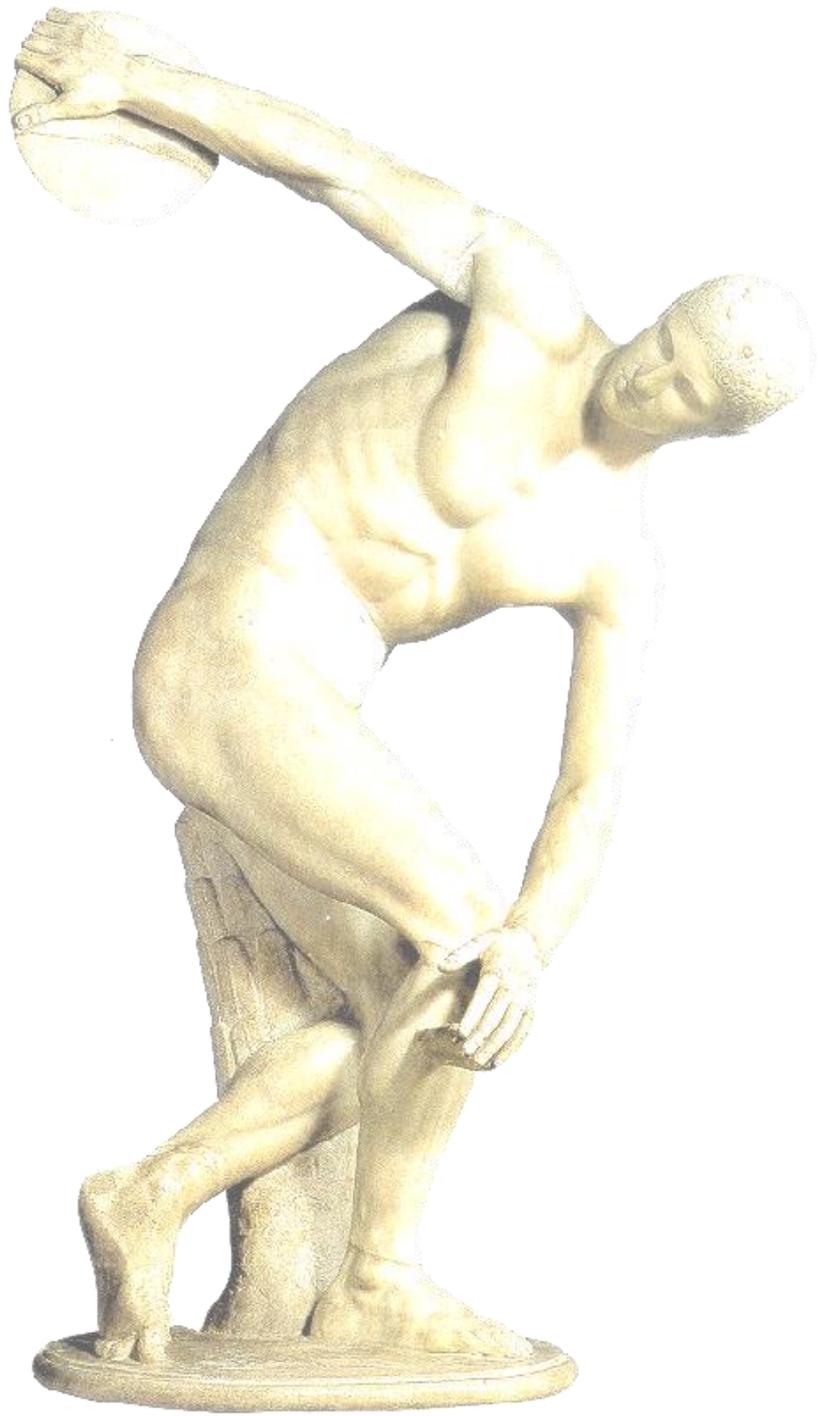
O ácido retinóico (AR) é um metabólito bioativo da vitamina A que tem sua origem no retinol. Este composto pode ser encontrado na forma de alguns isômeros como o 9-cis-AR e Todo-Trans-AR (ATRA). Eles possuem receptores específicos (RXR e RAR respectivamente) e agem na ativação ou na repressão da transcrição de genes alvos dentro do núcleo celular. No caso do ATRA, quando utilizado como suplemento, promove remodelação cardíaca.

O exercício físico (EF) por sua vez provoca alterações cardíacas classificadas como fisiológicas, melhora a função e modifica estruturas para se adequar às exigências hemodinâmicas da quebra da homeostase.

No nosso protocolo avaliamos a influência do exercício físico sobre as alterações no coração de ratos Wistar machos submetidos à suplementação com AR. Para isso, analisamos os efeitos dos tratamentos no coração através do ecocardiograma, estudo do coração isolado, peso do coração e estudo histopatológico. Essas análises são capazes de caracterizar o processo de remodelação cardíaca detectando alterações funcionais, quantidade de colágeno, hipertrofia ventricular elucidando situações fisiológicas ou patológicas.

Nossos resultados mostraram que os animais tratados com AR apresentaram menores valores de diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso, associado com menor índice de massa do ventrículo esquerdo. Em relação aos dados funcionais, obtidos no estudo do coração isolado, a associação de AR com EF induziu menores valores da pressão sistólica, derivada positiva e derivada negativa da pressão.

Portanto, podemos concluir que a associação do AR com o EF atenuou a hipertrofia cardíaca e resultou em efeitos deletérios nas funções sistólica e diastólica de ratos.



ABSTRACT

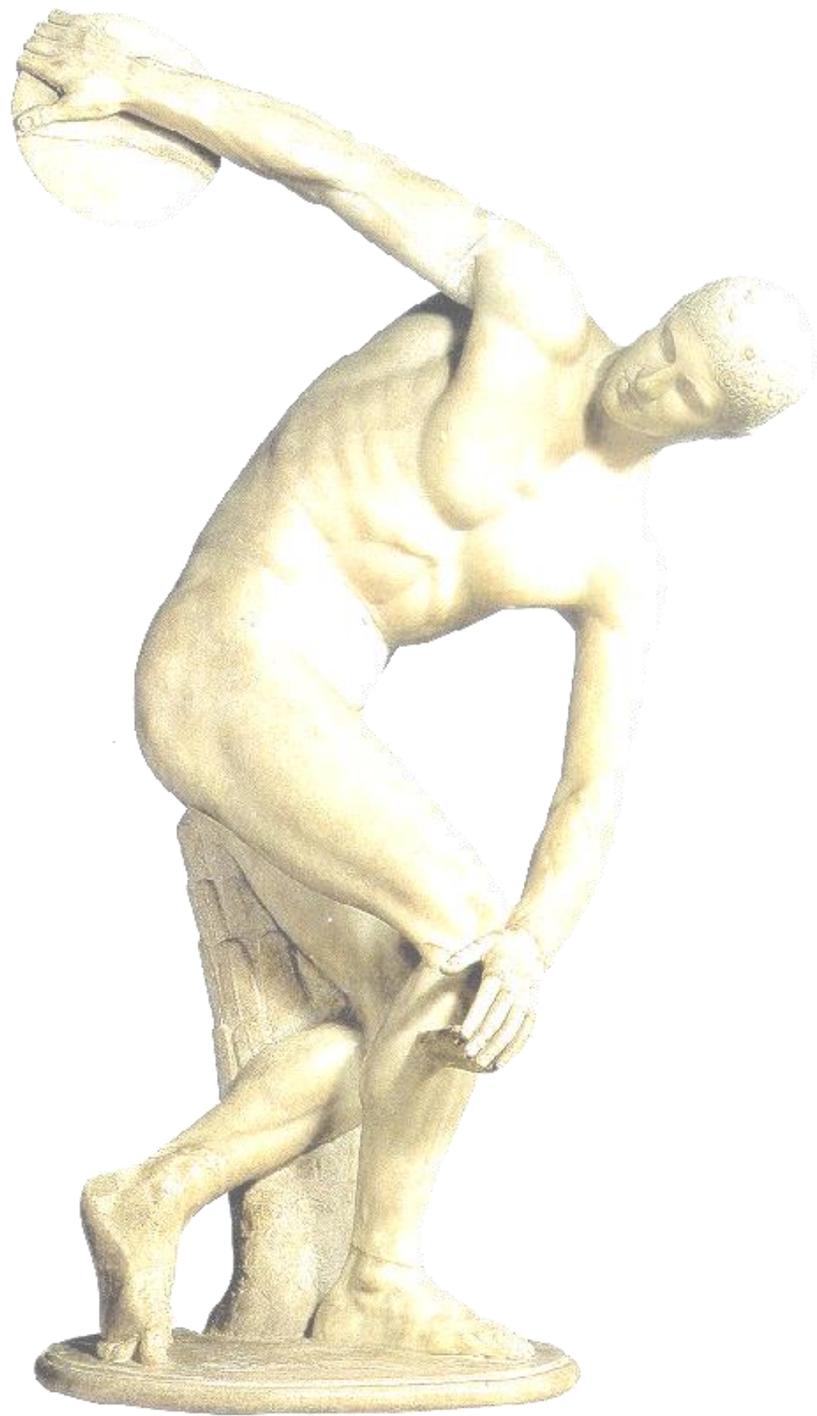
Abstract

The Retinoic Acid (RA) is a bioactive metabolite of Vitamin A that has its origin in Retinol. The AR can be found in some form of isomers such as 9-cis RA and all-trans-RA (ATRA). They bind to specific receptors (RAR and RXR respectively) and act by activating or repressing the transcription of target genes within the cell nucleus. In the case of ATRA when used as a supplement promotes cardiac remodeling. Physical Exercise (PE) in turn causes cardiac abnormalities classified as physiological and improves function and modify structures to suit the requirements of hemodynamic homeostasis break. PE and RA together can elucidate physiological situations at an early stage.

In our protocol we evaluate the influence of exercise on changes in the heart of male Wistar rats treated with RA. For this, we analyzed the effects of the treatments in the heart by echocardiography, the study of the isolated heart, heart weight and histopathology. These analyzes are able to characterize the cardiac remodeling process detecting functional changes, collagen and ventricular hypertrophy elucidating physiological or pathological conditions.

Our results showed that animals treated with AR had lower left ventricular end-diastolic diameter adjusted for weight, and low mass index of the left ventricle. Regarding the functional data, the RA association with exercise induced lower systolic pressure, derived positive and negative derivative of pressure.

Therefore we can conclude that the association of AR with EF attenuated cardiac hypertrophy and resulted in deleterious effects on systolic and diastolic functions in rats.



1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O exercício físico (EF) é uma intervenção que proporciona modificações no sistema cardiovascular. Essas alterações podem ser benéficas ou deletérias dependendo das características do exercício. Estudos recentes mostraram que estímulos prolongados elevam biomarcadores cardíacos como a troponina sinalizando danos (1-3). Exercícios exaustivos estimulam a produção contínua de espécies reativas de oxigênio (EROS) acarretando disfunção celular e lesão no DNA no miocárdio de ratos (4). Estes processos podem modificar as estruturas de forma irreversível e ocasionam morte celular. Por outro lado, a hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento cíclico e contínuo é uma importante adaptação fisiológica, que inclui aumento equilibrado do ventrículo esquerdo (VE), diâmetro do átrio esquerdo, massa cardíaca, e espessuras de parede do VE efetuada pela hipertrofia dos miócitos e neoangiogênese (5,6). Portanto as adaptações do tecido do miocárdio resultantes do treinamento físico em modelos animais dependem de fatores como a modalidade, intensidade, duração e frequência da atividade física (7).

Em relação às modificações agudas, ocorre o aumento da frequência cardíaca, do enchimento diastólico do ventrículo esquerdo, do volume sistólico e do débito cardíaco para suprir a demanda sistêmica de nutrientes e oxigênio. Adicionalmente adaptações relacionadas ao metabolismo oxidativo no músculo esquelético e à hemodinâmica visam otimizar essas modificações momentâneas (8-10). Cronicamente, foi observado o aumento da capacidade física geral medida pelo consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ Máx), a melhora da eficiência de movimento e maior tolerância à acidose (11).

Desta forma, é evidente que os benefícios no sistema cardiovascular relacionados ao exercício vão além da hemodinâmica. No caso do sistema nervoso autônomo, ocorre

diminuição da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática (17). Na insuficiência cardíaca (IC), o exercício físico reduziu os níveis plasmáticos de TNF- α e de interleucina 6 (IL6). Essas condições determinaram a diminuição do número de internações, o que reforça a importância da prática de exercícios físicos na melhora da qualidade de vida de pacientes com IC.

Estudos do músculo papilar e do coração isolado, realizados em animais, demonstraram que o treinamento físico melhorou a função contrátil e promoveu hipertrofia cardíaca, caracterizando efeitos decorrentes do exercício físico em variáveis funcionais e morfológicas cardíacas (10,18,19). Em humanos, o treinamento físico resultou no processo de hipertrofia cardíaca, com aumento das cavidades cardíacas, juntamente com a melhora de parâmetros funcionais. O conjunto dessas condições sugere adaptação fisiológica ao treinamento físico (20).

Dessa forma, as alterações no sistema cardiovascular decorrentes da prática de EF são bastante consistentes. Importante ressaltar que as alterações induzidas pelo EF são associadas com variações moleculares, celulares e intersticiais, características do processo de remodelação cardíaca. Assim, as respostas decorrentes deste tipo de intervenção caracterizam a remodelação cardíaca fisiológica.

Outro aspecto a ser considerado refere-se ao fato de que outras intervenções também podem induzir alterações morfológicas e funcionais cardíacas. Nos últimos anos, diversos estudos têm analisado os efeitos da vitamina A sobre o coração.

A vitamina A pode ser encontrada em duas formas principais: pré-formada (todo-*trans*-retinol e seus ésteres) e a pró-vitamina A (beta-caroteno). Essa vitamina lipossolúvel essencial é expressa no meio extracelular como retinol que, quando oxidado, transforma-se em retinal (aldeído) e tem sua ação no meio intracelular desempenhando papel fundamental

na visão.

Na interação com a enzima retinaldeído desidrogenase, o retinal é convertido em ácido retinóico (AR), importante na transcrição, regulação de genes envolvidos na morfogênese, diferenciação e proliferação celular (21).

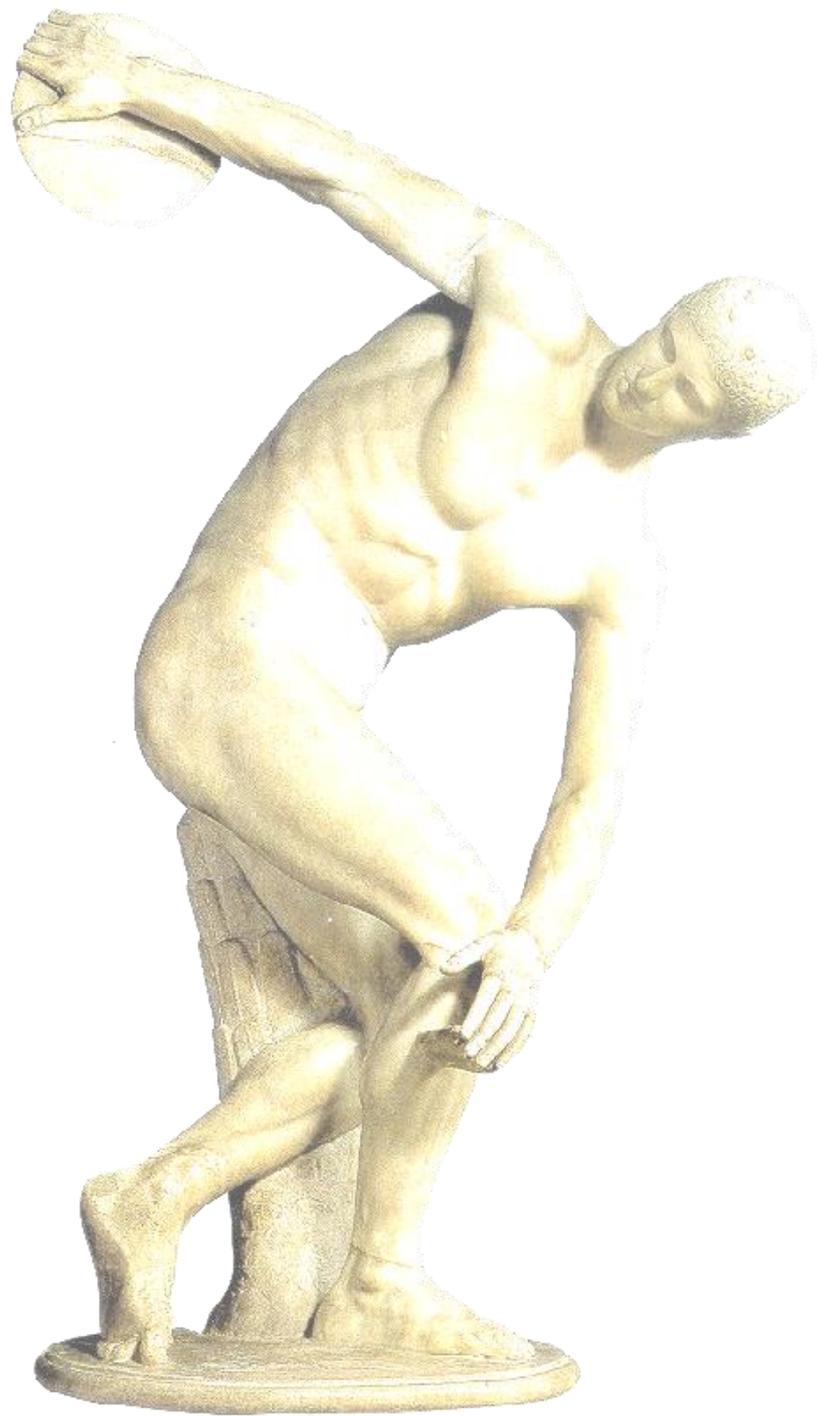
Este composto possui isômeros que podem ser encontrados nas formas trans como todo-trans-ácido retinóico (ATRA) e cis como 9-cis-ácido-retinóico (9-cis-AR) e 13-cis-ácido-retinóico (13-cis-AR). Porém, somente o ATRA e o 9-cis-AR são capazes de agir dentro do núcleo ligando-se a seus receptores (RAR e RXR, respectivamente). Esta conexão estimula a transcrição gênica e conseqüentemente síntese proteica (22).

Estudos realizados com ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio utilizando ATRA mostraram diminuição da área do cardiomiócito e da porcentagem de colágeno após a agressão (23). No modelo de ratos espontaneamente hipertensos, Lu e colaboradores utilizaram ATRA (10mg e 20 mg/kg do animal/dia) e demonstraram a inibição da hipertrofia de artérias intramiocárdicas e da fibrose ventricular(24). Choudhary e colaboradores (25) utilizaram a dose de 30 mg de ATRA/kg do animal/dia em um período de 5 meses e observaram inibição da hipertrofia causada pela constrição da artéria aorta em ratos. Portanto, em modelos de agressão, a suplementação de AR parece atenuar o processo de remodelação cardíaca.

Por outro lado, quando o AR foi administrado em corações normais utilizando ATRA em doses fisiológicas, resultou em hipertrofia cardíaca sem fibrose e manutenção da função cardíaca em ratos (26). As alterações cardíacas relatadas condizem com adaptações encontradas em situações fisiológicas, como no exercício físico, ou situações patológicas em fase inicial, como na sobrecarga de volume. Portanto, com base nas evidências apresentadas,

o ATRA é um agente causador de remodelação cardíaca fisiológica.

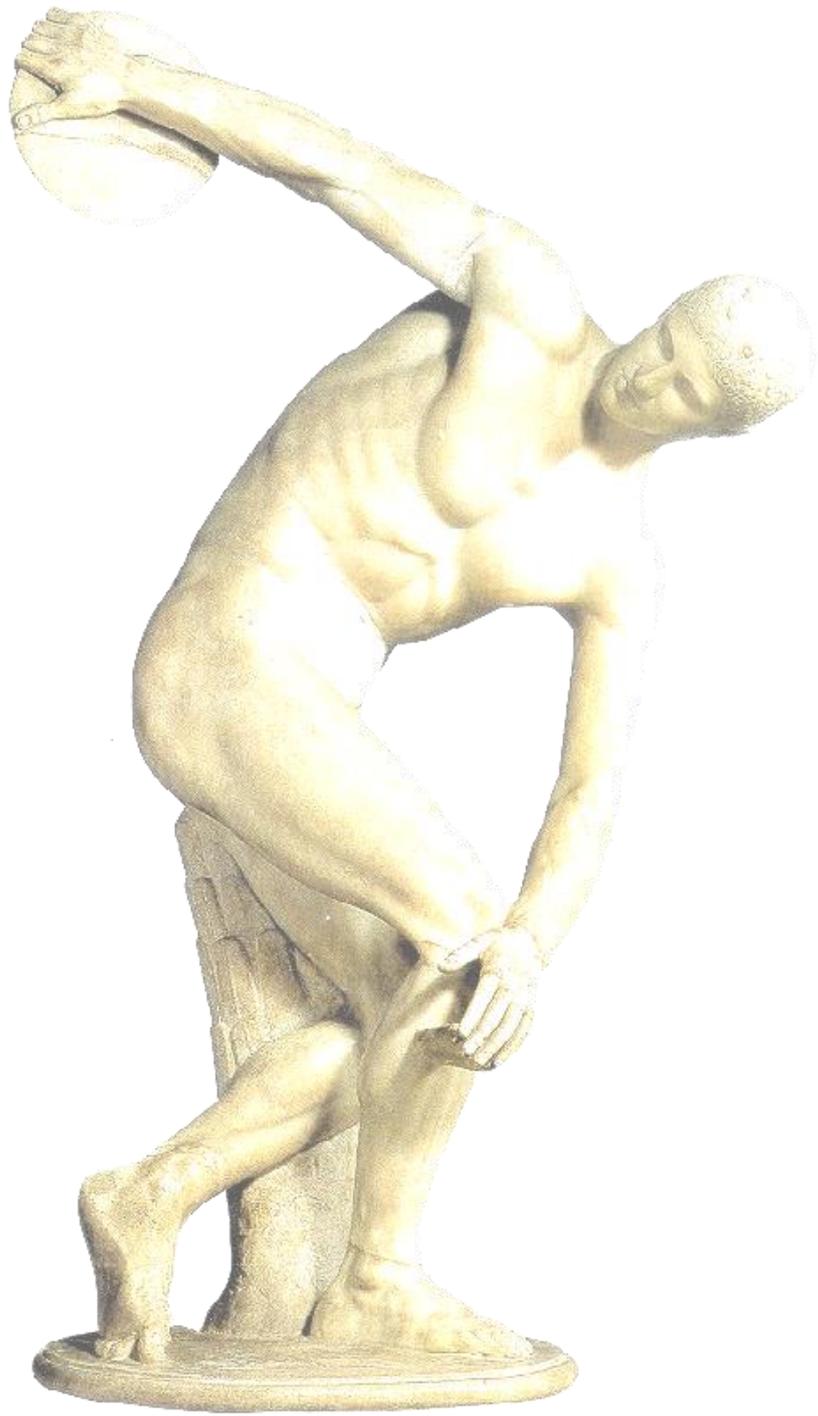
Pelo exposto, os efeitos da associação entre o AR com o exercício físico podem esclarecer se os feitos no coração normal são potencializados. Também elucidar se os efeitos do AR no coração normal são compatíveis com alterações fisiológicas ou patológicas em fase inicial.



2. HIPÓTESE

2. Hipótese

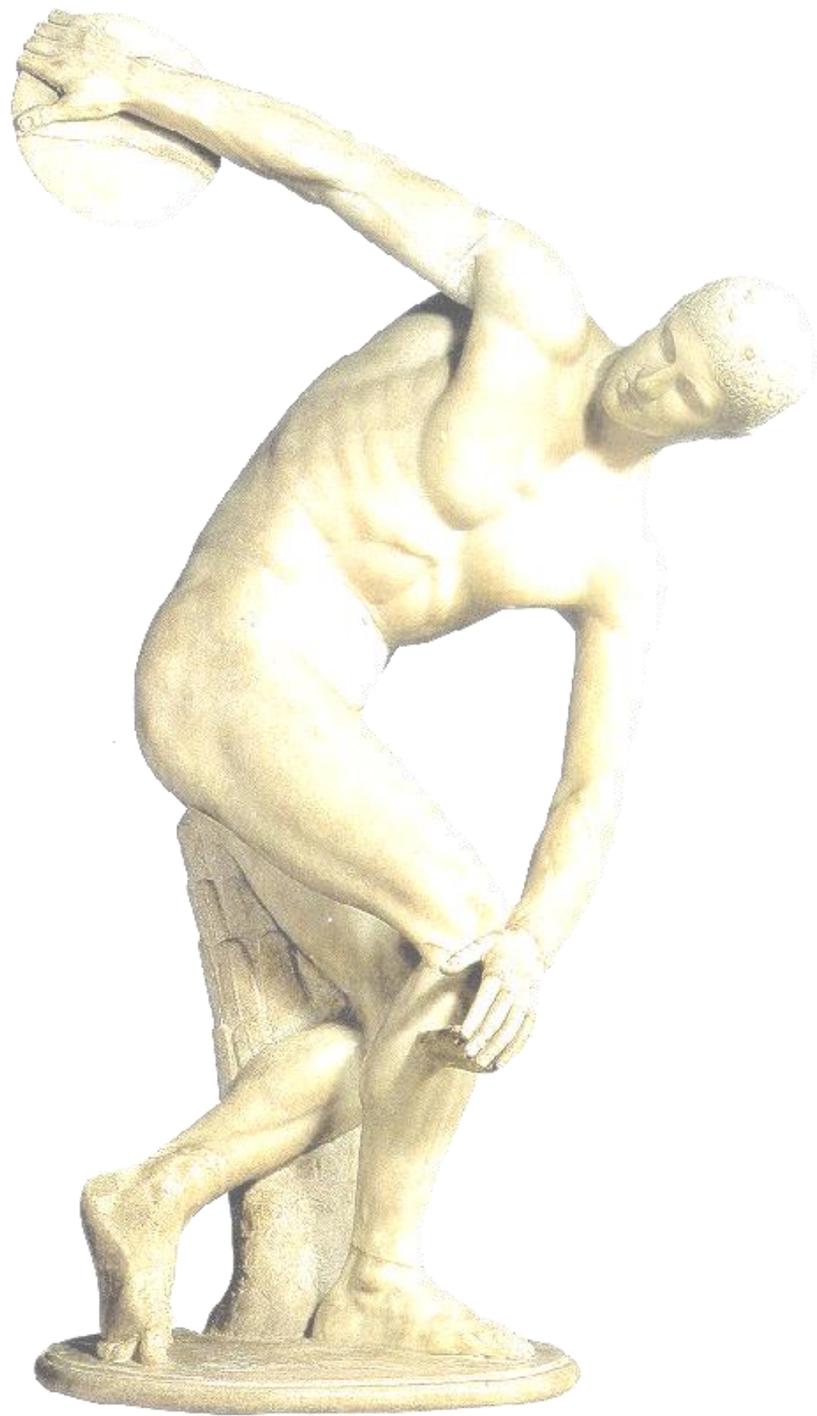
Elaboramos a hipótese de que o exercício físico moderado pode influenciar o processo de remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico.



3. OBJETIVO

3. Objetivo

Avaliar a influência do exercício físico na remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e métodos

Delineamento Experimental

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo 985/2012), utilizando os Princípios Éticos na Experimentação Animal, garantidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados neste estudo 80 ratos Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas, originados do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais para controle de ingestão diária, alimentados com ração comercial padrão (Nuvilab®) e livre acesso à água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), de temperatura (aproximadamente 25° C) e de umidade constante.

Após adequação do peso, os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos: Grupo C (n=20) formado por animais sedentários e alimentados com ração padrão; Grupo EX (n=20) formado por animais treinados em esteira rolante (Fig. 1) e alimentados com ração padrão; Grupo EA (n=20) formado por animais treinados em esteira rolante e alimentados com ração padrão suplementada com ácido retinóico (0,3 mg/kg ração); Grupo AR (n=20), formado por animais alimentados com ração padrão suplementada com ácido retinóico (0,3 mg/kg ração). A dose de AR (Fig. 2) utilizada foi a mesma de estudo realizado anteriormente (26). O isômero utilizado na suplementação foi o Todo Trans Ácido Retinóico (ATRA). Após 4 meses de tratamento, os animais foram submetidos a estudo funcional, morfométrico e bioquímico.



Figura 1- Treinamento em esteira rolante



Figura 2- AR para produção de 15 kg de ração

Protocolo de Exercício Físico

Os animais passaram por um período de adaptação que, inicialmente, utilizou a velocidade de 0,5 km/h (8,3 m/min) durante 30 minutos na primeira sessão. Diariamente, a velocidade e a duração foram aumentadas em 0,20 km/h (3,3 m/min) e 5 minutos, respectivamente, até 1,5 km/h (25 m/min) por uma hora. O exercício teve frequência de 5 dias por semana até o final do período experimental (Fig. 3). As sessões de treinamento foram realizadas em ciclo invertido de luz.

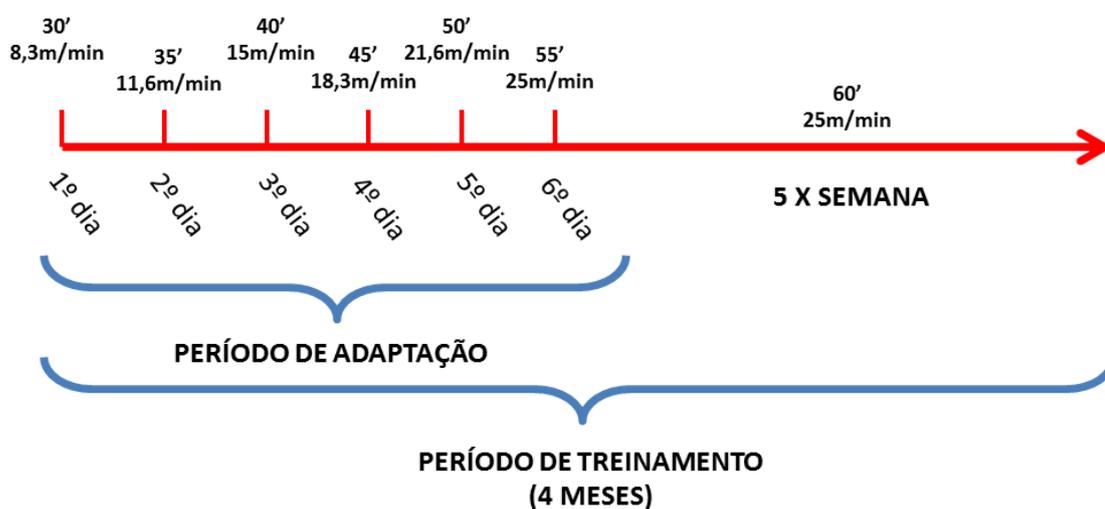


Figura 3- Esquema do período de treinamento com evolução da intensidade e volume.

Análise de Consumo Máximo de Oxigênio

Na última semana de treinamento, os animais foram submetidos ao teste de esforço máximo para medir o consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ Máx) com o objetivo de detectar a intensidade do exercício. O $\dot{V}O_2$ Máx foi medido por analisador de oxigênio (AVS Projetos) conectado a sistema que captava informações com a frequência de 1Hz. A esteira rolante se localizava dentro de caixa acrílica vedada com controle de velocidade digital (Fig. 4). O ar

ambiente foi bombeado para a câmara fechada por bomba de ar com fluxo de 3,5 l/min. Amostras deste ar foram utilizadas para medir a variação de oxigênio dentro da câmara durante a corrida. O analisador foi calibrado com ar ambiente a cada novo teste. Uma grade de aço inoxidável foi produzida sob medida no final da pista e, quando tocada, fornecia estímulo elétrico para manter os ratos correndo até o final do teste. Entretanto, a área total da pista garantiu que o animal dispusesse de espaço suficiente para correr sem ter contato constante com o aparato.

Os animais submetidos ao teste de esforço perfizeram 15 minutos de aquecimento em velocidade de 8 m/min antes do início do protocolo para quantificação do consumo de oxigênio. A velocidade inicial do teste foi de 13 m/min. Os estágios tiveram 3 minutos de duração e acréscimo de 3 m/min ao final deste período. Os critérios para obtenção do $\dot{V}O_2$ Máx foram estabilização no consumo de oxigênio mesmo com acréscimo de velocidade e/ou presença de exaustão.



Figura 4 – Analisador de oxigênio e esteira rolante

Estudo Ecocardiográfico

Após quatro meses de tratamento, os ratos foram novamente anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito

lateral esquerdo para realização do ecocardiograma transtorácico. Foi utilizado equipamento da General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. Todas as variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography(27) e já validadas no modelo de ratos infartados e no nosso laboratório(28-33).

As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessura diastólica (EDPP) da parede posterior do VE; espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV); e diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) (8). A espessura relativa do VE foi calculada pela fórmula $[(2 \times EDPP) / DDVE]$ (9). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo): $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$; 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; 3) fração de variação das áreas sistólica e diastólica da cavidade ventricular; 4) velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S) obtida por Doppler tissular. Adicionalmente foi calculado o índice de performance miocárdica do VE (índice de Tei) (36). A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); 4) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A') obtidas por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E')(37, 38).

Coração isolado: preparação de Langendorff

Após o estudo ecocardiográfico, sete animais de cada grupo receberam tiopental sódico (50 mg/kg) e foram submetidos à injeção de 1000 UI de heparina via intraperitoneal. Após anestesia os animais foram ventilados com pressão positiva utilizando oxigênio 100%. Em seguida foi realizada esternotomia mediana e dissecada a aorta ascendente. Foi realizada cateterização dessa artéria com cânula número 15 e iniciada a perfusão retrógrada com solução nutriente (solução de Krebs-Henseleit com composição, em milimoles/litro: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose; 25,88 NaHCO₃ e manitol) previamente submetida a filtro de acetato de celulose com poro de 5 micrometros. Na perfusão do coração, a temperatura da solução foi mantida em 37°C e a pressão de perfusão permaneceu constante em 75 mmHg. O coração, conectado à cânula, foi transferido para equipamento responsável pela perfusão de coração isolado tamanho 3, tipo 830 da Hugo Sachs Elektronik - March-Hugstetten, Germany. Dessa forma, um balão de látex foi introduzido na cavidade ventricular esquerda. O volume do balão indicava ao transdutor a pressão dentro da cavidade a cada momento. Assim, todo estímulo teve seu registro gráfico das medidas de pressão diastólica (PD), pressão sistólica (PS), derivada negativa (-dp/dt) e positiva (+dp/dt) de pressão, como demonstrado na Figura 5.

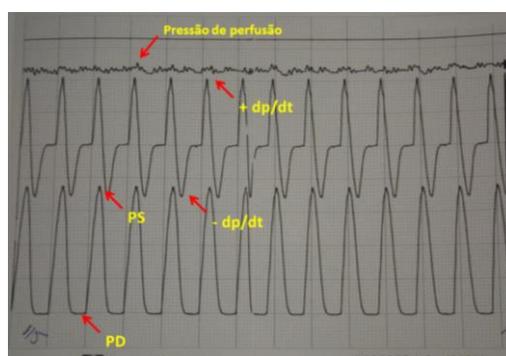


Figura 5 – Registo gráfico da pressão diastólica (PD), pressão sistólica (PS), derivada negativa (-dp/dt), derivada positiva (+dp/dt) e pressão de perfusão coronariana.

Coleta de Material Biológico

Após o estudo ecocardiográfico, os animais foram sacrificados com dose excessiva de pentobarbital (100 mg/kg) e o sangue foi coletado, antes da retirada do coração, fígado e pulmão. O sangue foi centrifugado para obtenção do soro que posteriormente foi congelado a -80°C . O fígado e pulmão foram envolvidos com gaze para retirada do sangue. Após o estudo, o coração foi dissecado, separando-se o ventrículo esquerdo (VE) do ventrículo direito (VD) e obtido o peso total do VE e VD. Em seguida o VE foi seccionado a 4 mm da ponta em fragmento de 3 mm colocado em formol tamponado. Peso úmido do VD, fígado e pulmão foram aferidos. O VE foi preservado em formol tamponado (formol 100% água deionizada, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico) por 24 horas, depois lavado em água corrente por mais 24h e posteriormente banhado em álcool 70%, antes de ser parafinizado. VE, VD, fígado e pulmão foram congelados a -80°C . Posteriormente foram processados e submetidos a determinações bioquímicas.

Estudo histopatológico

Seccionou-se o bloco de parafina em cortes de 5 micrômetros de espessura. As amostras foram fixadas com hematoxilina-eosina e com coloração específica para colágeno que é o picrossirius vermelho (Sirius red F3BA em saturação aquosa de ácido pícrico). A área dos miócitos foi determinada pela média das medidas de aproximadamente 100 miócitos por lâmina corada com hematoxilina-eosina. As medidas foram realizadas utilizando o microscópio Leica (lente com aumento de 40x), ligado à câmera conectada a um computador com um software de análise das imagens (Image-Pro Plus 3,0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Os miócitos escolhidos deveriam ter o núcleo central, em corte transversal, e

foram medidos através de um contorno gerado pelo mouse. A porcentagem do volume de colágeno intersticial foi determinada nas lâminas coradas com picosirius vermelho, no mesmo microscópio, com lente de aumento 40x e mesmo software acima citado. O programa que analisa essa porcentagem permite a demarcação de cor para presença de colágeno (vermelho) e sem colágeno (amarelo). Assim, estabeleceu-se a porcentagem do volume em vermelho sobre o volume total do campo e a média de todos os valores. Foram considerados aproximadamente 30 campos, excluindo-se o colágeno perivascular.

Análise estatística

Os valores foram apresentados em média \pm desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75. Os testes foram realizados por meio do software SigmaPlot for Windows v2.03 da SPSS. As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância de duas vias (ANOVA) complementados por Tukey. O nível de significância adotado foi de 5 %.



5. RESULTADOS

5. Resultados

Peso corporal

Os animais dos grupos tratados com exercício físico (grupos AE e EX) apresentaram diferença estatisticamente significativa no peso corporal ao final do período de exposição aos tratamentos (EX: 463,5±33,6 g; C:479,4±41,2 g; AR: 506,8±50,6 g; AE:459,5±38,0 g) (Gráfico 1).

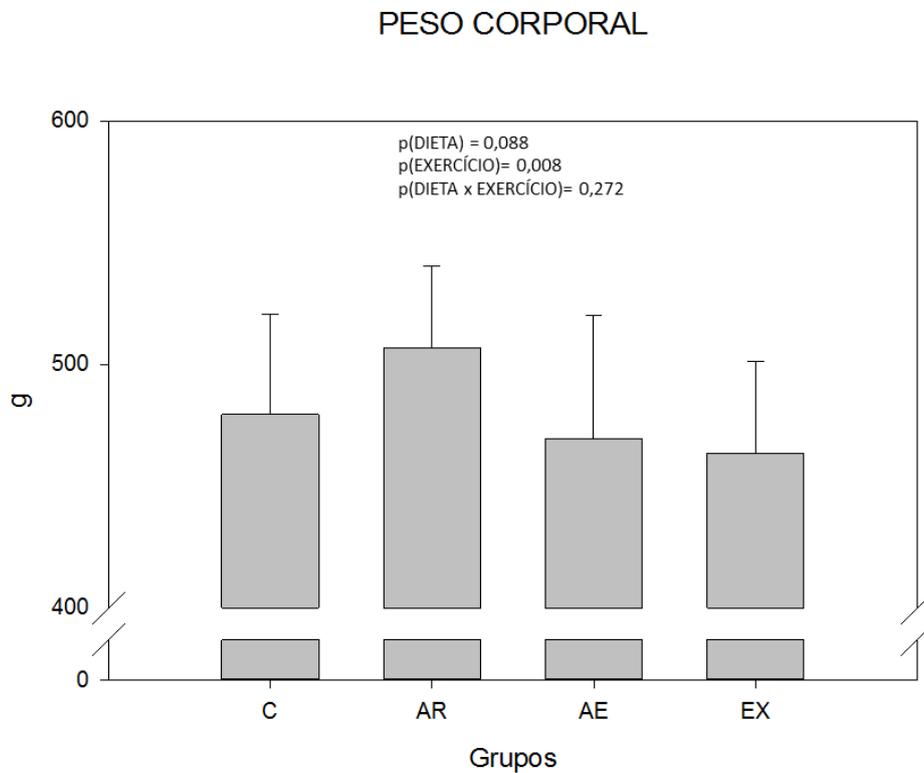


Gráfico 1 – Peso corporal dos animais dos grupos submetidos ao exercício (EX), controle (C), suplementados com ácido retinóico (AR) e tratados com exercício e ácido retinóico (AE) ao final de quatro meses.

Exercício físico

Para analisar o treinamento proposto, foram utilizadas as variáveis obtidas nos testes de esforço máximo: tempo total de exercício (Gráfico 2), velocidade máxima (Gráfico 3), $\dot{V}O_2$ máximo relativo (Gráfico 4) e percentual do consumo máximo de oxigênio na velocidade de treinamento (Gráfico 5).

Considerando os valores do tempo total de teste (EX: $35,2 \pm 7,0$ min.; C: $22,5 \pm 3,8$ min.; AR: $12,0 \pm 4,2$ min.; AE: $33,0 \pm 7,7$ min.; p DIETA: 0,055; p EXERCÍCIO: $< 0,001$; p DIETAxEXERCÍCIO: 0,193) obtidos na avaliação do esforço e velocidade máxima alcançada ao final da corrida (EX: $45,2 \pm 7,0$ m/min.; C: $32,5 \pm 3,8$ m/min.; AR: $22,0 \pm 4,2$ m/min.; AE: $43,0 \pm 7,7$ m/min.; p DIETA: 0,055; p EXERCÍCIO: $< 0,001$; p DIETAxEXERCÍCIO: 0,193), foram observadas diferenças significantes na intervenção do exercício físico. O $\dot{V}O_2$ máximo relativo obtido na exaustão ou na manutenção dos níveis de consumo máximo de oxigênio (EX: $107,4 \pm 11,3$ ml/kg.min⁻¹; C: $93,5 \pm 11,2$ ml/kg.min⁻¹; AR: $88,4 \pm 14,4$ ml/kg.min⁻¹; AE: $92,2 \pm 18,9$ ml/kg.min⁻¹; p DIETA: 0,183; p EXERCÍCIO: 0,244; p DIETAxEXERCÍCIO: 0,496) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. No entanto, quando analisado o percentual do $\dot{V}O_2$ correspondente à velocidade de 25 m/min utilizada no período de treinamento (EX: $56,2 \pm 8,1$ % $\dot{V}O_{2M\acute{a}x.}$; C: $77,7 \pm 9,3$ % $\dot{V}O_{2M\acute{a}x.}$; AR: $116,5 \pm 20,0$ % $\dot{V}O_{2M\acute{a}x.}$; AE: $59,6 \pm 10,9$ % $\dot{V}O_{2M\acute{a}x.}$; p DIETA: 0,007; p EXERCÍCIO: $< 0,001$; p DIETAxEXERCÍCIO: 0,019), houve diferença significativa nos grupos submetidos ao exercício em relação ao tratados com ácido retinóico.

TEMPO TOTAL DO TESTE DE ESFORÇO

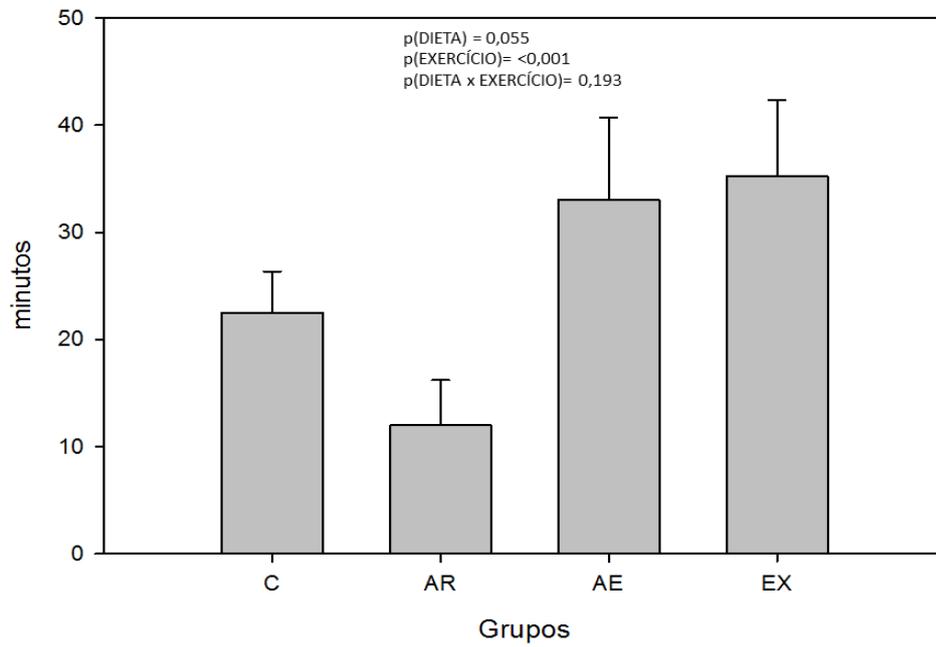


Gráfico 2 – Tempo total do teste observado pela exaustão ou manutenção no consumo máximo de oxigênio mesmo com o incremento de velocidade no grupos exercício (EX), controle (C), tratados com ácido retinóico (AR) e submetidos à ambos os tratamentos (AE)

VELOCIDADE FINAL DO TESTE DE ESFORÇO

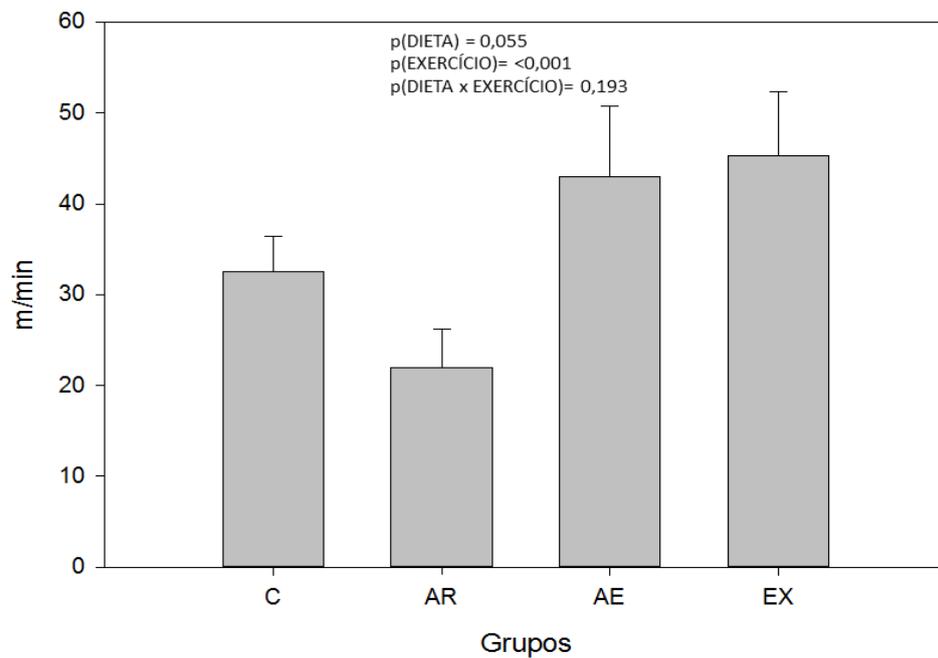


Gráfico 3 – Velocidade que os animais apresentaram fadiga, impossibilitando-os de continuar a corrida.

VO₂ MÁXIMO RELATIVO DO TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO

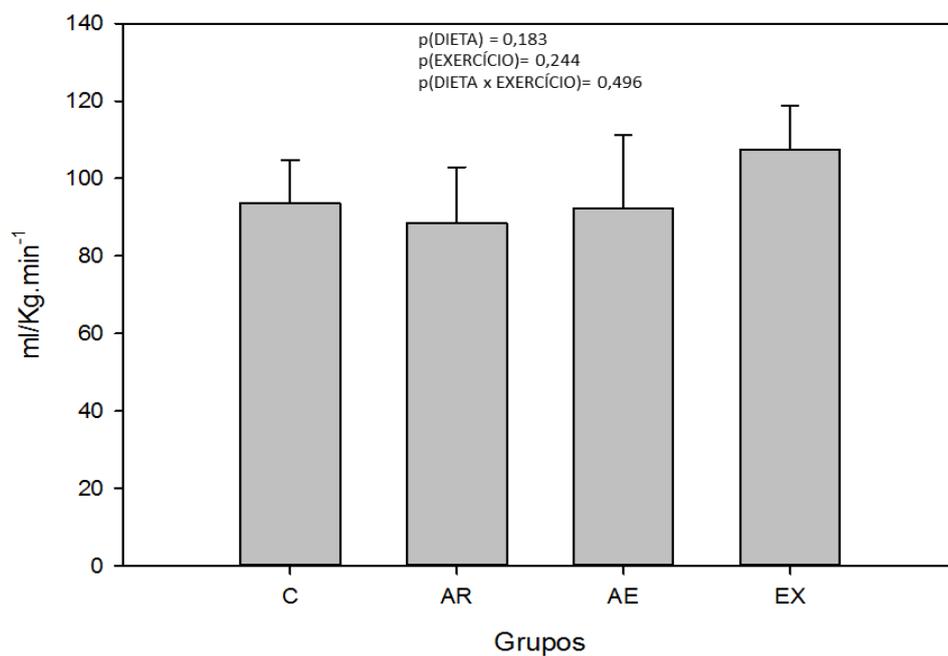


Gráfico 4 – Volume de oxigênio máximo registrado nos últimos 3 minutos do estágio que se estabeleceu a exaustão.

PERCENTUAL DO $\dot{V}O_2$ MÁXIMO NA VELOCIDADE DE 25 m/min

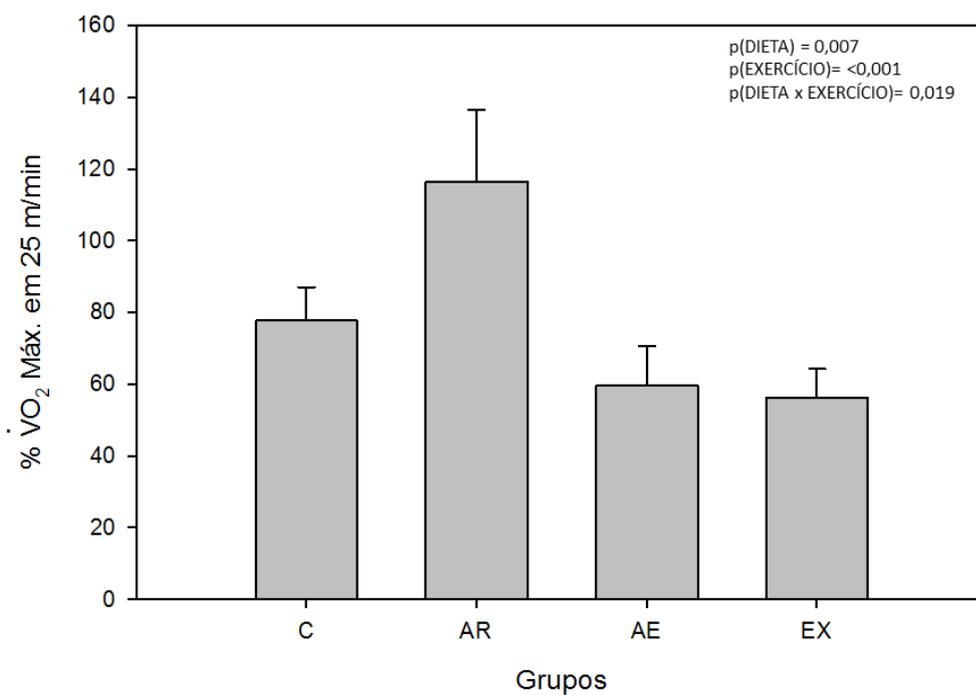


Gráfico 5 – Percentual do VO₂ máximo correspondente à 25 m/min que foi a intensidade utilizada no treinamentos dos animais submetidos ao exercício físico.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados morfofuncionais obtidos pelo estudo ecocardiográfico após quatro meses de tratamento estão ilustrados nas Tabelas 1 e 2.

Na análise das variáveis que demonstram alterações morfológicas, o resultado da avaliação evidenciou aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) corrigido pelo peso corporal (EX:17,9±1,4 mm/kg; C:17,4±1,5 mm/kg; AE:17,8±1,6 mm/kg; AR:16,2±1,3 mm/kg; p EXERCÍCIO: 0,005; p DIETA: 0,053; p DIETA x EXERCÍCIO: 0,120) (Gráfico 6) e do Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo (EX:1,7±0,2 g/kg; C:1,6±0,2 g/kg; AE:1,7±0,2 g/kg; AR:1,5±0,1 g/kg; p EXERCÍCIO: 0,029; p DIETA: 0,0068; p DIETA x EXERCÍCIO: 0,087) (Gráfico 7) apresentaram diferenças significativas em relação ao exercício físico.

Como demonstrado na Tabela 2, a suplementação com ácido retinóico interferiu nos resultados que caracterizaram alterações da função cardíaca, apresentando maior relação E/A (EX:1,3±0,2; C:1,4±0,2; AE:1,5±0,3; AR:1,6±0,2; p EXERCÍCIO:0,178; p DIETA:0,001; p DIETA x EXERCÍCIO:0,648). Em contrapartida, as variáveis A Mitral (EX:55,0(48,0-67,0) cm/s; C:54,0(50,0-70,0) cm/s; AE:52,0(47,0-58,0) cm/s; AR:51,0(46,0-57,0) cm/s; p EXERCÍCIO:0,761; p DIETA:0,016; p DIETA x EXERCÍCIO:0,528), A Septal (EX: 4,2(3,8-4,8) cm/s; C:3,8(3,1-5,3) cm/s; AE:4,1(3,1-4,5) cm/s; AR:3,2(2,8-4,1) cm/s; p EXERCÍCIO:0,090; p DIETA:0,037; p DIETA x EXERCÍCIO:0,865), A Lateral (EX: 4,1(3,1-5,7) cm/s; C:3,8(3,2-4,7) cm/s; AE:4,1(3,1-5,7) cm/s; AR:2,9(2,7-3,8) cm/s; p EXERCÍCIO:0,055; p DIETA:0,038; p DIETA x EXERCÍCIO:0,352) e A Média (EX: 4,3(3,6-5,0) cm/s; C:3,8(3,1-4,4) cm/s; AE:4,0(2,8-4,8) cm/s; AR:3,1(3,1-4,4) cm/s; p EXERCÍCIO:0,045; p DIETA:0,021; p DIETA x EXERCÍCIO:0,530) diminuíram.

O exercício físico influenciou as variáveis relacionadas à função cardíaca (Tabela 2)

aumentando E/E' (EX: 18,4(16,1-20,5); C: 16,4(15,7-18,2); AE:18,8(17,5-23,3); AR:18,3(17,2-19,7); p EXERCÍCIO:0,009; p DIETA:0,141; p DIETA x EXERCÍCIO:0,522) e A' Média (EX: 4,3(3,6-5,0) cm/s; C:3,8(3,1-4,4) cm/s; AE:4,0(2,8-4,8) cm/s; AR:3,1(3,1-4,4) cm/s; p EXERCÍCIO:0,045; p DIETA:0,021; p DIETA x EXERCÍCIO:0,530). Porém diminuiu as ondas E Mitral (EX: 76,8±9,0 cm/s; C:81,4±8,7 cm/s; AE:80,4±4,3; AR:83,6±6,7 cm/s; p EXERCÍCIO:0,035; p DIETA:0,110; p DIETA x EXERCÍCIO:0,718), E' Septal (EX: 4,2(3,4-4,0) cm/s; C:5,0(4,5-5,4) cm/s; AE: 4,1(3,7-4,5) cm/s; AR: 4,5(4,2-5,1) cm/s; p EXERCÍCIO:0,005; p DIETA:0,080; p DIETA x EXERCÍCIO:0,707), E' Lateral (EX: 3,8(3,4-4,0) cm/s; C: 4,8(4,4-5,1) cm/s; AE: 4,4(3,4-5,0) cm/s; AR:4,5(4,2-5,0) cm/s; p EXERCÍCIO:<0,001; p DIETA:0,850; p DIETA x EXERCÍCIO:0,171), E' Média (EX: 4,0(3,5-4,6) cm/s; C: 5,0(4,5-5,2) cm/s; AE: 4,3(3,7-4,5) cm/s; AR: 4,6(4,4-4,8) cm/s; p EXERCÍCIO:<0,001; p DIETA:0,271; p DIETA x EXERCÍCIO:0,308).

Tabela 1 - Variáveis morfológicas avaliadas pelo ecocardiograma

Variáveis	Grupo C (n=19)	Grupo AR (n=19)	Grupo AE (n=15)	Grupo EX (n=19)	p(DIETA)	p(EXERCÍCIO)	p(DIETAxEXERCÍCIO)
PC (g)	479,4±41,2	506,8±50,6	459,5±38,0	463,5±33,6	0,088	0,008	0,272
DDVE/PC (mm/kg)	17,4±1,5	16,2±1,3	17,8±1,6	17,9±1,4	0,053	0,005	0,120
EDPP (mm)	1,3(1,3-1,3)	1,3(1,3-1,3)	1,3±(1,3-1,3)	1,3±(1,3-1,4)	0,541	0,632	0,316
Esp. Rel.	0,3±0,01	0,3±0,01	0,3±0,02	0,3±0,01	0,874	0,897	0,913
IMVE (g/kg)	1,6±0,2	1,5±0,1	1,7±0,2	1,7±0,2	0,068	0,029	0,087
AE/PC (mm/kg)	11,3±1,0	10,6±1,1	11,4±1,4	11,3±0,7	0,251	0,179	0,108

C: controle; AR: ácido retinóico; AE: ácido retinóico exercício; EX: exercício; PC: Peso corporal; DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; EDPP: Espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; Esp.Rel.: espessura relativa do VE; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; AE: Diâmetro do átrio esquerdo. Os dados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Tukey.

Tabela 2 - Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma

Variáveis	Grupo C (n=19)	Grupo AR (n=19)	Grupo AE (n=15)	Grupo EX (n=19)	p(DIETA)	p(EXERCÍCIO)	p(DIETAxEXERCÍCIO)
FC (bpm)	287,2±36,8	279,7±28,5	282,6±24,9	298,8±41,6	0,147	0,373	0,590
% Enc. Endo (%)	52,7±5,3	52,1±5,1	50,6±2,7	53,1±3,9	0,167	0,611	0,375
E/A	1,4±0,2	1,6±0,2	1,5±0,3	1,3±0,2	0,001	0,178	0,648
E/E'	16,4(15,7-18,2)	18,3(17,2-19,7)	18,8(17,5-23,3)	18,4(16,1-20,5)	0,141	0,009	0,522
E Mitral (cm/s)	81,4±8,7	83,6±6,7	80,4±4,3	76,8±9,0	0,110	0,035	0,718
A Mitral (cm/s)	54,0(50,0-70,0)	51,0(46,0-57,0)	52,0(47,0-58,0)	55,0(48,0-67,0)	0,016	0,761	0,528
E' Septal (cm/s)	5,0(4,5-5,4)	4,5(4,2-5,1)	4,1(3,7-4,5)	4,2(3,4-4,0)	0,080	0,005	0,707
A' Septal (cm/s)	3,8(3,1-5,3)	3,2(2,8-4,1)	4,1(3,1-4,5)	4,2(3,8-4,8)	0,037	0,090	0,865
S Septal (cm/s)	3,7(3,4-4,0)	3,4(3,3-3,9)	3,6(3,3-3,6)	3,6(3,4-4,0)	0,231	0,555	0,276
E' Lateral (cm/s)	4,8(4,4-5,1)	4,5(4,2-5,0)	4,4(3,4-5,0)	3,8(3,4-4,0)	0,850	<0,001	0,171
A' Lateral (cm/s)	3,8(3,2-4,7)	2,9(2,7-3,8)	4,1(3,1-5,7)	4,1(3,1-5,7)	0,038	0,055	0,352
S Lateral (cm/s)	4,0±0,5	3,9±0,4	4,0±0,4	4,0±0,3	0,949	0,430	0,430
E' Média (cm/s)	5,0(4,5-5,2)	4,6(4,4-4,8)	4,3(3,7-4,5)	4,0(3,5-4,6)	0,271	<0,001	0,308
A' Média (cm/s)	3,8(3,1-4,4)	3,1(2,7-3,4)	4,0(2,8-4,8)	4,3(3,6-5,0)	0,021	0,045	0,530
S Média (cm/s)	3,8±0,3	3,7±0,3	3,8±0,4	3,8±0,3	0,460	0,394	0,254
Fração de Ejeção	0,89±0,03	0,88±0,03	0,87±0,02	0,89±0,02	0,197	0,811	0,412

C: controle; AR: ácido retinóico; AE: ácido retinóico exercício; EX: exercício; FC: Frequência cardíaca; % enc. Endo.: Porcentagem de encurtamento endocárdico; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Variáveis normalizadas para realização do teste de ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Tukey.

DDVE/PC

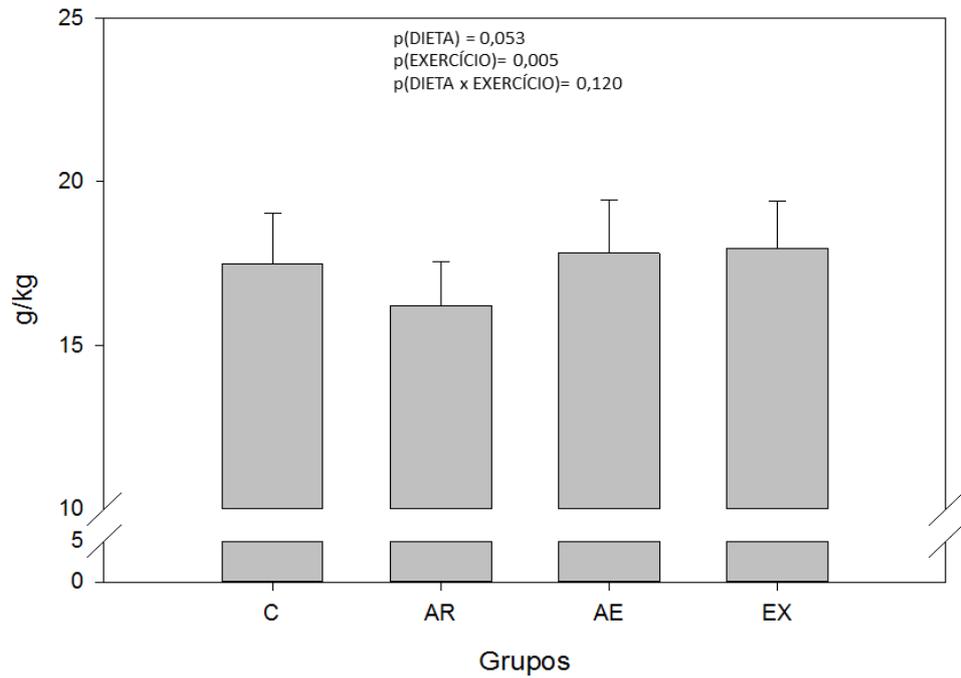


Gráfico 6 –Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal nos grupos exercício (EX), controle (C), tratados com ácido retinóico (AR) e submetidos à ambos os tratamentos (AE)

ÍNDICE DE MASSA DO VENTRÍCULO ESQUERDO

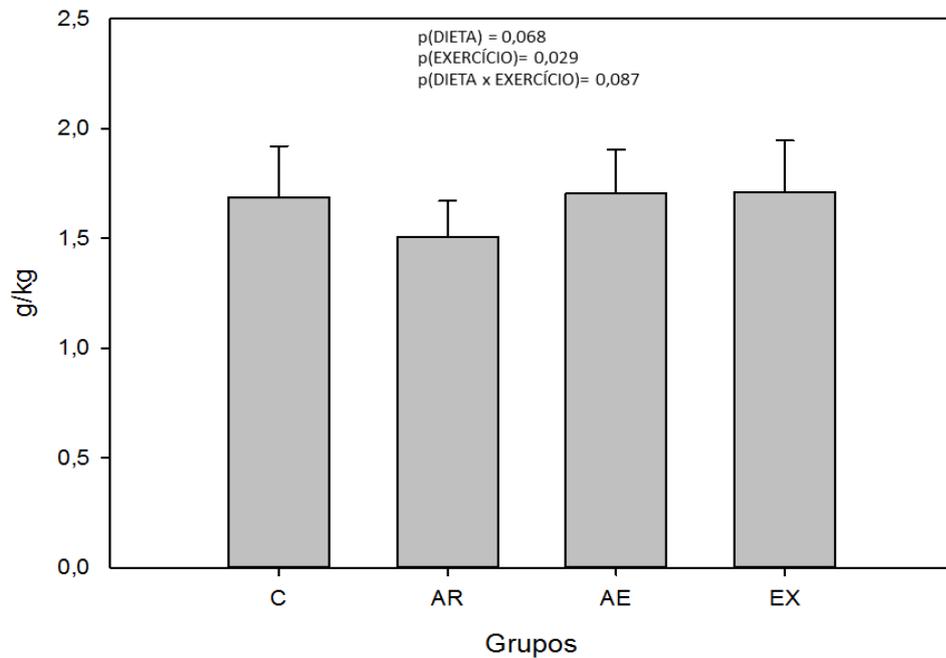


Gráfico 7 –Índice de massa do ventrículo esquerdo nos grupos exercício (EX), controle (C), tratados com ácido retinóico (AR) e submetidos à ambos os tratamentos (AE)

Coração isolado: preparação de Langendorff

Os dados obtidos no estudo do coração isolado estão apresentados na tabela 3 e evidenciaram que a suplementação com ácido retinóico influenciou a derivada positiva (EX: 2875(2250-3375) mmHg/s; C: 2875(2500-3000) mmHg/s; AE: 2000(1875-2250) mmHg/s; AR: 2250(1500-3375)mmHg/s; p EXERCÍCIO:0,429; p DIETA:0,024; p DIETA x EXERCÍCIO:0,159), a derivada negativa (EX: 2375(1750-2625) mmHg/s; C: 2125(1875-2375) mmHg/s; AE: 1500(1250-1875) mmHg/s; AR: 1875(1250-52750) mmHg/s; p EXERCÍCIO: 0,533; p DIETA: 0,039; p DIETA x EXERCÍCIO :0,070) e a Pressão Sistólica Máxima (EX: 140,7±13,2 mmHg; C: 113,9±11,1 mmHg; AE: 108,5±11,1 mmHg; AR:119,2±23,2 mmHg; p EXERCÍCIO: 0,747; p DIETA: 0,<0,001; p DIETA x EXERCÍCIO: 0,159).

Tabela 3- Dados do estudo do coração isolado

Variável	Grupo C (n=7)	Grupo AR (n=7)	Grupo AE (n=7)	Grupo EX (n=7)	p(DIETA)	p(EXERCÍCIO)	p(DIETAxEXERCÍCIO)
+ dp/dt max (mmHg/s)	2875(2500-3000)	2250(1500-3375)	2000(1875-2250)	2875(2250-3375)	0,024	0,429	0,159
- dp/dt max (mmHg/s)	2125(1875-2375)	1875(1250-2750)	1500(1250-1875)	2375(1750-2625)	0,039	0,533	0,070
PS (mmHg)	113,9±11,1	119,2±23,3	108,5±11,1	140,7±13,2	<0,001	0,747	0,159

C: controle; AR: ácido retinóico; AE: ácido retinóico exercício; EX: exercício; + dp/dt max: derivada positiva máxima de pressão; - dp/dt max: derivada negativa máxima de pressão; PS: pressão sistólica máxima. Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Variável normalizada para realização do teste ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Tukey.

Estudo morfométrico

Estão apresentados abaixo (Tabela 4) os dados dos materiais biológicos analisados. Nenhum dos tratamentos modificou o peso úmido tanto do fígado, do pulmão, do VE e do VD. Porém quando o VE foi corrigido pelo peso do animal (Gráfico 8), apresentou diferença significativa nos grupos tratados com exercício físico (EX: $2,1 \pm 0,1$ g/kg; C: $1,9 \pm 0,1$ g/kg; AE: $2,0 \pm 0,2$ g/kg; AR: $1,9 \pm 0,1$ g/kg; p EXERCÍCIO: 0,005; p DIETA: 0,957; p DIETA x EXERCÍCIO: 0,820).

Tabela 4- Variáveis morfométricas

Variável	Grupo C (n=18)	Grupo AR (n=19)	Grupo AE (n=14)	Grupo EX (n=19)	p(DIETA)	p(EXERCÍCIO)	p(DIETAxEXERCÍCIO)
VE (g)	0,8±0,1	0,9±0,0	0,9±0,1	0,9±0,1	0,334	0,737	0,142
VD (g)	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,942	0,198	0,292
PULMÃO (g)	2,5±0,4	2,1±0,3	2,5±0,5	2,2±0,3	0,993	0,551	0,028
FÍGADO (g)	12,7±1,6	13,5±1,4	14,3±2,1	13,4±1,4	0,119	0,162	0,921
VE/PC (g/kg)	1,9±0,1	1,9±0,2	2,0±0,2	2,1±0,1	0,957	0,005	0,820

C: controle; AR: ácido retinóico; AE: ácido retinóico exercício; EX: exercício; PC: Peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média e desvio padrão. Variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Tukey.

VE/PESO CORPORAL

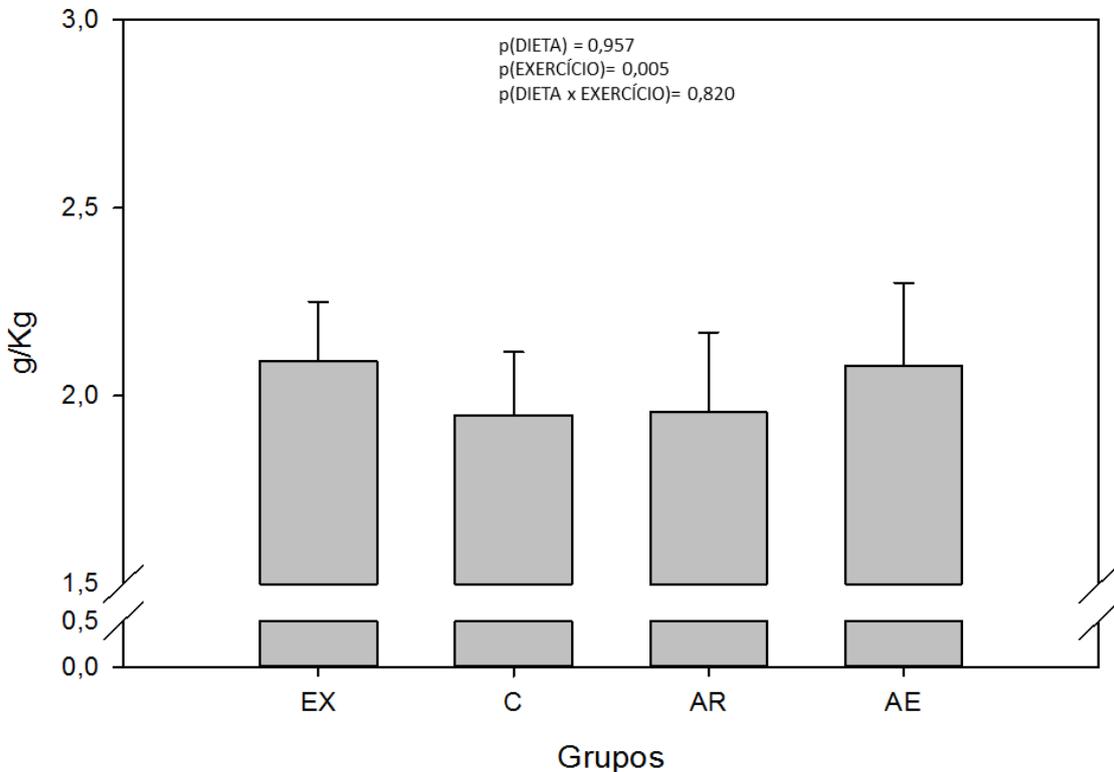


Gráfico 8 –Relação entre o peso úmido do ventrículo esquerdo com o peso corporal nos grupos exercício (EX), controle (C), tratados com ácido retinóico (AR) e submetidos à ambos os tratamentos (AE)

Estudo histopatológico

Os resultados apresentados pelas análises da área seccional do miócito (Gráfico 8) e porcentagem de colágeno estão demonstradas na tabela 5. Em relação ao percentual de colágeno presente no material analisado, não foi observada diferença entre os grupos. Entretanto, os grupos apresentaram diferenças significativas quanto à área seccional do miócito (EX: $5129,9 \pm 665,1 \mu\text{m}$; C: $3470,1 \pm 416,0 \mu\text{m}$; AE: $3868,6 \pm 562,5 \mu\text{m}$; AR: $3838,7 \pm 608,5 \mu\text{m}$; p EXERCÍCIO: $<0,001$; p DIETA: 0,049; P DIETA x EXERCÍCIO: $<0,001$).

Tabela 5- Estudo histológico

Variável	Grupo C (n=7)	Grupo AR (n=7)	Grupo AE (n=7)	Grupo EX (n=7)	p(DIETA)	p(EXERCÍCIO)	p(DIETAxEXERCÍCIO)
ASM (μm)	3470,1 \pm 416,0	3838,7 \pm 608,5	3868,6 \pm 562,5	5129,9 \pm 665,1	0,049	<0,001	<0,001
IC (%)	4,1 \pm 0,2	3,9 \pm 0,5	4,4 \pm 0,3	4,3 \pm 0,6	0,724	0,104	0,330

C: controle; AR: ácido retinóico; AE: ácido retinóico exercício; EX: exercício. ASM: área seccional do miócito; IC: Índice de colágeno. Dados expressos em média e desvio padrão. Variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Tukey.

ÁREA SECCIONAL DOS MÍOCITOS

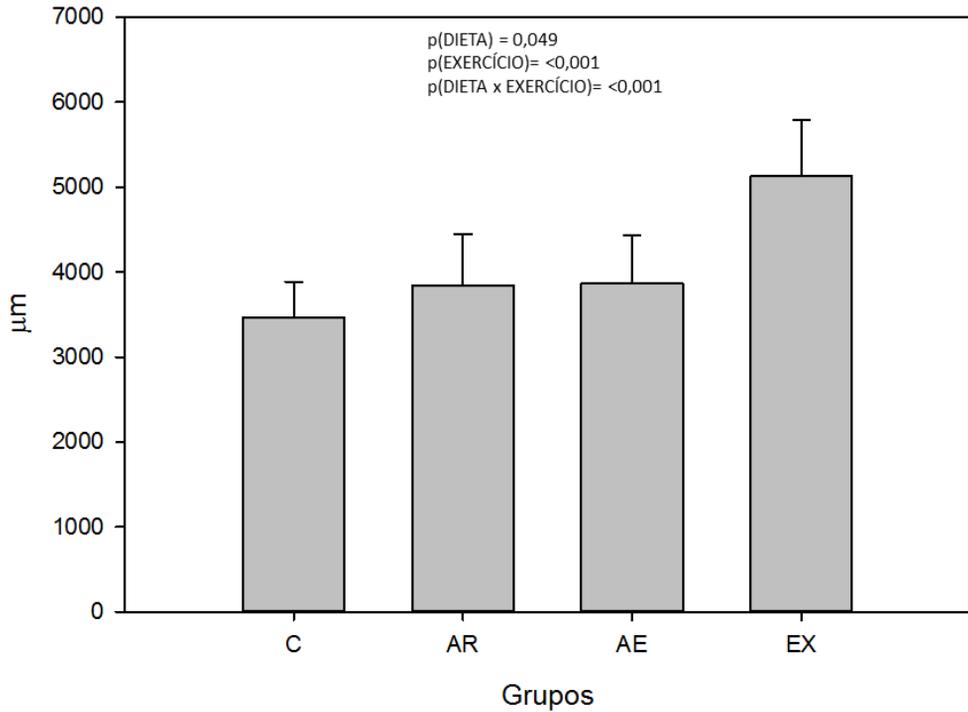
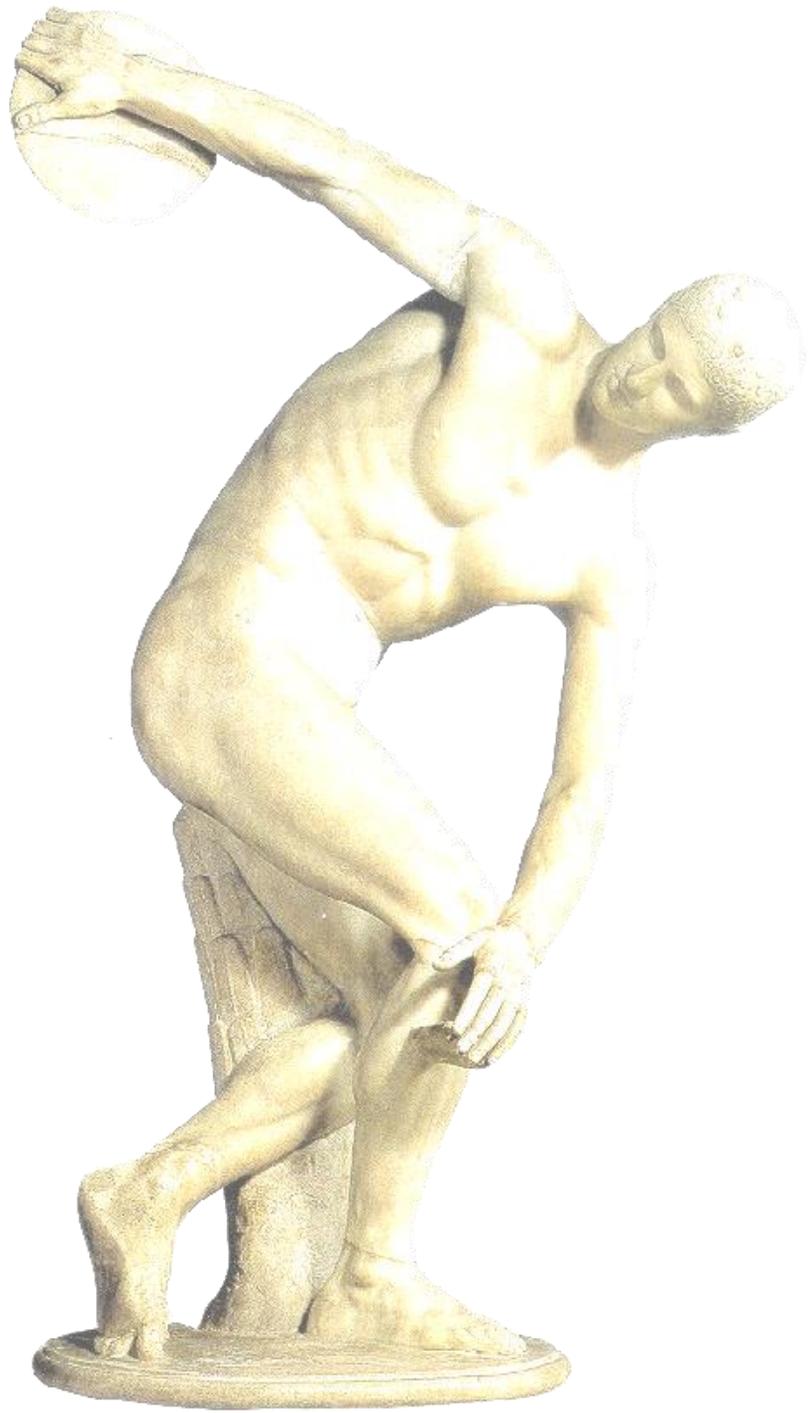


Gráfico 8 –Área seccional dos miócitos grupos exercício (EX), controle (C), tratados com ácido retinóico (AR) e submetidos à ambos os tratamentos (AE)



6. DISCUSSÃO

6. Discussão

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a influência do exercício físico na remodelação cardíaca encontrada na suplementação do ácido retinóico. Nossos resultados demonstraram que o ácido retinóico resultou em remodelação cardíaca deletéria e que o exercício físico atenuou essa remodelação.

O exercício físico realizado na velocidade utilizada no treinamento foi classificado em estudos anteriores como de intensidade moderada. No estímulo, a maior quantidade de adenosina trifosfato (ATP) originou da via aeróbia o que explica a manutenção prolongada da corrida (39). Assim, a combinação entre volume e intensidade foi responsável por adaptações fisiológicas cardíacas (3).

Estudos clínicos e experimentais têm associado a melhora do condicionamento aeróbico às adaptações cardiovasculares (40-42). Esses achados demonstram melhora da função cardíaca (43-46) e dos mecanismos celulares que levam à hipertrofia dos miócitos sem acúmulo de colágeno (46-49). Essas modificações são necessárias para a otimização do fornecimento de oxigênio no miocárdio e garantir o bombeamento necessário de nutrientes para suprir a demanda metabólica (50).

Em nossos resultados, assim como nos trabalhos citados anteriormente, foi encontrada hipertrofia cardíaca evidenciada pelo aumento das cavidades cardíacas, da massa e da área seccional do miócito, sem acúmulo de colágeno (51,52). A adaptação à corrida foi demonstrada pelo menor percentual do VO₂ máximo na velocidade de treinamento, duração e velocidade final no teste de esforço.

Portanto, podemos inferir, pelo conjunto dos resultados obtidos, que o exercício físico, isoladamente, resultou em remodelação cardíaca fisiológica.

A vitamina A tem sido objeto de vários estudos às modificações cardíacas. O ácido retinóico tem papel essencial no desenvolvimento cardíaco, agindo por meio de receptores nucleares específicos: RAR e RXR. No embrião, a quantidade de ácido retinóico é regulada para garantir o desenvolvimento embrionário ideal. Em trabalho que utilizou fetos de camundongos, a deficiência desse composto causou a morte durante o desenvolvimento fetal. Neste contexto observou-se defeito no coração desses animais, evidenciado pela parede ventricular com baixa espessura levando à dificuldade de adaptar-se ao crescimento (53). Observa-se, portanto, que o ácido retinóico é importante elemento na fase embrionária do desenvolvimento cardíaco.

Na fase pós embrionária, o ácido retinóico também parece modular a morfologia e função cardíaca. Estudo realizado em nosso laboratório, utilizando todo trans ácido retinóico (0,3 mg/kg ração) durante 90 dias em ratos saudáveis, resultou no aumento da massa do ventrículo esquerdo e da área seccional do miócito com manutenção da geometria normal ventricular. Os parâmetros funcionais apresentaram melhora observando-se aumento na velocidade de contração e do relaxamento ventricular. Quanto ao colágeno intersticial, não ocorreu alterações que demonstrassem fibrose. Esses achados foram semelhantes às adaptações encontradas no exercício físico (26).

Por outro lado, o ácido retinóico tem papel inibitório na remodelação cardíaca em

modelos de agressão. Em animais hipertensos, a utilização deste composto abrandou a hipertrofia das artérias intramiocárdicas e intrarenal e a fibrose ventricular (54). A atenuação da expressão do sistema renina-angiotensina em animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio amenizou a hipertrofia cardíaca utilizando dose semelhante à deste trabalho. Outros estudos indicam que o ácido retinóico pode atenuar a hipertrofia cardíaca com a interferência de diferentes mecanismos como pela endotelina-1, angiotensina II e catecolaminas (23,54-56).

Nas análises realizadas em nosso trabalho, o grupo tratado com ATRA apresentou hipertrofia cardíaca, caracterizada pelo aumento da área seccional. Em contrapartida, essa intervenção demonstrou menor função sistólica e diastólica, representada pela diminuição das derivadas positiva e negativa, respectivamente. Assim, o conjunto dos nossos resultados nos leva a concluir que a utilização dessa intervenção, por tempo mais prolongado que tempo utilizado em estudo anterior, resultou em remodelação cardíaca deletéria.

O principal objetivo de nosso estudo foi verificar os efeitos da associação dos tratamentos. Nesse sentido, quando somados o exercício físico e a suplementação de ácido retinóico, ocorreram melhoras no percentual do consumo de oxigênio correspondente à velocidade de treinamento, tempo final e velocidade final para exaustão no teste de esforço. Em relação aos efeitos morfológicos, verificamos atenuação do processo de hipertrofia induzido pelo ácido retinóico, evidenciado pela manutenção da área seccional dos miócitos. Portanto, os achados citados acima indicam que o exercício físico atenuou a remodelação cardíaca

deletéria associada com a suplementação de ácido retinóico.



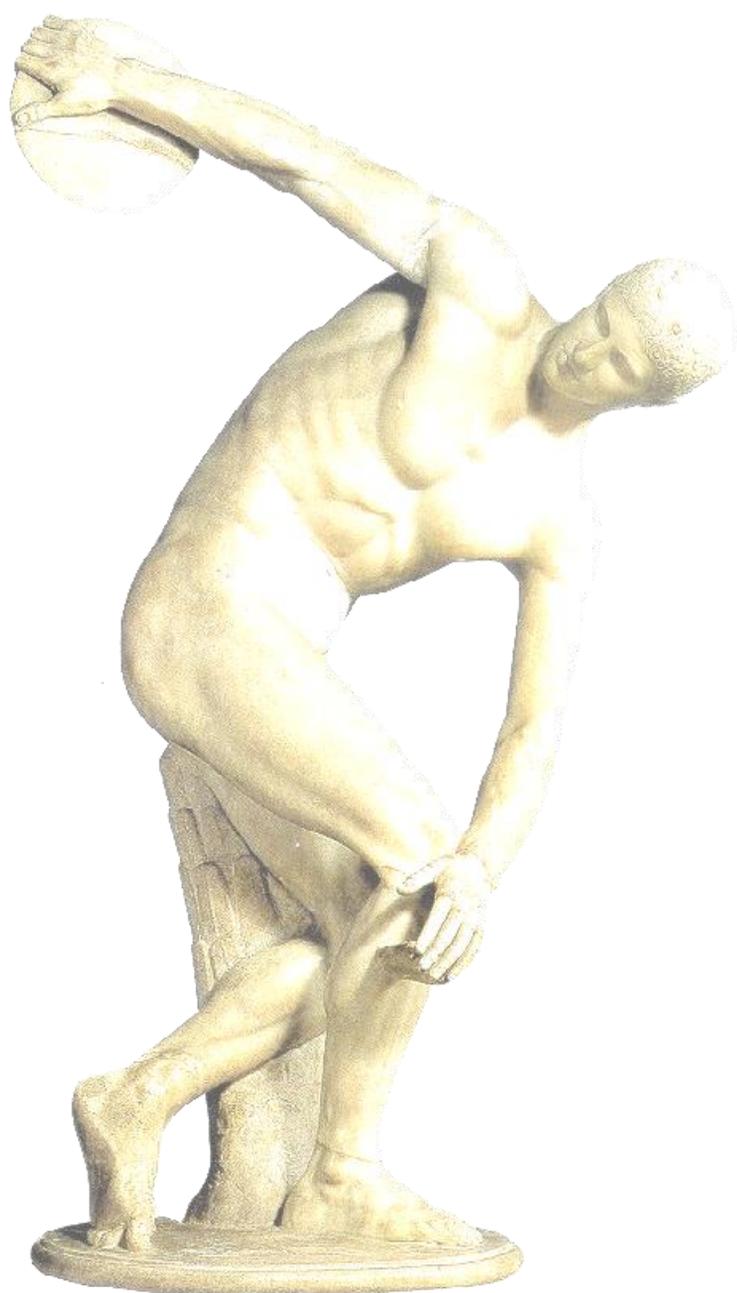
7. CONCLUSÃO

7. Conclusão

Nossos dados sugerem que o exercício físico moderado e a suplementação com ácido retinóico, isoladamente, induzem remodelação cardíaca.

A remodelação induzida pelo ácido retinóico foi acompanhada por piora das funções sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo, condizentes com situações patológicas.

O exercício físico atenuou a remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico.



8. REFERÊNCIAS

8. Referências

- 1) Oláh A, Németh BT, Mátyás C, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *Int J Cardiol.* 2014; In press.
- 2) Scharhag J, George K, Shave R, et al. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40:1408-1415.
- 3) Shave R, Baggish A, George K, et al. Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms, and implications. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:169-176.
- 4) Mutusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52: 366-376.
- 5) Fagard R. Athlete's heart. *Heart.* 2003; 89: 1455–1461.
- 6) Pelliccia A, Maron MS, Maron BJ. Assessment of left ventricular hypertrophy in a trained athlete: differential diagnosis of physiologic athlete's heart pathologic hypertrophy. *Prog Cardiovasc Dis* 2012; 54: 387-396.
- 7) Wang S, Ma JZ, Zhu SS, et al. Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Eur J Appl Physiol.* 2008; 104: 549–555.

- 8) Mezzani A, Corrà U, Giannuzzi P. Central adaptations to exercise training in patients with chronic heart failure. *Heart Fail Rev.* 2008; 13: 13-20.
- 9) McKelvie RS. Exercise training in patients with heart failure: clinical outcomes, safety, and indications. *Heart Fail Rev.* 2008; 13: 3-11.
- 10) Kemi OJ, Wisløf U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol.* 2010; 199: 425-439.
- 11) Helgerud J. Central and Peripheral Limitations of Aerobic Endurance in Distance Runners (PhD thesis). Trondheim, Norway: Norwegian University of Science and Technology, 1996.
- 12) Anversa P, Beghi C, Levicky V, McDonald SL, and Kikkawa Y. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by strenuous exercise in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1982; 243: H856–H861.
- 13) Anversa P, Levicky V, Beghi C, McDonald SL, and Kikkawa Y. Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 1983; 52: 57–64.
- 14) Møkelke EA, Palmer BM, Cheung JY, and Moore RL. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997; 273: H1193–H1197.

- 15) Moore RL, Musch TI, Yelamarty RV, Scaduto-RC J, Semanchick AM, Elensky M, and Cheung JY. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1993; 264: C1180–C1189.
- 16) White FC, Witzel G, Breisch EA, Bloor CM, and Nimmo LE. Regional capillary and myocyte distribution in normal and exercise trained male and female rat hearts. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1988; 2: 247–253.
- 17) Billman GE. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H1171–H1193.
- 18) Molé PA. Increased contractile potential of papillary muscles from exercise-trained rat hearts. *Am J Physiol.* 1978; 234: H421-425.
- 19) Bersohn MM, Scheuer J. Effects of physical training on end-diastolic volume and myocardial performance of isolated rat hearts. *Cir Res.* 1977; 40: 510-516.
- 20) Atchley AF, Douglas P. Left ventricular hypertrophy in athletes: morphologic features and clinical correlates. *Cardiol Clin.* 2007; 25: 371-382.
- 21) Dawson MI. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des.* 2000; 6(3):311-325.

- 22) Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 1996; 10: 940-954.
- 23) Paiva SAR, Matsubara LS, Matsubara B B, et al. Retinoic Acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr.* 2005; 135: 2326-2328.
- 24) Lu L, Yao T, Zhu Y, et al. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intrarenal arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H1370–H1377.
- 25) Choudhary R, Palm-Leis A, Scott RC, et al. All-trans retinoic acid prevents development of cardiac remodeling in aortic banded rats by inhibiting the rennin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 2008; 294: H633-644.
- 26) Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284: H2242-2246.
- 27) Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of

Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18:1440-1463.

- 28) Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Cloner R, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-512.
- 29) Spadaro J, Fishbein M, Hare C, Pfeffer M, Maroko P. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980;104:179-183.
- 30) Sjaastad I, Sejersted O, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000;89:1445-1454.
- 31) Fioretto JR, Queiroz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:H1327-1333.
- 32) Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res.* 2002;22:1353-1364.
- 33) Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, et al. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic

- pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:325-330.
- 34) Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91:2642-2654.
- 35) Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:1550-1558.
- 36) Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr*. 1997;10:169-178.
- 37) Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:161-167.
- 38) Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1131-1136.

- 39) Mcardle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercicio: energia, nutricao e desempenho humano. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2008.
- 40) Arvola P, Wu X, Ka'ho'nen M, Makynen H, Riutta A, Mucha I. Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. *Cardiovasc Res.* 1999;43:992–1002.
- 41) Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003;107: 3152– 3158.
- 42) Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;98:2709–2715.
- 43) Giannuzzi P, Temporelli PL, Corra U, Tavazzi LELVD-CHF Study Group. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction and Chronic Heart Failure (ELVD-CHF) Trial. *Circulation* 2003;108:554– 559.

- 44) Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff U, Ellingsen Ø. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2002;93:1301–1309.
- 45) Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Intensity-controlled treadmill running in rats: Vo₂max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1301–1310.
- 46) Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisva^og V, Currie S, Smith GL, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 2001;50:495–508.
- 47) Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;54:162–174.
- 48) Zhang L-Q, Zhang X-Q, Musch TI, Moore RL, Cheung JY. Sprint training restores normal contractility in postinfarction myocytes. *J Appl Physiol* 2000;89:1099–1105.
- 49) Zhang LQ, Zhang X-Q, Ng Y-C, Rothblum LI, Musch TI, Moore RL, et al. Sprint training normalizes Ca²⁺transients and SR function in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol*. 2000;89:38 – 46.

- 50) Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;98:2709–2715.
- 51) Toblli, J.E.; Cao, G.; Derosa, G.; Forcada, P. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta1 in obese Zucker rats by perindopril. *Heart*. 2005; 91:80-86.
- 52) Toblli, J.E.; Cao, G.; Rivas, C.; Derosa, G.; Domecq, P. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces lipid deposits in myocardium and improves left ventricular function of obese Zucker rats. *Obesity*. 2006; 14:1586-1595.
- 53) Kartner P, Grondona J, Mark M, et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*. 1994; 78:987-1003.
- 54) Wang HJ, Zhu YC, Yao T. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2002; 92:2162-2168.
- 55) Wu JM, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25 (OH)₂ vitamin D-3 and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1996; 97:1577-1588.

56) Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial-cell hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:7391- 7395.