

*Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho"  
Faculdade de Medicina de Botucatu*

# **Remodelação Cardíaca induzida pela deficiência de vitamina D em ratos.**

***Heloisa Balan Assalin***

*Botucatu  
2011*

*Heloisa Balan Assalin*

*Remodelação Cardíaca induzida pela  
deficiência de vitamina D em ratos.*

Dissertação Apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica - 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 Paiva*

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

*Botucatu*

*2011*

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP  
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago - CRB 8/4716*

Assalin, Heloisa Balan.

Remodelação cardíaca induzida pela deficiência de vitamina D em ratos /  
Heloisa Balan Assalin. - Botucatu, 2011

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

Orientador: Sérgio Alberto Rupp de Paiva

Co-Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Capes: 40101002

1. Coração - Doenças - Aspectos nutricionais. 2. Deficiência de vitamina D.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina D; Estresse oxidativo; Nrf-2;  
Remodelação cardíaca

*Dedicatória*

---

*A **Deus**, por me abençoar e dar forças para vencer todos os desafios.*

*Aos meus pais, **José Carlos** e **Roseli**, por serem meus exemplos de vida, caráter, dedicação, humildade e amor. Obrigada por desde o início me incentivar a buscar a realização de todos os meus sonhos.*

*Ao meu irmão **Carlos Eduardo**, pelo incentivo, carinho e amizade.*

*Ao **Luiz Gustavo**, pelo seu amor, pela infinita compreensão, pela confiança e por me mostrar, a cada dia, um jeito mais leve de viver a vida. Enfim, por me fazer extremamente feliz!*

## *Agradecimentos Especiais*

---

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Sérgio Alberto Rupp de Paiva**, pela oportunidade de ter sido sua orientada, por todos os seus ensinamentos imprescindíveis na minha formação acadêmica, pela convivência, pela amizade e pelas risadas. Espero ter conseguido retribuir com a seriedade deste trabalho a confiança em mim depositada.*

*Ao Prof. Dr. Leonardo **Antonio Mamede Zornoff**, pela participação na co-autoria desta dissertação. Obrigada pela amizade, ensinamentos e incentivo.*

## *Agradecimientos*

---

*À Bruna Paola Murino Rafacho e à Priscila Portugal dos Santos pela amizade e pelas contribuições imprescindíveis durante a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!*

*Ao Dr. Marcos Ferreira Minicucci, pelos grandes ensinamentos no laboratório, pela amizade e pela disponibilidade em sempre me ajudar.*

*À Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla, pelas sugestões oferecidas durante o Exame de Qualificação e pelos ensinamentos no decorrer deste projeto. Obrigada pela amizade e pelas contribuições.*

*À Dra Beatriz Bojikian Matsubara pelas grandiosas contribuições com a finalização deste trabalho, obrigada pelas sugestões e pelas gentilezas durante o Exame de Qualificação.*

*A todos os docentes do Departamento de Clínica Médica, em especial à Dra. Meliza Goe Roscari pelas contribuições na realização do ecocardiograma.*

*A todos os funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica, do Departamento de Clínica Médica e da seção de Pós-Graduação, por toda competência e suma importância no transcorrer deste projeto. Em especial ao José Carlos Georgete, Mario Bruno, Corina Corrêa, Fernanda Fontes, Elenize Jamas e Nathanael Salles. Obrigada pelos auxílios e pela amizade.*

*Aos amigos do Laboratório, pela troca de conhecimentos e por todo o companheirismo.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual seria inviável a realização deste trabalho.*

“Se você pensa que é capaz ou que é incapaz de realizar algo,  
de qualquer maneira você está certo”

Henry Ford

*Resumo*

---

---

A deficiência de vitamina D está associada a aumento de morbidade e mortalidade em pacientes com doenças cardiovasculares. Além disso, estudos experimentais associam a deficiência de vitamina D a alterações cardíacas compatíveis com a remodelação cardíaca. No entanto, não existem estudos que avaliam o efeito do tempo de uso da dieta deficiente em vitamina D e que avaliam influência desta condição sobre o estresse oxidativo cardíaco e a modulação desta condição pelo fator de transcrição nuclear Nrf-2. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da dieta deficiente em vitamina D no coração de ratos e verificar se as alterações são tempo-dependentes, além de avaliar a influência da deficiência de vitamina D sobre o estresse oxidativo cardíaco e sua modulação pelo Nrf-2. **Métodos:** Ratos Wistar foram alocados em quatro grupos: C2 (n=24) – recebeu 1000 UI de vitamina D por kg de ração e foram mantidos em luz fluorescente por período de 2 meses; D2 (n=22) – recebeu dieta isenta de vitamina D por kg de ração e foram mantidos em luz incandescente por 2 meses; C4 (n=21) – mantidos sob as mesmas condições dos animais do grupo C2, por período de 4 meses; D4 (n=23) – mantidos sob as mesmas condições dos animais do grupo D2, por 4 meses. Após o término do período experimental, foi realizado ecocardiograma e avaliação morfológica e histológica cardíaca, do metabolismo energético e do estresse oxidativo do coração. O teste estatístico aplicado foi o ANOVA de 2 vias e a ANCOVA, com significância de 5%. **Resultados:** Houve interação entre a dieta deficiente em vitamina D e o tempo de uso ao analisarmos a massa do ventrículo esquerdo (C2:  $499,4 \pm 26,5$ ; D2:  $520,3 \pm 27,1$ ; C4:  $584,6 \pm 27,9$ ; D4:  $722,3 \pm 26,5$ ) e a área do átrio direito (C2:  $0,17 \pm 0,01$ ; D2:  $0,16 \pm 0,01$ ; C4:  $0,18 \pm 0,01$ ; D4:  $0,20 \pm 0,01$ ), que foram maiores nos animais do grupo D4 em relação ao C4. Além disso, a atividade da enzima lactato desidrogenase (C2:  $194,7 \pm 13,7$ ; D2:  $195,8 \pm 13,7$ ; C4:  $65,5 \pm 13,7$ ; D4:  $209,3 \pm 13,7$ ) é maior no grupo D4 em relação ao C4, enquanto que a atividade da  $\beta$ -hidroxiacil coenzima A (C2:  $81,9 \pm 4,1$ ; D2:  $56,3 \pm 4,1$ ; C4:  $104,8 \pm 4,1$ ; D4:  $26,9 \pm 4,1$ ) é menor no grupo D4 em relação ao C4 e no grupo D2 em relação ao C2. Animais que receberam dieta deficiente em vitamina D apresentaram aumento no diâmetro diastólico VE corrigido pela tibia (Grupo com

---

vitamina D:  $1,62 \pm 0,02$ ; Grupo sem vitamina D:  $1,68 \pm 0,02$ ), diâmetro sistólico VE corrigido pela tibia (Grupo com vitamina D:  $0,59 \pm 0,02$ ; Grupo sem vitamina D:  $0,67 \pm 0,02$ ), tamanho do átrio esquerdo (Grupo com vitamina D:  $3,58 \pm 0,07$ ; Grupo sem vitamina D:  $3,73 \pm 0,07$ ), fração de colágeno no VE (Grupo com vitamina D:  $3,99 \pm 0,32$ ; Grupo sem vitamina D:  $5,11 \pm 0,41$ ), concentração de hidroperóxido de lipídio (Grupo com vitamina D:  $152,12 \pm 11,05$ ; Grupo sem vitamina D:  $273,41 \pm 11,05$ ) e Nrf-2 (Grupo com vitamina D:  $0,70 \pm 0,05$ ; Grupo sem vitamina D:  $0,93 \pm 0,05$ ) em relação aos animais sem deficiência de vitamina D. Por outro lado, a fração de ejeção (Grupo com vitamina D:  $0,95 \pm 0,00$ ; Grupo sem vitamina D:  $0,93 \pm 0,00$ ), a porcentagem de encurtamento (Grupo com vitamina D:  $63,60 \pm 1,05$ ; Grupo sem vitamina D:  $60,03 \pm 1,04$ ), as atividades das enzimas catalase (Grupo com vitamina D:  $1,48 \pm 0,11$ ; Grupo sem vitamina D:  $1,06 \pm 0,11$ ) e da glutathione peroxidase (Grupo com vitamina D:  $52,32 \pm 2,45$ ; Grupo sem vitamina D:  $37,34 \pm 2,45$ ) são menores nos ratos deficientes de vitamina D em relação não deficientes. **Conclusões:** A deficiência de vitamina D determina hipertrofia e aumento de cavidades cardíacas, piora da função sistólica, aumento da matriz extracelular, alteração no metabolismo energético. Além disso, há aumento no estresse oxidativo cardíaco, que é modulado pela expressão do Nrf-2. A hipertrofia cardíaca e as alterações no metabolismo energético são influenciadas pelo tempo de uso da dieta.

*Abstract*

---

---

Vitamin D deficiency is associated with increased morbidity and mortality in patients with cardiovascular diseases. Moreover, experimental studies associate vitamin D deficiency to heart changes consistent with cardiac remodelling. However, no studies were found in the literature that evaluated the effect of the duration time of the deficient vitamin D diet use and the influence of the condition on cardiac oxidative stress. Also, we are interested in studying the nuclear transcription factor - Nrf-2 influence on oxidative stress response. Therefore, the objective was to evaluate the influence of diet deficient in vitamin D in the rat heart and determine if changes are time-dependent, and evaluate the influence of vitamin D deficiency on oxidative stress and its modulation by Nrf-2. **Methods:** Wistar rats were allocated into four groups: C2 (n = 24) - 1000 IU vitamin D per kg diet and were kept under fluorescent light for 2 months, D2 (n = 22) - free vitamin D diet per kg diet and were kept under incandescent light for 2 months, C4 (n = 21) - kept under the same conditions of group C2, for a period of 4 months, D4 (n = 23) - kept under the same conditions of group D2, for 4 months. Upon completion of the trial period, echocardiography was performed and cardiac morphological, histological, energy metabolism and oxidative stress were measured. The statistical test used was the 2-way ANOVA and ANCOVA, with 5% significance. **Results:** There was an interaction between vitamin D deficient diet and length of use in analyzing the left ventricle mass (C2: 499,4±26,5; D2: 520,3±27,1; C4: 584,6±27,9; D4: 722,3±26,5) and right atrial area (C2: 0,17±0,01; D2: 0,16±0,01; C4: 0,18±0,01; D4: 0,20±0,01), which were higher in group D4 in relation to C4. Moreover, the lactate dehydrogenase activity (C2: 194,7±13,7; D2: 195,8±13,7; C4: 65,5±13,7; D4: 209,3±13,7) was higher in D4 than C4, while the β-hydroxyacyl coenzyme A activity (C2: 81,9±4,1; D2: 56,3±4,1; C4: 104,8±4,1; D4: 26,9±4,1) was lower in D4 than C4 and in D2 than C2. Animals fed vitamin D deficient diet had increase LV diastolic diameter corrected by the tibia (With vitamin D: 1,62±0,02; Without vitamin D: 1,68±0,02), LV systolic diameter corrected by the tibia (With vitamin D: 0,59±0,02; Without vitamin D: 0,67±0,02), left atrial size (With vitamin D: 3,58±0,07; Without vitamin D: 3,73±0,07), collagen fraction (With

---

vitamin D:  $3,99 \pm 0,32$ ; Without vitamin D:  $5,11 \pm 0,41$ ), lipid hydroperoxide concentration (With vitamin D:  $152,12 \pm 11,05$ ; Without vitamin D:  $273,41 \pm 11,05$ ) and Nrf-2 expression (With vitamin D:  $0,70 \pm 0,05$ ; Without vitamin D:  $0,93 \pm 0,05$ ) in comparison of groups with and without vitamin D. Moreover, ejection fraction (With vitamin D:  $0,95 \pm 0,00$ ; Without vitamin D:  $0,93 \pm 0,00$ ), shortening percentage (With vitamin D:  $63,60 \pm 1,05$ ; Without vitamin D:  $60,03 \pm 1,04$ ), catalase (With vitamin D:  $1,48 \pm 0,11$ ; Without vitamin D:  $1,06 \pm 0,11$ ) and glutathione peroxidase (With vitamin D:  $52,32 \pm 2,45$ ; Without vitamin D:  $37,34 \pm 2,45$ ) activities were lower in vitamin D deficient than vitamin sufficient rats. **Conclusions:** Vitamin D deficiency determines increased hypertrophy and cardiac chambers, poor systolic function, increased extracellular matrix, changes in energy metabolism. Moreover, there is an increase in oxidative stress, which is modulated by the expression of Nrf-2. Cardiac hypertrophy and changes in energy metabolism are influenced by the duration time of use of the vitamin D deficient diet.

## *Sumário*

---

Resumo .....	8
Abstract .....	11
Introdução .....	16
Hipótese .....	25
Objetivos .....	27
Materiais e Métodos .....	29
Resultados .....	45
Discussão .....	82
Conclusão .....	93
Bibliografia .....	95
Anexos	
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética .....	103
Anexo 2 – Alteração Título Dissertação.....	104
Anexo 2 – Esclarecimento Técnico Rhooster.....	105

# *Introdução*

---

---

---

A vitamina D é um hormônio esteróide lipossolúvel existente em duas principais formas: ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>), encontrado em plantas e em leveduras; e colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>), sintetizado na pele de animais vertebrados após exposição aos raios solares <sup>(1)</sup>. A exposição solar é a principal forma de obtenção da vitamina D pelo homem <sup>(2)</sup>, sendo responsável por 80 a 90% do suprimento de vitamina D <sup>(3,4)</sup>.

Durante a exposição à luz solar, a radiação ultravioleta B (UVB) é absorvida na epiderme pelo 7-diidrocolesterol e origina a pré-vitamina D<sub>3</sub>, que é rapidamente convertida, por processo dependente de temperatura, em vitamina D<sub>3</sub> <sup>(5,6)</sup>.

A vitamina D ingerida na dieta é absorvida no intestino delgado, na presença de ácidos biliares e dissolvida em gordura. Após a absorção, ela é secretada, ligada aos quilomícrons, no sistema linfático <sup>(1)</sup>.

Após a síntese cutânea ou ingestão na dieta, a vitamina D entra no leito capilar, acoplada à proteína ligadora de vitamina D (DBP) e, por meio da corrente sanguínea, é conduzida ao fígado e aos rins, onde é metabolizada, e dá origem a composto fisiologicamente ativo <sup>(1)</sup>. No fígado, a vitamina D é convertida em 25-hidroxivitamina D (25[OH]D) pela enzima 25-hidroxilase (CYP27A1) <sup>(1)</sup>. Nos rins, a enzima mitocondrial 25-hidroxivitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1) atua formando a 1,25-diidroxitamina D (1,25[OH]<sub>2</sub>D; calcitriol), que é a forma mais ativa da vitamina D <sup>(7)</sup>.

A 25[OH]D é o composto usado para avaliar o estado nutricional relativo à vitamina D e, geralmente é o metabólito avaliado nos testes clínicos <sup>(8)</sup>. Isso ocorre uma vez que a meia-vida plasmática da 25[OH]D é de 3 semanas <sup>(9,10)</sup> enquanto que a meia vida do colecalciferol é de aproximadamente 24 horas <sup>(11)</sup> e a da 1,25[OH]<sub>2</sub>D é de 4 horas <sup>(12)</sup>. Assim, a dosagem de 25[OH]D serve como indicação precisa dos estoques da vitamina D obtidos por ambas as formas, irradiação ultravioleta e ingestão na dieta, por maior período de tempo.

---

Além disso, a concentração de 25[OH]D reduz na proporção em que a vitamina D deixa de ser ingerida ou sintetizada, sendo sua síntese fracamente regulada <sup>(13)</sup>. Por outro lado, a produção renal de 1,25[OH]<sub>2</sub>D é finamente regulada <sup>(14)</sup> pelo hormônio da paratireóide (PTH) <sup>(15)</sup>, baixas concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo <sup>(16)</sup>, e pela própria 1,25[OH]<sub>2</sub>D. A 1,25[OH]<sub>2</sub>D, por meio de mecanismo de *feedback* negativo <sup>(17,18)</sup>, suprime sua própria síntese <sup>(17)</sup> e induz a expressão da enzima 24-hidroxilase (CYP24). Esta enzima transforma a 25[OH]D e também a 1,25[OH]<sub>2</sub>D em 24,25-diidroxivitamina D (24,25[OH]<sub>3</sub>D; ácido calcitróico), solúvel em água<sup>(14)</sup>, que é a forma excretada na urina.

As respostas biológicas induzidas pela vitamina D envolvem ações genômicas, mediadas por receptor nuclear (VDR), e ações não-genômicas, mediadas por proteínas de membrana <sup>(19)</sup>.

O VDR é um receptor nuclear, pertencente à superfamília de receptores hormonais esteróides e que atua como fator de transcrição ligante-dependente <sup>(20)</sup>. O mecanismo de ativação se inicia a partir da ligação de alta afinidade entre a 1,25[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e a região hidrofóbica do VDR <sup>(21)</sup>, induzindo mudança conformacional que permite a formação do complexo transcricional <sup>(22)</sup>. O complexo ativado hormônio-receptor se liga ao receptor rexinóide (RXR), formando heterodímero que por sua vez se liga a sequências hexaméricas específicas do DNA, chamadas elementos responsivos à vitamina D (VDREs). Ligados ao DNA, os heterodímeros recrutam vários complexos protéicos co-regulatórios, que são capazes de alterar o nível de condensação da cromatina, e em seguida, recrutar a RNA polimerase II, dando início à transcrição gênica <sup>(23)</sup>.

A ação não genômica da vitamina D determina ação rápida, uma vez que não envolve a transcrição gênica. Ela envolve a ligação da vitamina D com receptor de membrana, cuja estrutura não está bem caracterizada <sup>(19)</sup>. Os efeitos determinados por esses receptores incluem abertura de canais de cálcio <sup>(24,25)</sup> e de cloro <sup>(26)</sup>, e ativação de algumas vias de sinalização intracelular como ativação de proteína quinase C <sup>(27)</sup>, AMP cíclico, GMP cíclico <sup>(28,29)</sup>

---

e MAP quinases<sup>(28,29)</sup>. A ativação da via das MAP quinases parece ser o elo entre a ativação do receptor de membrana da vitamina D e a ativação do receptor nuclear<sup>(19)</sup>.

Até o momento, não há consenso sobre os valores dos pontos de corte para definir o estado nutricional da vitamina D. Entretanto, é adotado que concentrações séricas da 25[OH]D maiores ou iguais a 75nmol/l (30mg/ml) são consideradas suficientes, concentrações entre 25 e 75 nmol/l são consideradas insuficientes, e abaixo de 25nmol/l (10mg/ml), deficientes<sup>(30)</sup>.

A deficiência de vitamina D é descrita<sup>(31)</sup> e prevalente em todo o mundo<sup>(14)</sup>, e estima-se que atinja cerca de um bilhão de pessoas<sup>(32, 33)</sup>. No Brasil, poucos estudos existem para estimar a prevalência da deficiência de vitamina D na população em geral. Estudo com idosos não-institucionalizados na cidade de São Paulo mostrou que 57% dos idosos apresentavam concentrações menores que 5 nmol/L de vitamina D<sup>(34)</sup>. Em outro estudo na cidade de São Paulo, verificou-se que 71,2% de pacientes institucionalizados e 43,8% de pacientes ambulatoriais apresentavam níveis de 25[OH]D abaixo de 50 nmol/l, sendo que mulheres apresentavam valores consideravelmente mais baixos que os homens<sup>(35)</sup>. Entre os adolescentes saudáveis que residem em cidade do interior de São Paulo, 60% apresentam insuficiência de vitamina D<sup>(36)</sup>. Em Belo Horizonte, 43,2% dos pacientes atendidos em Ambulatório de Endocrinologia apresentaram redução na concentração da 25[OH]D<sup>(37)</sup>.

A deficiência de vitamina D aumenta em proporção a distância ao equador devido ao aumento da filtragem atmosférica da radiação UVB causada pelos ângulos oblíquos dos raios solares em locais de altas latitudes. Adicionalmente, grupos étnicos com pele escura requerem proporcionalmente maior tempo de exposição solar para sintetizar quantidade equivalente de vitamina D quando comparados a pessoas com coloração da pele mais clara<sup>(38, 39)</sup>. Além disso, o aumento de atividades *in door* (internas) e de medidas que minimizam a exposição solar, como o uso de bloqueadores solares, também estão associados à deficiência de vitamina D. A obesidade e o envelhecimento estão, também, associados à deficiência de vitamina D. A obesidade associa-se à deficiência de vitamina D<sup>(40)</sup> provavelmente devido à redução da

---

biodisponibilidade da vitamina D, que é armazenada na gordura dos indivíduos com excesso de tecido adiposo <sup>(41,42)</sup>. A idade avançada reduz a capacidade dos raios UVB induzirem a síntese cutânea da vitamina D, sendo que após igual tempo de exposição solar, pessoas com 70 anos produzem 75% menos vitamina D<sub>3</sub> que pessoas com 20 anos <sup>(43)</sup>.

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos associaram a deficiência de vitamina D a condições de saúde adversas <sup>(14)</sup>. Hipovitaminose D induz diminuição na absorção do cálcio e alteração na atividade óssea e neuro-muscular <sup>(43, 44)</sup>. As conseqüências bem conhecidas da deficiência grave em crianças e adultos são raquitismo <sup>(45)</sup> e osteomalacia <sup>(14)</sup>, respectivamente. No entanto, a presença do VDR em outros tecidos como a próstata, mama, cólon, cérebro, pele, células do sistema imune e coração, e a expressão da enzima 25-hidroxivitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilase em tecidos extra-renais <sup>(46, 47, 48, 49)</sup>, sugerem a atuação direta da vitamina D no metabolismo de outras células e órgãos. Assim, há indícios de que baixa concentração sérica da 25[OH]D está associada a outros efeitos adversos tais como: maior susceptibilidade a infecções e a doenças auto-imunes <sup>(50)</sup>, maior incidência de câncer de mama, cólon e próstata <sup>(51)</sup>, distúrbios neurológicos como esquizofrenia e depressão <sup>(52)</sup> e insuficiência cardíaca <sup>(53)</sup>.

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença de prevalência e incidência elevada em praticamente todo o mundo <sup>(54)</sup>. No Brasil, dados do Ministério da Saúde apontam a IC como responsável por 5,76% do total de óbitos no período de janeiro a junho de 2008 <sup>(55)</sup>. Essa síndrome clínica ocorre a partir de alteração estrutural ou funcional do coração, tornando-o incapaz de ejetar e/ou acomodar sangue dentro de valores pressóricos fisiológicos, determinando limitação funcional <sup>(54)</sup>. A fisiopatologia da IC marca seu início a partir de um evento miocárdico primário que gera disfunção ventricular. Esta, por sua vez, deflagra mecanismos adaptativos associados à ativação neuro-humoral (sistema renina-angiotensina, sistema nervoso simpático, peptídios vasomotores), gerando alterações na forma, estrutura e eficiência mecânica do coração (remodelação ventricular) e alterações periféricas circulatórias,

---

---

havendo também danos secundários oriundos do estresse oxidativo, inflamação e apoptose <sup>(54, 56)</sup>.

A remodelação cardíaca (RC) é uma resposta adaptativa do coração a estímulos hemodinâmicos, neuro-humorais e fatores genéticos, associados à modificação da forma, tamanho, composição e função do coração <sup>(57)</sup>. Tanto estímulos como situações de agressão podem levar à RC, com o objetivo de manter a função do coração estável <sup>(58)</sup>. A extensão da RC está relacionada à intensidade e ao tempo da injúria <sup>(59)</sup>. Em pacientes e animais hipertensos, o tempo de duração da sobrecarga de pressão é preditor das alterações na morfologia cardíaca <sup>(60)</sup>. A fisiopatologia da RC patológica engloba alterações celulares que incluem a hipertrofia de miócitos, necrose <sup>(61)</sup>, apoptose <sup>(62)</sup>, fibrose <sup>(63)</sup>, aumento do conteúdo de colágeno <sup>(64)</sup> e proliferação de fibroblastos <sup>(65)</sup>. Além disso, alterações em citocinas inflamatórias <sup>(66)</sup>, na produção de radicais livres <sup>(67)</sup> e no balanço energético <sup>(68)</sup> estão relacionadas à progressão da RC.

Estudos epidemiológicos e dados clínicos associam à deficiência de vitamina D a maior morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares <sup>(69, 70)</sup>. Em pacientes com IC, observa-se concentração reduzida de 25[OH]D, principalmente entre os que estão em estágio terminal da doença <sup>(70)</sup>. Além disso, as concentrações de 25[OH]D correlacionam-se com a severidade e com o prognóstico da IC <sup>(70)</sup>.

A ação da vitamina D na regulação do metabolismo cardíaco é sugerida pela identificação de receptores para 1,25[OH]<sub>2</sub>D no músculo cardíaco de ratos normais <sup>(71)</sup> e posteriormente a descoberta da presença desses receptores também em humanos <sup>(72)</sup>, bem como a presença de proteínas ligadoras de cálcio dependentes da vitamina D no tecido cardíaco <sup>(73)</sup>.

Alguns estudos utilizando diversos modelos de deficiência de vitamina D comprovam a relação entre algumas alterações cardíacas e a deficiência de vitamina D.

---

---

Weishaar e Simpson (1987), em estudo com ratos submetidos à dieta deficiente em vitamina D por período de seis e nove semanas, mostraram que a deficiência de vitamina D, após nove semanas, esteve associada alterações na função cardiovascular, incluindo aumento na função contrátil de coração isolado e músculo liso vascular, aumento na pressão sanguínea sistólica, bem como aumento no relaxamento miocárdico <sup>(74)</sup>. Esses mesmos autores, em estudo de posterior (1989), mostraram que o consumo de dieta deficiente em vitamina D, após nove semanas, determinou ocorrência de fibrose no tecido cardíaco <sup>(75)</sup>. Além disso, estudo de Weishaar e colaboradores (1990) mostraram que animais submetidos à dieta deficiente em vitamina D por nove semanas apresentaram hipertrofia cardíaca com redução na área de miofibrilas e aumento na quantidade de matriz extracelular no tecido miocárdico, principalmente decorrente do aumento no conteúdo de colágeno <sup>(76)</sup>.

A deleção do gene para o VDR em camundongos também conduziu à hipertrofia cardíaca <sup>(77)</sup>, aumento no tamanho de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e nos níveis do fator natriurético atrial (FNA). Segundo Rahman e colaboradores (2007), a hipertrofia observada nesses camundongos esteve associada à ativação de metaloproteinases dos tipos 2 e 9, bem como à deposição de colágeno e à fibrose <sup>(78)</sup>. Além disso, outros estudos confirmaram que a ausência da sinalização pela vitamina D induz ativação excessiva do sistema renina-angiotensina, e o consequente desenvolvimento de hipertensão e hipertrofia ventricular esquerda <sup>(79, 80)</sup>.

Gezmish e colaboradores (2010) avaliaram o coração de ratos nascidos de mães que foram submetidas à dieta deficiente em vitamina D. Esses animais, quatro semanas após o nascimento, apresentaram hipertrofia cardíaca e aumento do número e do tamanho dos cardiomiócitos, independentemente da concentração sérica de cálcio <sup>(81)</sup>.

Assim, vários estudos mostraram que a deficiência de vitamina D resulta em alterações cardíacas que caracterizam a remodelação cardíaca. Entretanto, nos estudos que utilizam a dieta para a indução da deficiência de vitamina, a influência do tempo de uso da dieta é

---

desconhecida. E, desde que a remodelação cardíaca é modulada pela dimensão da injúria, é possível que o maior tempo de uso de dieta deficiente esteja associado à maior intensidade de remodelação cardíaca.

Alguns mecanismos foram propostos para explicar a relação entre a deficiência de vitamina D e as alterações cardiovasculares. Desde que a fisiopatologia da remodelação cardíaca está associada ao desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes celulares <sup>(82)</sup>, é possível que aumento no estresse oxidativo represente um possível mecanismo pelo qual a deficiência de vitamina D determina a ocorrência de alterações cardíacas.

Estresse oxidativo ocorre quando há alteração no balanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, a favor da geração de radicais livres. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente produzidas pelo organismo <sup>(83)</sup>. Em concentrações fisiológicas, as EROs são necessárias para o funcionamento normal das células. Entretanto, se as EROs não forem efetivamente eliminadas pelos constituintes celulares, seu excesso pode reagir com diversas biomoléculas como o DNA <sup>(84)</sup>, lipídios e proteínas <sup>(85)</sup>, iniciando a peroxidação dos lipídios das membranas, levando ao acúmulo de hidroperóxidos de lipídios e aos danos no DNA e proteínas, contribuindo para a etiologia de diversas doenças.

O fator de transcrição nuclear Nrf-2 (fator nuclear eritróide-2) desempenha importante papel na proteção celular contra o estresse oxidativo <sup>(86)</sup>. Em condições normais, o Nrf-2 está localizado no citoplasma e permanece inativo, em consequência de sua ligação a proteína Keap 1 <sup>(87)</sup>. Em células expostas a indutores (estresse oxidativo ou compostos eletrofílicos) <sup>(87)</sup> o Nrf-2 se dissocia do Keap 1 e migra para o núcleo. No núcleo, o Nrf-2 se acopla a elementos de resposta antioxidante (ARE), na região promotora de genes alvo, induzindo a transcrição de diversos genes relacionados à defesa celular. Entre os genes regulados pelo Nrf-2 estão alguns que codificam enzimas da fase II de detoxificação e de antioxidantes, que incluem as enzimas para a síntese da glutatona, glutatona peroxidase,

---

glutathione S-transferase, NAD(P)H quinone oxidoreductase-1, heme oxygenase-1, glutathione reductase and thioredoxin. <sup>(87, 88, 89, 90)</sup>.

De fato, estudos recentes mostram a habilidade da vitamina D em modular sistemas celulares responsáveis pela homeostase no balanço oxidativo e pela resposta ao estresse oxidativo. A 1,25[OH]<sub>2</sub>D pode atuar em diversos tecidos ora como agente oxidante, ora como antioxidante. González-Reimers e colaboradores (2010) mostraram que a baixa concentração de vitamina D está relacionada à alteração de enzimas antioxidantes no tecido muscular de ratos que apresentavam miopatia alcoólica <sup>(91)</sup>.

Como visto, não é bem caracterizada a influência do tempo nas alterações cardíacas observadas em decorrência da vitamina D. Por outro lado, já é conhecida a relação entre o estresse oxidativo e a remodelação cardíaca, bem como a relação entre a vitamina D e o sistema oxidante/antioxidante. No entanto, não existem estudos que relacionam a deficiência de vitamina D e as consequentes alterações cardíacas já caracterizadas, com o tempo de uso de dieta deficiente e o estresse oxidativo cardíaco.

Assim, neste trabalho avaliaremos a influência do tempo de uso de dieta deficiente em vitamina D sobre variáveis morfológicas, funcionais e metabólicas do tecido cardíaco. Avaliaremos também a influência da deficiência de vitamina D sobre o estresse oxidativo cardíaco, como possível mecanismo para as alterações encontradas no coração de ratos submetidos a diferentes tempos de uso de dieta deficiente em vitamina D. E, além disso, avaliaremos se o estresse oxidativo decorrente da deficiência de vitamina D é modulado pela proteína Nrf-2.

*Hipótese*

---

---

A deficiência de vitamina D em ratos Wistar com concentração sérica de cálcio e fósforo normais determina a ocorrência de remodelação cardíaca e com o decorrer do tempo há piora das variáveis cardíacas. Um dos mecanismos envolvidos no processo de remodelação cardíaca decorrente da deficiência de vitamina D é o estresse oxidativo, modulado pelo Nrf-2.

## *Objetivos*

---

- 
- ❖ Avaliar a influência da deficiência de vitamina D sobre o coração de ratos: morfologia, função, fibrose e metabolismo energético
  - ❖ Avaliar a relação entre a remodelação cardíaca decorrente da deficiência de vitamina D e o estresse oxidativo cardíaco
  - ❖ Avaliar se o estresse decorrente da deficiência de vitamina D é modulado pela proteína Nrf-2
  - ❖ Avaliar a influência do tempo de uso de dieta deficiente em vitamina D sobre a remodelação cardíaca de ratos

## *Materiais e Métodos*

---

---

---

## Protocolo Experimental

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (Protocolo nº 693/2008), e está em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para a realização deste estudo foram utilizados 90 ratos da raça Wistar, machos, recém-desmamados, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental da Clínica Médica do Campus de Botucatu. Imediatamente após o desmame (21º dia após o nascimento), os animais foram aleatoriamente alocados em quatro grupos: 1) Grupo controle 2 meses (C2), composto por 24 animais que receberam dieta contendo 1.000 UI de vitamina D por quilograma de dieta, e foram mantidos em ambiente com luz fluorescente, por período de dois meses, 2) Grupo dieta deficiente em vitamina D 2 meses (D2), composto por 22 animais que receberam dieta isenta de vitamina D, e foram mantidos em ambiente com luz incandescente, com o intuito de impedir a síntese cutânea de vitamina D, por período de dois meses, 3) Grupo controle 4 meses (C4), composto por 21 animais que receberam dieta contendo 1.000 UI de vitamina D por quilograma de dieta, em ambiente com luz fluorescente, por período de quatro meses, 4) Grupo dieta deficiente em vitamina D 4 meses (D4), composto por 23 animais que receberam dieta isenta de vitamina D, em ambiente com luz incandescente, por período de quatro meses.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, forradas com maravalha de *Pinus* autoclavada, com tampa de arame cromado, e em ambiente com temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro e escuro de 12 horas) controladas.

## Dieta AIN93-G

A deficiência de vitamina D determina estado de hipocalcemia<sup>(92)</sup> e, uma vez que o nível sérico de cálcio influencia diretamente a função cardíaca<sup>(76)</sup>, houve necessidade de

---

---

prevenirmos a existência desse possível vies no estudo. A exclusão deste vies foi inicialmente proposta através da suplementação da dieta AIN-93G deficiente em vitamina D com quantidades de cálcio, fósforo e lactose, segundo descrito em estudo de Kollenkirchen e colaboradores (1991)<sup>(93)</sup>. No entanto, devido a impossibilidades técnicas na confecção da ração, não foi possível a formulação da dieta isenta de vitamina D com as quantidades propostas inicialmente de 2,0% de cálcio, 1,25% de fósforo e 20% de lactose. Estudo de Anderson e colaboradores (2007) verificaram que os níveis de cálcio e fósforo permaneceram normais em modelo de deficiência de vitamina D induzida por dieta, com quantidades menores de cálcio e fósforo e sem a adição de lactose<sup>(94)</sup>. Sendo assim, a dieta AIN-93G foi formulada com a máxima concentração de cálcio (0,7%) e fósforo (0,3%) possível. Os animais que receberam vitamina D, conforme previsto no projeto inicial, receberam dieta AIN93-G acrescida de 1000 UI de vitamina D/kg de ração, afim de que as necessidades nutricionais dessa vitamina fossem satisfeitas<sup>(95)</sup>. As dietas dos animais foram produzidas pela empresa Rhooster Indústria e Comércio LTDA (São Paulo, Brasil).

#### **Avaliação da Pressão Arterial Sistólica**

Após o término do período experimental, na semana anterior à realização do exame ecocardiográfico, foi aferida a pressão arterial sistólica dos animais.

Para a medida da pressão arterial, os animais foram previamente aquecidos à temperatura de 40°C por 3 minutos, em caixa de madeira (50 X 40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada, com a finalidade de estimular vasodilatação da artéria caudal. A pressão arterial da cauda é medida por plestimografia, utilizando-se eletroesfigmomanômetro Narco Bio - System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA). O manguito foi colocado em torno da cauda do animal e conectado a transdutor de pulso. Em seguida, foi insuflado a valor superior à pressão arterial sistólica, e desinsuflado, para registro das pulsações arteriais em polígrafo Gould, modelo RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

---

---

## **Avaliação Morfológica e Funcional pelo Ecocardiograma**

Após o término do período experimental, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e o posicionamento dos animais em decúbito lateral esquerdo para a realização do ecocardiograma.

O ecocardiógrafo utilizado foi do modelo HDI-5000 Sono CT da Philips, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-12 MHz. As estruturas cardíacas foram medidas em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos, obtendo-se a média aritmética em seguida<sup>(96)</sup>.

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

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

As medidas do diâmetro do AE e da AO foram realizadas, especificamente, no final da sístole e diástole ventricular.

O diâmetro da via de saída do VE (VSVE) foi medido na posição para-esternal 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 (AAE) e direito (AAD) foram obtidas a partir da planimetria na janela apical, 4 câmaras no final da sístole ventricular, quando as dimensões dos átrios são máximas.

As outras variáveis foram derivadas das formulações descritas a seguir:

- ❖ Espessura relativa da parede posterior do VE (ERPP) <sup>(97)</sup>:

$$ERPP = 2 \times \frac{PPVE}{DDVE}$$

- ❖ Massa do ventrículo esquerdo (MVE):

$$MVE = 1,04 \times (DDVE + 2PPVE)^3 - (DDVE)^3$$

onde 1.04 é o valor da densidade específica do músculo <sup>(98)</sup>.

- ❖ Índice de massa do VE (iMVE):

$$iMVE = \frac{MVE}{PC}$$

- ❖ Porcentagem de encurtamento:

$$\% \text{ encurtamento} = \frac{(DDVE - DSVE)}{DDVE} \times 100$$

- ❖ Fração de ejeção:

$$FE = \frac{(DDVE^3 - DSVE^3)}{DDVE^3}$$

- ❖ Volume sistólico (VS):

$$VS = VTI \times \pi \times \left(\frac{VSVE}{2}\right)^2$$

onde VTI é a integral da velocidade/ tempo do fluxo sistólico da VSVE

---

---

❖ Débito cardíaco (DC):

$$DC = VS \times FC$$

❖ Índice cardíaco (IC):

$$IC = \frac{DC}{PC}$$

Algumas variáveis ecocardiográficas foram normalizadas pelo peso corporal dos animais<sup>(99)</sup> e pelo comprimento da tíbia<sup>(100)</sup>.

### **Eutanásia, Estudo Morfométrico e Histológico**

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de pentobarbital sódico (50mg/kg). Em seguida, o sangue foi coletado por meio de punção do ventrículo esquerdo, e o coração, pulmões e fígado foram retirados. Amostras de sangue foram acondicionadas em tubo seco e em tubo contendo anticoagulante e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e 4°C para obtenção de soro e plasma que, em seguida, foram congelados a -80°C. O fígado, pulmões e coração foram rapidamente lavados em soro fisiológico para a remoção do sangue.

O ventrículo esquerdo (VE), o ventrículo direito (VD), átrio (A), pulmões e fígado foram dissecados e pesados em balança analítica de precisão (modelo BG200-Gehaka).

Após a aferição dos pesos úmidos do VD, A, pulmões e fígado, os tecidos foram colocados em estufa a 65°C por 48 horas. Depois deste período, os fragmentos já desidratados foram novamente pesados, obtendo-se assim o peso seco. A relação entre peso úmido e seco foi utilizada para caracterizar a porcentagem de água nesses tecidos. O teor de água nos tecidos foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ água} = \frac{\text{Peso úmido} - \text{Peso seco}}{\text{Peso úmido}} \times 100$$

---

---

O peso úmido do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito, normalizado para peso corporal dos animais <sup>(99)</sup> e pelo comprimento da tíbia <sup>(100)</sup>, foi utilizado como índice de hipertrofia ventricular.

O teor de água do fragmento do fígado e dos pulmões foi quantificado como indicativo da ocorrência de congestão.

O VE foi seccionado transversalmente a 4 mm do ápice para a base, já que essa região reflete a média da área dos resultados de cortes de todo ventrículo <sup>(101)</sup>. Um fragmento de 3 mm de espessura foi colocado em solução de formol tamponado (formol 10%, água deionizada, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico). Os VE ficaram nessa solução por 24 horas, em água corrente por período de 24 horas e posteriormente foram colocados em álcool 70%. Em seguida, foram parafinizados em blocos, dos quais foram confeccionadas as lâminas para estudo histopatológico. O restante do VE foi seccionado em dois fragmentos que foram congelados a -80°C, para análises bioquímicas e de biologia molecular.

- **Histologia para mensuração da área de miócitos**

Após ser inserido no bloco de parafina, o corte histológico do VE foi seccionado em cortes coronais de 4 µm. As lâminas com os cortes histológicos foram corados com solução hematoxilina - eosina (HE) para aferição das áreas da secção transversa dos miócitos, empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado à câmera de vídeo, que envia imagens digitais para computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro - Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 60 células por lâmina analisada <sup>(56)</sup>. Os miócitos selecionados que foram seccionados transversalmente, apresentavam forma arredondada, núcleo visível no centro da célula e localizados na camada sub-endocárdica da parede muscular do VE. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o

---

---

onjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionadas médias para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

- **Histologia para mensuração da fração de colágeno**

Lâminas com cortes histológicos coronais de 5 µm e corados pela técnica de *Picro Sirius red*, específicos para visualização de colágeno, foram usadas para a quantificação da fração de colágeno intersticial do VE, por meio de vídeo densitometria. Imagens do tecido cardíaco foram capturadas por computador IBM compatível e analisadas por software de análise de imagens Image Pro - Plus (Media Cybernetics Silver Spring, Maryland, USA). Os elementos do tecido cardíaco foram identificados de acordo com os níveis de cor. Assim, as fibras colágenas aparecem vermelhas, os miócitos, amarelos, e os espaços, brancos. O perfil digitalizado foi analisado pelo computador, que calcula o volume da fração de colágeno como a soma de toda área do tecido conectivo dividido pela soma da área de tecido conectivo e da área de miócito. Em média, foram analisados 30 campos<sup>(102)</sup> por lâmina, com a utilização da objetiva de aumento de 40 vezes. O colágeno perivascular foi excluído desta análise.

#### **Determinação da Atividade Colagenolítica**

Para a determinação da atividade das metaloproteinases 2 e 9 no tecido cardíaco, os corações foram inicialmente descongelados em gelo e, a seguir, triturados e incubados em solução tampão (50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton - X; 10 mM CaCl<sub>2</sub> e inibidor de protease) na proporção de 30 mg de tecido para 200 µl de tampão. Os tecidos foram mantidos a 4°C durante 2 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a quantidade de proteína determinada pelo método de Bradford<sup>(103)</sup>. A concentração final de proteínas foi ajustada para 5 mg/ml, e o extrato foi armazenado a -80°C. A atividade colagenolítica do extrato de tecido cardíaco foi determinada por meio da capacidade de digestão de gelatina presente em gel de poliacrilamida. O gel de

---

---

poliacrilamida a 8% foi preparado com gelatina na proporção de 1 mg/ml, em equipamento Mini - gel da Bio -Rad. O gel, devidamente polimerizado, foi montado em cuba de eletroforese Mini - Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA), contendo tampão Tris - Glicina - SDS, pH 8,3. Trinta microgramas de proteína do extrato de tecido acrescido de tampão de amostra (0,5M Tris; 2% SDS, 10% glicerol; 0,025% azul de bromofenol; pH 6,8) na proporção 2:1 foram aplicados em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada com voltagem contínua de 100 V, durante aproximadamente 2 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes por 30 minutos em 2,5% de Triton X - 100, e em seguida, lavado duas vezes por 10 minutos em 50 mM de Tris pH 8,4. O gel foi então incubado a 37°C por 18 horas em solução de ativação contendo 50 mM Tris pH 8,4 e 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Terminada a incubação, o gel foi corado em solução de *Comassie Blue*, por 30 minutos, e em seguida descorado em solução de ácido acético, metanol e água (10: 30: 60) até permitir a visualização das bandas claras. Os géis foram então fotografados e a intensidade da ação gelatinolítica (bandas claras) foi analisada por densitometria, em analisador de imagens White Darkhon.

### **Western blotting para a proteína Nrf - 2**

O Nrf - 2 (fator nuclear eritóide 2) é uma proteína cuja principal função é ativar a resposta antioxidante, induzindo a transcrição de uma ampla gama de genes relacionados ao combate aos efeitos deletérios do estresse oxidativo e à restauração da homeostase intracelular.

O Nrf - 2 é uma proteína altamente instável e é rapidamente degradada pelo sistema proteossomal da ubiquitina<sup>(104)</sup>.

- **Extração das proteínas com Kit NE - PER®**

---

---

A extração das proteínas das amostras de VE foi realizada com o *Kit NE - PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Pierce Biotechnology), que permite a extração separadamente das proteínas citoplasmáticas e nucleares. A amostra congelada foi homogeneizada em tubo de Dounce com o tampão CER I do kit, de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. O CER I torna a célula túrgida, e causa estresse na membrana celular. Após incubação em gelo por 10 minutos, foi adicionado o tampão CER II, que atua promovendo a lise celular, e o produto dessa homogeneização foi centrifugado a 16.000 giros por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante, que corresponde ao extrato citoplasmático, foi transferido para tubos *ependorfs* e armazenado em freezer -80°C. Os *pellets* que permaneceram nos *ependorfs* foram re-suspendidos com o tampão NER, vortexados e incubados em gelo por 10 min. Após 4 ciclos de vortexização e incubação, os *ependorfs* foram centrifugados a 16.000 giros por 12 minutos a 4°C. O sobrenadante, que corresponde ao extrato nuclear, foi transferido para tubos *ependorfs* e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína dos extratos citoplasmático e nuclear foi analisada pelo método de Bradford <sup>(103)</sup>, utilizando as curvas de *BSA Protein Standard* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

- **Protocolo para *Western Blot***

A expressão da proteína relacionada com a ativação do sistema antioxidante, Nrf - 2 foi analisada por *Western Blot*. O extrato nuclear foi utilizado para esta análise.

As proteínas presentes no extrato nuclear foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e  $\beta$  - mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini -Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM

---

---

pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed). A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução, foi determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada, sendo que para o Nrf - 2, a concentração foi de 10%. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA), por 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, sob agitação constante por 12 horas. O anticorpo primário utilizado foi o *Nrf2 (C-20), rabbit IgG* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), na diluição de 1: 400. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 2 horas sob agitação constante. O anticorpo secundário utilizado foi o *IgG anti - rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), na diluição de 1:8000. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imuno - detecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X - Omat AR (Eastman Kodak Co., USA), nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

Após a imuno - detecção de cada um dos anticorpos, as membranas foram lavadas em solução de *stripping* (Restore Western Blot, Pierce) por 40 minutos, e posteriormente lavadas

---

---

em solução basal. A membrana foi então novamente bloqueada com solução de 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal, por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo primário de normalização diluído na solução basal, sob agitação constante por 12 horas. O anticorpo primário utilizado foi o *GAPDH (6C5), mouse monoclonal IgG1* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), (gliceraldeído 3 - fosfato desidrogenase; EC. 1.2.1.12) na diluição de 1:5000. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 2 horas sob agitação constante. O anticorpo secundário utilizado foi o *Goat anti - mouse IgG - HRP* (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), na diluição de 1:10000. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imuno - detecção foi novamente realizada por meio do método de quimioluminescência.

As análises quantitativas dos *blots* foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>.

### **Espectrofotometria para dosagens das enzimas do metabolismo energético cardíaco**

O metabolismo energético cardíaco foi determinado através das atividades das enzimas  $\beta$ -hidroxiacil coenzima A desidrogenase ( $\beta$ -OH, E.C. 1.1.1.35), que participa do metabolismo dos ácidos graxos e lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27), que participa do metabolismo da glicose. Para essas análises, 200 mg de VE foram homogeneizados sob gelo em 5 ml de solução de tampão fosfato (0,1M, pH=7,4), contendo 1 mM de etileno diamino ácido tetra-acético (EDTA) <sup>(105, 106, 107)</sup>.

A atividade da  $\beta$ -OH foi determinada no coração em meio contendo acetilcoenzima A 0,05 mM e dinucleótideo adenina nicotinamida, na forma reduzida (NADH) 0,1 mM <sup>(108)</sup>.

---

---

A atividade da LDH foi determinada pela oxidação do NADH a 340nm, tendo o piruvato como substrato <sup>(109)</sup>.

Nesse estudo também foi determinada a concentração de proteínas totais. As análises foram feitas por meio de espectrofotômetro e o padrão utilizado foi solução de albumina sérica bovina <sup>(108)</sup>.

### **Espectrofotometria para avaliação do estresse oxidativo cardíaco**

O estresse oxidativo cardíaco foi avaliado através das atividades das enzimas glutaciona peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9), superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) e catalase (E.C. 1.11.1.6) e pela dosagem de hidroperóxidos de lipídios (HP).

A atividade da glutaciona peroxidase foi determinada segundo Nakamura e colaboradores (1974) <sup>(110)</sup> na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH<sub>2</sub>, azida sódica, EDTA, glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona redutase. Através da oxidação do NADPH<sub>2</sub> a 340 nm na presença da glutaciona redutase, que catalisa a redução da glutaciona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH – Px.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch e colaboradores (1981), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue - tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10) <sup>(111)</sup>. A hidroxilamina gera fluxo de O<sub>2</sub><sup>-</sup> do NBT para *blue - forazana*, em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida proporcionalmente à atividade da SOD presente na amostra.

A atividade enzimática da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 15µL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm <sup>(112)</sup>.

---

---

A concentração de hidroperóxido de lipídio foi determinada por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ). O  $\text{Fe}^{3+}$  formado reage com alaranjado de xilenol formando cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectofotometricamente <sup>(113)</sup>.

### **Dosagem da 25-hidroxivitamina D**

As concentrações do metabólito 25[OH]D no plasma foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito por Asknes (1994) <sup>(114)</sup>. O equipamento empregado foi o cromatógrafo Waters 2695, com detector Waters 2996 - fotodiodo. A análise foi feita em coluna C18 de fase reversa para todos os experimentos. A fase móvel era composta por água e metanol (85:15, v/v) com 0,1% de trietilamina. O comprimento do detector de onda ultra - violeta (UV) foi fixado em 265nm e com fluxo de 0,5ml/min.

- **Extração e determinação da 25[OH]D plasmática**

A análise da 25[OH]D foi feita em alíquotas de 500  $\mu\text{l}$  de plasma. O plasma foi colocado em tubo de 16 x 125 mm e adicionado 500  $\mu\text{l}$  de metanol e isopropanol (9:1, v/v) e agitado em vórtex por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 1,5 ml do solvente hexano e a solução centrifugada a 3.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e secado em seringa de nitrogênio. Após a secagem, o material depositado foi re-suspenso com 150  $\mu\text{l}$  de metanol. Por fim, volume de 20 $\mu\text{L}$  dessa solução foi injetado no HPLC, com tempo de corrida de 15 minutos.

### **Dosagens bioquímicas de proteínas totais, albumina, cálcio total, cálcio livre e fósforo**

A determinação de proteínas totais foi realizada por método colorimétrico (teste Kit Wiener Lab.). As ligações das proteínas reagem com o íon cúprico, em meio alcalino, para se

---

---

obter um complexo de cor lilás com máximo de absorvância de 540nm, cuja intensidade é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.

A albumina foi dosada por método colorimétrico (teste Kit Wiener Lab.). A albumina reage especificamente, sem prévia separação, com a forma aniônica da 3,3', 5,5'-tetrabromo cresolsulfon-ftaleína (BCF), em presença de um excedente de corante, em meio tamponado a pH 3,8. O aumento da absorvância a 625nm em referência do branco de reagente é proporcional à quantidade de albumina presente na amostra.

O cálcio foi dosado quantitativamente no soro por meio da reação com arsenazo III, em pH neutro, formando um complexo cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade de cálcio na amostra (teste Kit LaborLab). A cor obtida foi medida entre 600 e 660 nm.

O cálcio livre foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$Cálcio\ ionizado = \frac{\left\{ 6 \times Cálcio\ total - \frac{[Albumina + (0,19 \times proteínas\ totais)]}{3} \right\}}{Albumina + (0,19 \times proteínas\ totais) + 6}$$

A dosagem de fósforo inorgânico foi realizada por método colorimétrico (teste Kit LaborLab). O fosfato inorgânico presente no soro reage em meio fortemente ácido com molibdato e obtém-se o complexo fosfomolibdato, que é reduzido pelo ácido ascórbico a azul de molibdeno, desenvolvendo-se a cor em meio arsenito/citrato. O arsenito/citrato combina-se com o excesso de molibdato impedindo sua reação posterior com o fosfato liberado dos ésteres lábeis. A cor obtida foi medida em 340 nm.

### **Análise Estatística**

As variáveis foram submetidas ao teste de normalidade e de igualdade de variância e foram apresentadas em média  $\pm$  erro padrão da média e as comparações entre os grupos foram feitas pela Análise de Variância de duas vias (ANOVA 2 vias).

---

---

Na ANOVA de duas vias, o primeiro fator corresponde à presença ou não da vitamina D na dieta, e o segundo fator, ao tempo de uso da dieta. Este teste estatístico avalia o efeito da interação entre os dois fatores, bem como o efeito isolado de cada fator sobre as variáveis estudadas.

Quando ocorre interação significativa entre os fatores ( $P \leq 0,05$ ) torna-se importante identificar os grupos que apresentam diferença estatística entre si. Para tanto, utiliza-se o teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando não existe interação entre os tratamentos, o que importa é saber se os grupos que receberam vitamina D na dieta diferem dos grupos deficientes em vitamina D e se os grupos mantidos na dieta por dois meses diferem dos grupos mantidos na dieta por quatro meses.

Neste trabalho serão discutidos os efeitos da interação entre os fatores estudados e os efeitos isolados da dieta sobre as variáveis analisadas. Não serão discutidos os efeitos isolados do tempo sobre as variáveis, já que essa relação é bem consolidada e não faz parte dos objetivos desta dissertação.

Para avaliar os efeitos da variável cálcio sobre todas as demais variáveis estudadas, foi realizada a Análise de Covariância (ANCOVA). Na ANCOVA, além dos fatores dieta e tempo de uso da dieta, a co-variável cálcio foi acrescentada com a finalidade de corrigir os valores das variáveis estudadas de modo a anular a influência do nível de cálcio sobre elas. Este teste estatístico aumenta o poder da ANOVA de duas vias, pois ajusta estatisticamente os valores das variáveis dependentes por remover os efeitos da co-variável sobre essas variáveis dependentes.

Os resultados foram discutidos em nível de significância de 5%.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o pacote estatístico Systat for Windows v 11.0 (Systat Software, Inc. 2004, US) e os gráficos foram elaborados a partir do programa SigmaPlot for Windows v 11.0 (Systat Software, Inc, 2008, US).

## *Resultados*

---

---

### **Intercorrências no decorrer do experimento**

No transcorrer do experimento, houve a perda de 6 animais dos grupos que receberam dieta isenta de vitamina D (3 animais do grupo D2 e 3 animais do grupo D4), e de 6 animais pertencentes aos grupos que receberam dieta contendo vitamina D (4 animais do grupo C2 e 2 animais do grupo C4). A perda desses animais não está relacionada ao tratamento realizado, mas sim a intercorrências no momento da aferição da pressão arterial e da anestesia para o ecocardiograma.

### **Avaliação peso corporal, consumo alimentar, comprimento da tibia e pressão arterial**

Os dados apresentados na tabela 1 mostram que não houve efeito de interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta, nem efeito isolado da dieta sobre as variáveis peso corporal inicial ( $p_{\text{interação}} = 0,844$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,834$ ), peso corporal final ( $p_{\text{interação}} = 0,134$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,285$ ), consumo de ração ( $p_{\text{interação}} = 0,615$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,863$ ), comprimento da tibia ( $p_{\text{interação}} = 0,713$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,813$ ) e pressão sistólica caudal ( $p_{\text{interação}} = 0,315$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,735$ ).

No decorrer do tempo, os animais dos grupos que permaneceram por 4 meses no experimento apresentaram aumento no peso final ( $p_{\text{tempo}} < 0,001$ ), consumo de ração ( $p_{\text{tempo}} < 0,001$ ), comprimento da tibia ( $p_{\text{tempo}} < 0,001$ ) e pressão sistólica caudal ( $p_{\text{tempo}} < 0,001$ ) em relação aos animais que permaneceram por 2 meses em experimento.

**Tabela 1.** Peso corporal, consumo de ração, comprimento da tíbia e pressão sistólica dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Valores de p		
	C2 (n=20)	D2 (n=19)	C4 (n=19)	D4 (n=20)	Interação	Dieta	Tempo
<b>Peso inicial (g)</b>	61,9±2,1	62,8±2,2	62,8±2,3	62,7±2,2	0,844	0,834	0,880
<b>Peso final (g)</b>	375,2±9,0	371,3±8,6	461,6±9,3	484,7±8,6	0,134	0,285	< 0,001
<b>Consumo médio ração (g/dia)</b>	16,2±0,3	16,0±0,3	18,3±0,3	18,4±0,3	0,615	0,863	< 0,001
<b>Comprimento da tíbia (mm)</b>	39,4±0,29	39,6±0,30	41,9±0,30	41,9±0,29	0,713	0,813	< 0,001
<b>Pressão sistólica caudal (mmHg)</b>	110,8±4,2	113,6±4,1	137,5±4,4	131,8±4,3	0,315	0,735	< 0,001

C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses

C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para p<0.05

---

## Dosagens séricas e plasmáticas

A tabela 2 apresenta os dados relativos às dosagens séricas e plasmáticas realizadas para a comprovação da eficácia do modelo na indução da deficiência em vitamina D.

Não houve interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta ao avaliarmos as concentrações plasmáticas de 25[OH]D e séricas de cálcio total, cálcio livre e fósforo.

Entretanto, houve efeito isolado da dieta ao analisarmos as concentrações da 25[OH]D (Grupo com vitamina D:  $329,6 \pm 12,0$ ; Grupo sem vitamina D:  $39,1 \pm 12,0$ ;  $p_{dieta} < 0,001$ ; Fig. 1), cálcio total (Grupo com vitamina D:  $11,07 \pm 0,19$ ; Grupo sem vitamina D:  $9,82 \pm 0,19$ ;  $p_{dieta} < 0,001$ ; Fig. 2) e o cálcio livre (Grupo com vitamina D:  $6,41 \pm 0,10$ ; Grupo sem vitamina D:  $5,61 \pm 0,10$ ;  $p_{dieta} < 0,001$ ). Apesar disso, a Análise de Covariância realizada mostrou que nenhuma das demais variáveis estudadas teve influência das co-variáveis cálcio total e cálcio livre, sendo, portanto, essa diferença na concentração sérica destes eletrólitos, omitida da nossa análise estatística dos resultados.

O tempo de uso da dieta teve efeito na redução dos níveis de fósforo ( $p_{tempo} = 0,028$ ) dos animais que permaneceram 4 meses em experimento em relação aos animais que permaneceram 2 meses.

**Tabela 2.** Dosagens plasmáticas e séricas dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Valor p		
	C2 (n=20)	D2 (n=19)	C4 (n=19)	D4 (n=20)	Interação	Dieta	Tempo
<b>25[OH]D (ng/ml)</b>	329,9±17,0	42,7±17,0	329,3±17,0	35,5±17,0	0,850	<b>&lt;0,001</b>	0,821
<b>Cálcio (mg/dl)</b>	10,7±0,3	9,9±0,3	11,5±0,3	9,7±0,3	0,079	<b>&lt;0,001</b>	0,304
<b>Cálcio livre (mg/dl)</b>	6,2±0,1	5,7±0,2	6,6±0,2	5,5±0,1	0,052	<b>&lt;0,001</b>	0,580
<b>Fósforo (mg/dl)</b>	10,2±0,4	9,9±0,4	9,4±0,4	8,8±0,4	0,767	0,301	<b>0,028</b>

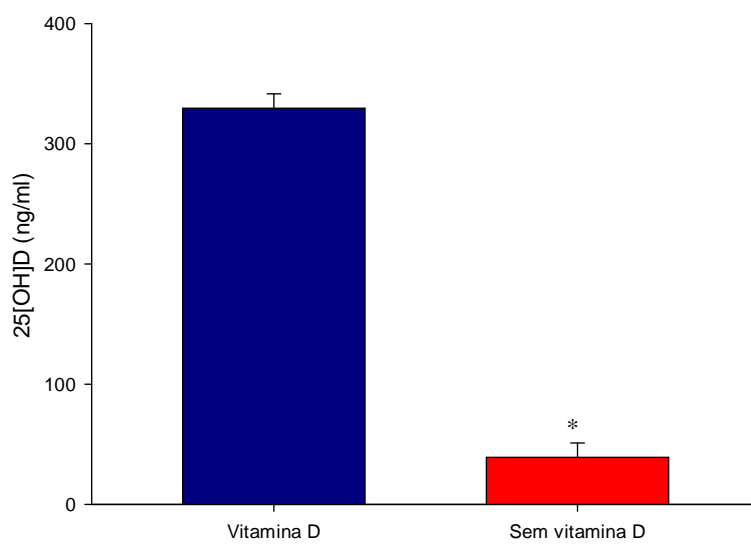
C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses

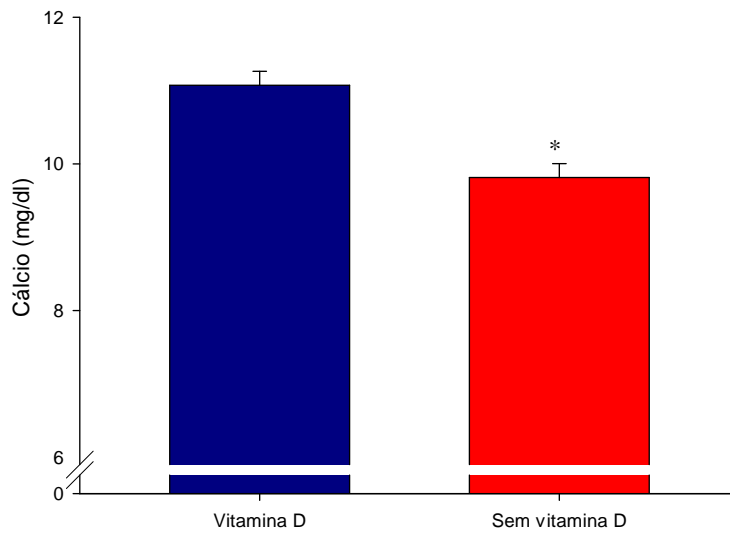
C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para p<0.05



**Figura 1.** Dosagem plasmática de 25[OH]D dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 2.** Níveis séricos de cálcio dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D.  
\*  $p < 0,05$

---

## Avaliação das variáveis cardíacas

Os dados relativos ao estudo ecocardiográfico estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Em relação às variáveis morfológicas (tabela 3), houve interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta ao avaliarmos as variáveis MVE ( $p_{\text{interação}} = 0,034$ ; Fig. 3) e AAD ( $p_{\text{interação}} = 0,008$ ; Fig. 4). As demais variáveis não apresentaram efeito de interação entre os fatores estudados.

Animais que receberam dieta isenta de vitamina D apresentaram aumento nas variáveis DDVE (Grupo com vitamina D:  $6,57 \pm 0,08$ ; Grupo sem vitamina D:  $6,83 \pm 0,08$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,015$ ), DDVE/tíbia (Grupo com vitamina D:  $1,62 \pm 0,02$ ; Grupo sem vitamina D:  $1,68 \pm 0,02$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,006$ ; Fig. 5), AE (Grupo com vitamina D:  $3,58 \pm 0,07$ ; Grupo sem vitamina D:  $3,73 \pm 0,07$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,001$ ; Fig. 6), AE/AO (Grupo com vitamina D:  $1,01 \pm 0,02$ ; Grupo sem vitamina D:  $1,09 \pm 0,02$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,020$ ), MVE (Grupo com vitamina D:  $542 \pm 19$ ; Grupo sem vitamina D:  $621 \pm 19$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,004$ ) e iMVE (Grupo com vitamina D:  $1302 \pm 45$ ; Grupo sem vitamina D:  $1456 \pm 44$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,017$ ) quando comparados aos animais que receberam dieta contendo vitamina D, mostrando efeito isolado da dieta sobre essas variáveis.

O tempo de uso da dieta fez com que os animais que permaneceram em experimento por período de 4 meses apresentassem aumento nas variáveis DDVE ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ), DDVE/tíbia ( $p_{\text{tempo}} = 0,009$ ), EPP ( $p_{\text{tempo}} = 0,034$ ), AE ( $p_{\text{tempo}} = 0,001$ ), AO ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ), AAE ( $p_{\text{tempo}} = 0,002$ ), AAD ( $p_{\text{tempo}} = 0,001$ ), MVE ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ), e redução nas variáveis DDVE/PC ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ) e AE/PC ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ) em relação aos animais que permaneceram por 2 meses em experimento.

A análise dos dados funcionais (tabela 4) não mostrou interação entre os fatores estudados e as variáveis de função sistólica e diastólica.

No entanto, a análise isolada do fator dieta mostrou que houve aumento nas variáveis de função sistólica: DSVE (Grupo com vitamina D:  $2,40 \pm 0,08$ ; Grupo sem vitamina D:  $2,75 \pm 0,08$ ;  $p_{\text{dieta}} = 0,002$ ), DSVE/PC (Grupo com vitamina D:  $5,79 \pm 0,21$ ; Grupo sem vitamina D:

---

6,50 ±0,21;  $p_{\text{dieta}} = 0,018$ ), DSVE/tíbia (Grupo com vitamina D: 0,59±0,02; Grupo sem vitamina D: 0,67±0,02;  $p_{\text{dieta}} = 0,002$ ; Fig. 7), e redução nas variáveis % encurtamento (Grupo com vitamina D: 63,60±1,05; Grupo sem vitamina D: 60,03±1,04;  $p_{\text{dieta}} = 0,018$ ; Fig. 8) e fração de ejeção (Grupo com vitamina D: 0,95±0,00; Grupo sem vitamina D: 0,93±0,00;  $p_{\text{dieta}} = 0,015$ ; Fig. 9) ao compararmos os animais que receberam dieta deficiente em vitamina D aos animais que receberam dieta contendo a vitamina. As demais variáveis IC, DC, VS, Vao e VTI, não apresentaram efeito de interação nem efeito isolado da dieta.

Não houve efeito de interação nem efeito isolado da dieta sob as variáveis de função diastólica onda E, onda A, razão E/A, TRIV e TRIV<sub>c</sub> ao compararmos os animais que receberam dieta isenta de vitamina D e aqueles que receberam a vitamina na dieta.

O tempo de uso da dieta fez com que os animais que permaneceram em experimento por período de 4 meses apresentassem aumento nas variáveis DSVE ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ), DSVE/tíbia ( $p_{\text{tempo}} = 0,003$ ), VS ( $p_{\text{tempo}} = 0,004$ ), VSVE ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ) e redução nas variáveis % encurtamento ( $p_{\text{tempo}} = 0,026$ ) e FE ( $p_{\text{tempo}} = 0,014$ ) em relação aos animais que permaneceram por 2 meses em experimento.

**Tabela 3.** Estudo morfológico realizado através de ecocardiograma dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Valor p		
	C2 (n=20)	D2 (n=19)	C4 (n=19)	D4 (n=20)	Interação	Dieta	Tempo
DDVE (mm)	6,32±0,10	6,45±0,11	6,82±0,11	7,22±0,10	0,204	<b>0,015</b>	<b>&lt; 0,001</b>
DDVE/PC (mm/kg)	17,00±0,39	17,84±0,40	14,86±0,41	14,77±0,39	0,239	0,349	<b>&lt; 0,001</b>
DDVE/tíbia (mm/mm)	1,60±0,02	1,63±0,02	1,63±0,02	1,73±0,02	0,114	<b>0,006</b>	<b>0,009</b>
EPP (mm)	1,32±0,04	1,33±0,04	1,35±0,04	1,47±0,04	0,140	0,083	<b>0,034</b>
ERPP (mm/mm)	0,42±0,01	0,42±0,01	0,40±0,01	0,40±0,01	0,514	0,745	0,244
AE (mm)	3,40±0,08	3,59±0,08	3,53±0,09	4,01±0,08	0,081	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AE/PC (mm/kg)	9,34±0,26	9,95±0,27	8,02±0,28	7,87±0,26	0,164	0,389	<b>&lt; 0,001</b>
AE/tíbia (cm/mm)	0,88±0,02	0,91±0,02	0,88±0,02	0,92±0,02	0,672	0,116	0,847
AO (mm)	3,43±0,08	3,24±0,08	3,68±0,08	3,71±0,08	0,174	0,292	<b>&lt; 0,001</b>
AE/AO	1,02±0,03	1,12±0,03	1,00±0,03	1,05±0,03	0,344	<b>0,020</b>	0,154
AAE (cm <sup>2</sup> )	0,21±0,01	0,20±0,01	0,22±0,01	0,24±0,01	0,051	0,615	<b>0,002</b>
ÁAD (cm <sup>2</sup> )	0,17±0,01	0,16±0,01 <sup>*</sup>	0,18±0,01 <sup>*</sup>	0,20±0,01 <sup>*▼</sup>	<b>0,008</b>	0,381	<b>0,001</b>
ÁAE/AAD	1,25±0,04	1,28±0,04	1,28±0,04	1,23±0,04	0,288	0,834	0,809
MVE (mg)	499,4±26,5 <sup>*</sup>	520,3±27,1 <sup>*</sup>	584,6±27,9 <sup>**</sup>	722,3±26,5 <sup>**▼</sup>	<b>0,034</b>	<b>0,004</b>	<b>&lt; 0,001</b>
iMVE (mg/kg)	1338±62,0	1433±63,6	1265±65,4	1480±62,0	0,350	<b>0,017</b>	0,831

C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para p<0.05.

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; EPP: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; ERPP: espessura relativa da parede posterior; AE: átrio esquerdo; AO: tamanho da aorta; AD: átrio direito; AAD: área do AD; AAE: área do AE; MVE: massa do ventrículo esquerdo; iMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo.

<sup>\*</sup>: Diferença significativa de C2; <sup>\*</sup>: Diferença significativa de C4; <sup>▼</sup>: Diferença significativa de D2;

<sup>♦</sup>: Diferença significativa de D4

**Tabela 4.** Estudo funcional realizado através de ecocardiograma dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Interação	Valor p	
	C2 (n=20)	D2 (n=19)	C4 (n=19)	D4 (n=20)		Dieta	Tempo
Onda E (cm/s)	76,83±4,14	79,05±4,25	84,33±4,37	76,35±4,14	0,231	0,498	0,571
Onda A (cm/s)	62,41±4,07	65,37±4,17	61,89±4,29	67,20±4,07	0,778	0,322	0,875
E/A	1,32±0,10	1,26±0,10	1,46±0,11	1,26±0,10	0,494	0,209	0,516
TRIV (ms)	21,83±1,23	22,62±1,23	21,08±1,55	20,50±1,20	0,601	0,935	0,280
TRIVc	48,00±2,59	50,92±2,59	45,47±3,26	44,50±3,26	0,482	0,724	0,109
DSVE (mm)	2,22±0,11	2,46±0,11	2,57±0,12	3,04±0,11	0,303	<b>0,002</b>	<b>&lt; 0,001</b>
DSVE/PC (mm/kg)	5,95±0,29	6,78±0,30	5,63±0,30	6,23±0,29	0,708	<b>0,018</b>	0,148
DSVE/tíbia (cm/mm)	0,56±0,03	0,62±0,03	0,61±0,03	0,73±0,03	0,285	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>
% encurtamento	64,8±1,5	62,2±1,5	62,4±1,5	57,9±1,5	0,544	<b>0,018</b>	<b>0,026</b>
FE	0,95±0,07	0,94±0,07	0,94±0,07	0,92±0,07	0,295	<b>0,015</b>	<b>0,014</b>
FC (bpm)	296,9±10,4	308,5±10,7	286,6±11,0	284,0±10,4	0,505	0,673	0,106
DC (ml/min)	76,0±5,6	72,7±5,7	81,7±5,9	89,0±5,6	0,355	0,728	0,056
IC (ml/min.kg)	202,2±12,7	198,6±13,0	179,6±13,4	182,0±12,7	0,817	0,962	0,134
VTI	5,96±0,28	5,72±0,29	5,98±0,29	6,03±0,28	0,609	0,728	0,553
Vao (cm/s)	103,5±3,0	101,0±3,1	96,8±3,2	96,5±3,0	0,729	0,638	0,070
VS (ml)	0,26±0,02	0,24±0,02	0,28±0,02	0,31±0,02	0,170	0,760	<b>0,004</b>
VSVE (cm)	0,23±0,00	0,23±0,00	0,25±0,00	0,26±0,00	0,164	0,352	<b>&lt; 0,001</b>

C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

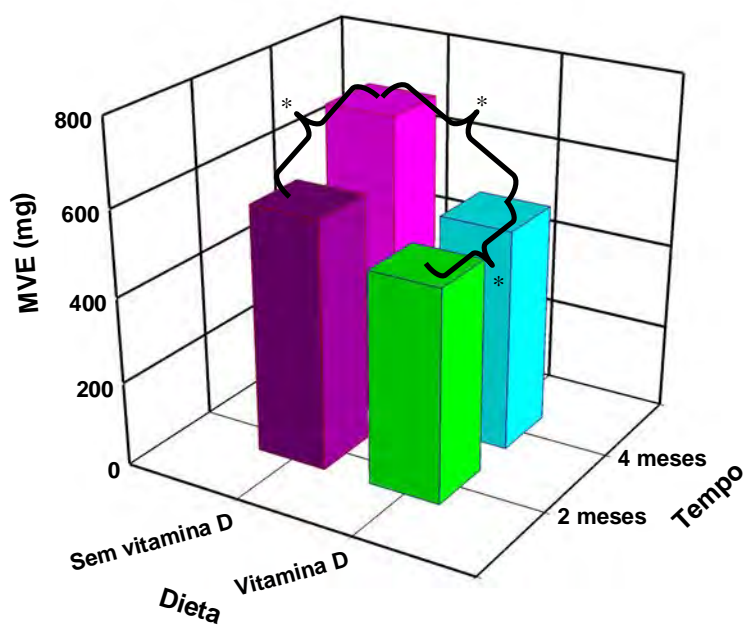
D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

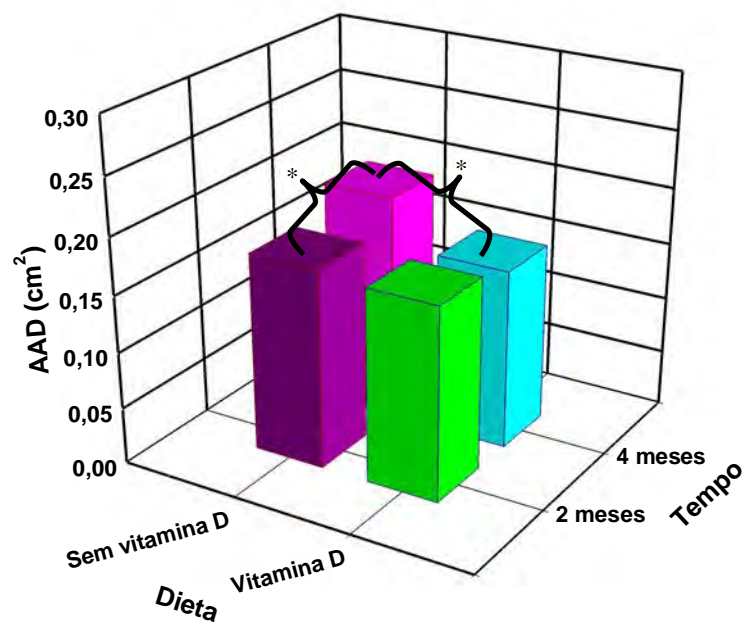
D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para  $p < 0.05$ .

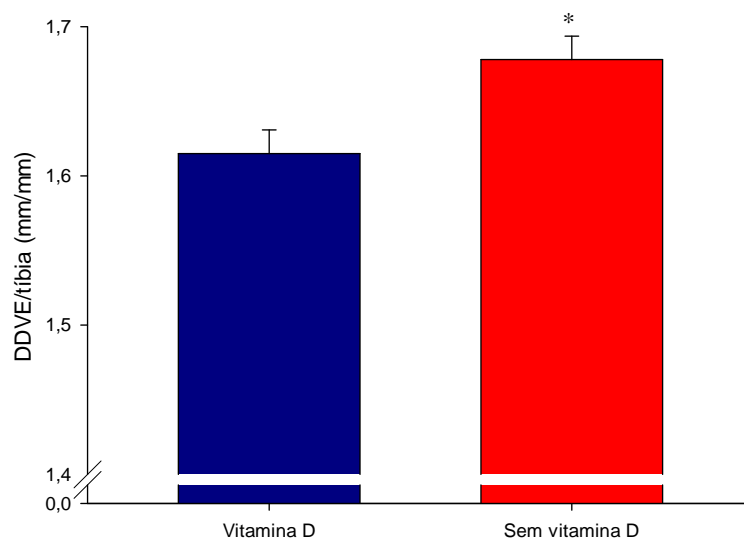
TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; FE: fração de ejeção; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VTI: integral tempo velocidade; Vao: velocidade máxima na aorta; VS: volume sistólico; VSVE: diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo.



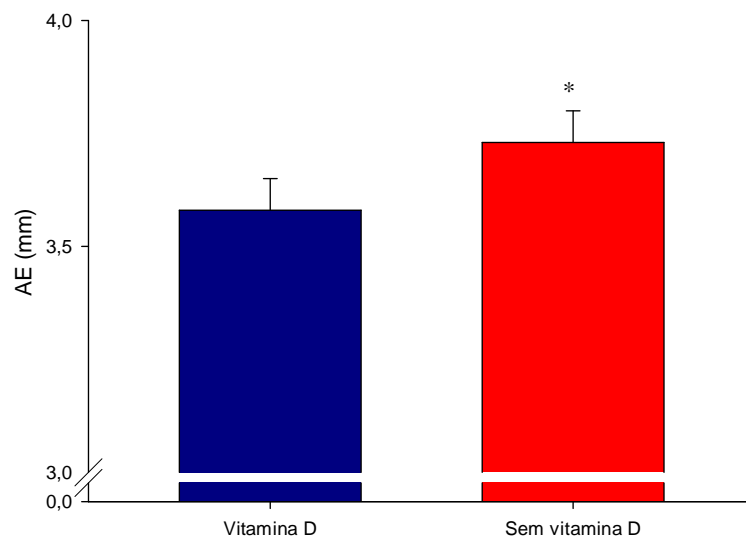
**Figura 3.** Massa do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4, avaliada pelo ecocardiograma. C2: vitamina D e 2 meses; D2: sem vitamina D e 2 meses; C4: vitamina D e 4 meses; D4: sem vitamina D e 4 meses. \*  $p < 0,05$



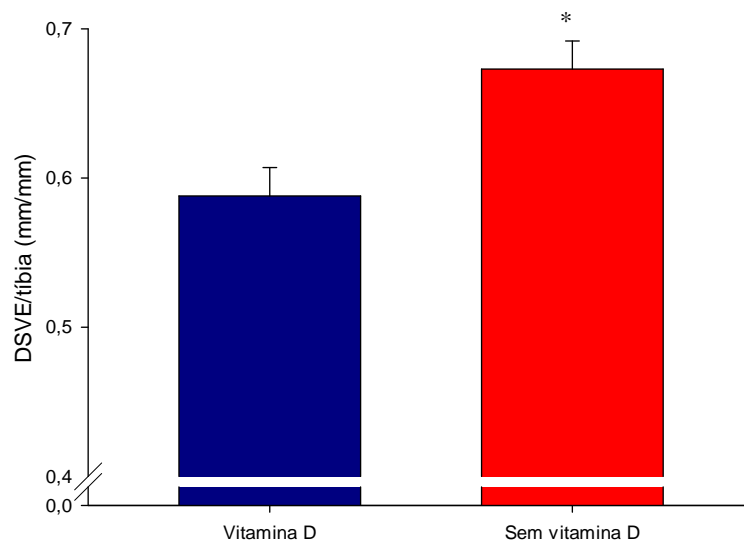
**Figura 4.** Área do átrio direito dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4. C2: vitamina D e 2 meses; D2: sem vitamina D e 2 meses; C4: vitamina D e 4 meses; D4: sem vitamina D e 4 meses. \*  $p < 0,05$



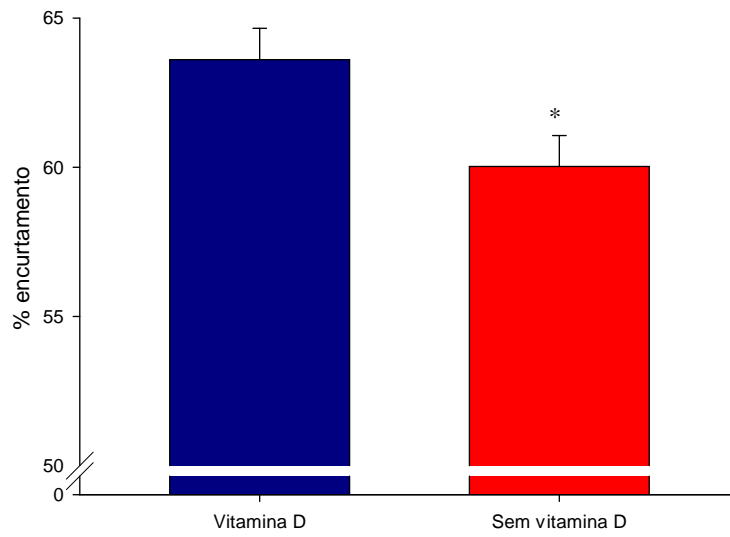
**Figura 5.** Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pela tíbia dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



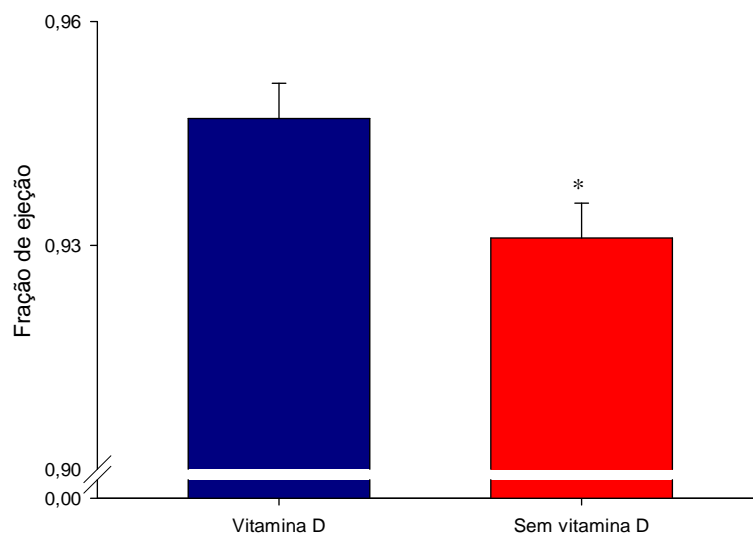
**Figura 6.** Átrio esquerdo dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 7.** Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tibia dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 8.** Porcentagem de encurtamento dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 9.** Fração de ejeção dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$

---

### **Avaliação morfométrica**

Os dados obtidos na avaliação morfométrica dos animais, realizada por meio da pesagem dos tecidos no momento da eutanásia, estão apresentados na tabela 5.

A avaliação morfométrica mostrou que a interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta influenciou as alterações encontradas nas variáveis peso VE ( $p_{\text{interação}} = 0,015$ ), peso VE/tíbia ( $p_{\text{interação}} = 0,009$ ; Fig. 10), peso VD ( $p_{\text{interação}} = 0,018$ ), peso VD/tíbia ( $p_{\text{interação}} = 0,015$ ; Fig. 11) e teor de água no átrio ( $p_{\text{interação}} = 0,017$ ).

Nas demais variáveis mostradas na tabela, não se verificou esse efeito de interação, nem efeito isolado da dieta.

Houve efeito isolado do tempo de uso da dieta quando analisamos o aumento nas variáveis peso do VE ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ), peso VE/tíbia ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ) e teor de água do pulmão ( $p_{\text{tempo}} = 0,001$ ) e a redução nas variáveis peso VE/PC ( $p_{\text{tempo}} = 0,004$ ), peso VD/PC ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ) e teor de água no fígado ( $p_{\text{tempo}} = 0,011$ ) nos animais do grupo 4 meses em relação aos animais do grupo 2 meses.

**Tabela 5.** Estudo morfométrico realizado através da pesagem de tecidos no momento da eutanásia dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Valor p		
	C2 (n=20)	D2 (n=19)	C4 (n=19)	D4 (n=20)	Interação	Dieta	Tempo
<b>Peso VE (mg)</b>	782,5±19,8*	761,4±20,3*	903,4±20,3**	982,4±19,2*▼	<b>0,015</b>	0,154	< <b>0,001</b>
<b>Peso VE/PC (g/kg)</b>	2,09±0,04	2,09±0,04	1,96±0,04	2,01±0,04	0,466	0,529	<b>0,004</b>
<b>Peso VE/tíbia (g/cm)</b>	0,20±0,01*	0,19±0,01*	0,22±0,01**	0,24±0,01*▼	<b>0,009</b>	0,153	< <b>0,001</b>
<b>Peso VD (g)</b>	0,22±0,01	0,22±0,01*	0,21±0,01*	0,24±0,01*▼	<b>0,018</b>	0,069	0,158
<b>Peso VD/PC (g/kg)</b>	0,59±0,02	0,59±0,02	0,46±0,02	0,50±0,02	0,289	0,191	< <b>0,001</b>
<b>Peso VD/tíbia (kg/mm)</b>	5,56±0,17*	5,43±0,18*	5,05±0,18*	5,79±0,17*▼	<b>0,015</b>	0,087	0,694
<b>Peso átrio (mg)</b>	34,9±3,3	32,5±3,4	33,1±3,4	40,8±3,3	0,138	0,433	0,331
<b>Peso átrio/PC (g/kg)</b>	0,93±0,32	0,90±0,54	0,71±0,25	0,83±0,29	0,394	0,571	0,077
<b>Peso átrio/tíbia (kg/mm)</b>	0,88±0,08	0,82±0,08	0,79±0,08	0,98±0,08	0,116	0,446	0,699
<b>Teor de água VD (%)</b>	75,2±0,38	75,8±0,39	75,6±0,39	75,7±0,38	0,549	0,419	0,705
<b>Teor de água átrio (%)</b>	79,4±1,08	82,3±1,11	82,0±1,11	79,5±1,08	<b>0,017</b>	0,879	0,916
<b>Teor de água fígado (%)</b>	67,3±0,48	68,0±0,49	66,9±0,49	65,8±0,48	0,081	0,571	<b>0,011</b>
<b>Teor de água pulmão (%)</b>	69,9±0,90	72,0±0,92	76,3±0,92	76,1±0,90	0,219	0,274	< <b>0,001</b>

C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

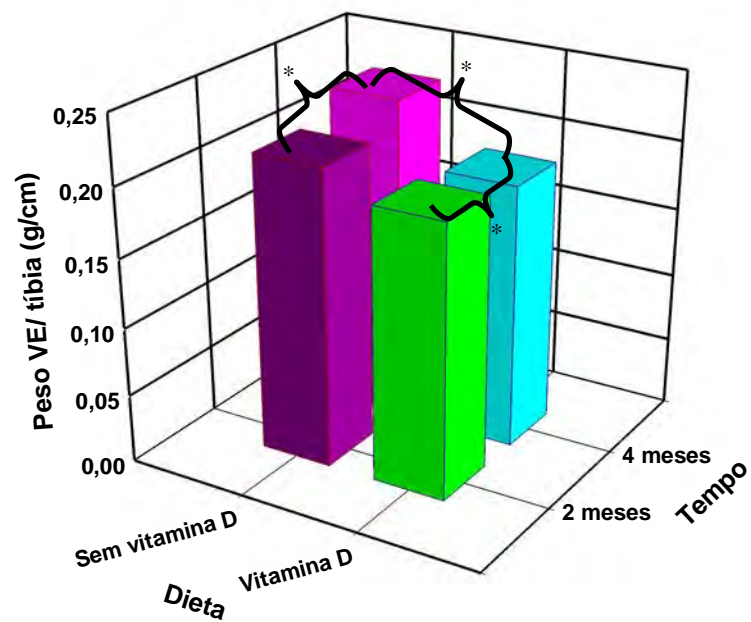
D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para p<0.05.

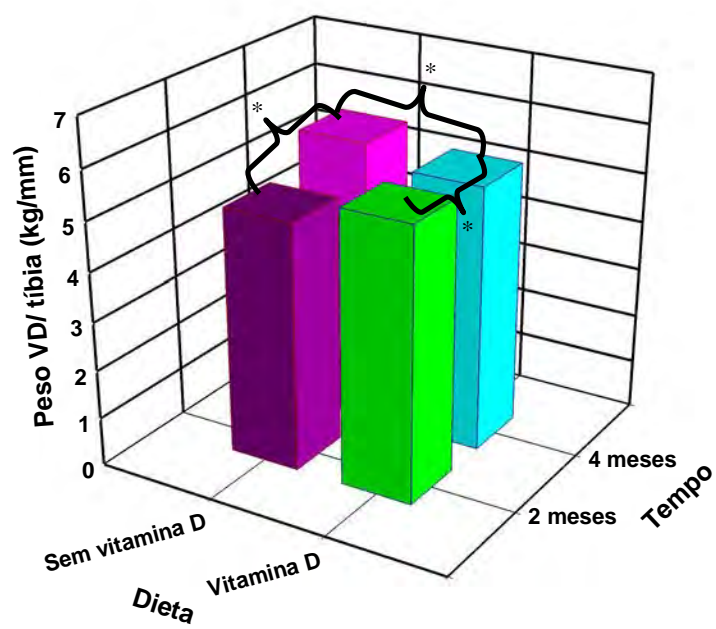
VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; PC: peso corporal.

\*: Diferença significativa de C2; \*\*: Diferença significativa de C4; ▼: Diferença significativa de D2;

\*: Diferença significativa de D4



**Figura 10.** Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tibia dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4, avaliado na eutanásia. C2: vitamina D e 2 meses; D2: sem vitamina D e 2 meses; C4: vitamina D e 4 meses; D4: sem vitamina D e 4 meses. \*  $p < 0,05$



**Figura 11.** Peso do ventrículo direito corrigido pelo comprimento da tíbia dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4, avaliado na eutanásia. C2: vitamina D e 2 meses; D2: sem vitamina D e 2 meses; C4: vitamina D e 4 meses; D4: sem vitamina D e 4 meses. \*  $p < 0,05$

---

### **Avaliação histológica**

A avaliação histológica do tecido cardíaco está apresentada na tabela 6.

A área de miócitos e a fração de colágeno no tecido cardíaco não tiveram influência da interação entre dieta e tempo de uso da dieta.

Houve efeito isolado da dieta na fração de colágeno (Grupo com vitamina D:  $3,99 \pm 0,32$ ; Grupo sem vitamina D:  $5,11 \pm 0,41$ ;  $p_{dieta} = 0,046$ ; Fig. 12), já que animais que não receberam vitamina D apresentaram aumento significativo do conteúdo de colágeno em relação àqueles que receberam a vitamina D na dieta.

O tempo de uso da dieta influenciou o aumento da área de miócitos ( $p_{tempo} = 0,002$ ) observado nos animais do grupo 4 meses em relação aos animais do grupo 2 meses, mas não teve influência do tempo de uso da dieta na fração de colágeno de colágeno.

**Tabela 6.** Estudo histológico por microscopia óptica dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Valor p		
	C2 (n=6)	D2 (n=6)	C4 (n=6)	D4 (n=6)	Interação	Dieta	Tempo
<b>Área de miócitos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	215,9 $\pm$ 15,7	236,6 $\pm$ 14,6	275,8 $\pm$ 14,6	283,4 $\pm$ 15,7	0,669	0,359	<b>0,002</b>
<b>Fração de Colágeno (%)</b>	4,14 $\pm$ 0,47	4,92 $\pm$ 0,47	3,84 $\pm$ 0,44	4,73 $\pm$ 0,69	0,523	<b>0,046</b>	0,938

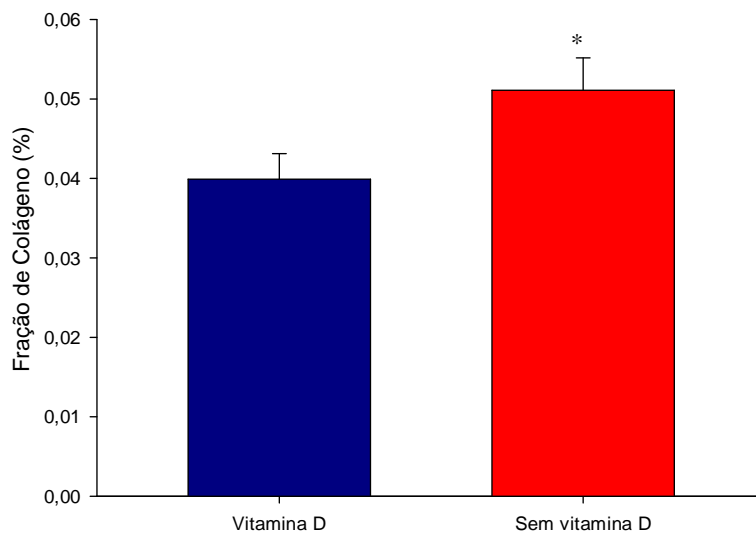
C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Significância estatística para  $p < 0.05$ .



**Figura 12.** Fração de colágeno dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D.  
\*  $p < 0,05$

---

### **Atividade das metaloproteínas 2 e 9**

Os dados relativos à avaliação da atividade das metaloproteínas 2 e 9 no tecido cardíaco estão apresentados na tabela 8.

Não houve efeito de interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta e nem efeito isolado da dieta sob as relações entre as atividades das metaloproteínas 2 e 9 ao compararmos os animais que receberam dieta isenta de vitamina D e aqueles que receberam vitamina D na dieta.

O tempo de uso da dieta fez com que animais que permaneceram em experimento por 4 meses apresentassem menor valor na relação entre a metaloproteína 2 (ativa e intermediariamente ativa) e a metaloproteína 9 (ativa) ( $p_{\text{tempo}} = <0,017$ ) e na relação entre a metaloproteína 2 (ativa e intermediariamente ativa) e a metaloproteína 2 (inativa) ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ) em relação aos animais que permaneceram por 2 meses em experimento.

**Tabela 8.** Atividade das metaloproteinasas 2 e 9 dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Valor p		
	C2 (n=6)	D2 (n=6)	C4 (n=6)	D4 (n=6)	Interação	Dieta	Tempo
MMP 2 (ativa+intermediária)/ MMP 9 (ativa)	7,34±0,93	5,25±0,50	4,55±0,76	4,31±0,50	0,203	0,114	<b>0,017</b>
MMP 2 (ativa)/ MMP 9 (ativa)	3,24±0,54	2,56±0,29	2,17±0,44	2,00±0,29	0,535	0,306	0,061
MMP 2 (ativa)/MMP 2 (inativa)	2,17±0,44	2,40±0,24	1,71±0,36	1,83±0,24	0,871	0,599	0,137
MMP 2 (ativa + intermediária)/MMP 2 (inativa)	5,15±0,43	4,83±0,23	3,52±0,35	3,83±0,23	0,351	0,981	<b>&lt;0,001</b>
MMP 2 (ativa)/ todas	0,31±0,05	0,35±0,03	0,32±0,04	0,31±0,03	0,599	0,611	0,659
MMP 9 (ativa)/ todas	0,12±0,02	0,14±0,01	0,15±0,02	0,16±0,01	0,837	0,247	0,084

C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para  $p < 0,05$ .

MMP: metaloproteinase

---

### **Metabolismo energético cardíaco**

Os dados relativos à avaliação do metabolismo energético cardíaco estão apresentados na tabela 8.

Houve interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta ao avaliarmos a atividade da enzima  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase ( $p_{\text{interação}} = <0,001$ ; Fig. 13), sendo que animais do grupo D2 e D4 apresentaram menor da atividade desta enzima em relação aos grupos C2 e D2, respectivamente. O efeito de interação entre os fatores influenciou a atividade da enzima lactato desidrogenase ( $p_{\text{interação}} = <0,001$ ; Fig. 14), e animais do grupo D4 apresentaram maior atividade desta enzima em relação aos animais do grupo C4.

Houve efeito isolado do tempo de uso da dieta ao analisarmos a atividade da enzima lactato desidrogenase ( $p_{\text{tempo}} = <0,001$ ).

**Tabela 9.** Metabolismo energético cardíaco dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Interação	Valor p	
	C2 (n=6)	D2 (n=6)	C4 (n=6)	D4 (n=6)		Dieta	Tempo
<b>β-hidroxiacil coenzima A desidrogenase (nmol/mg tecido)</b>	81,9±4,1 <sup>∗∧</sup>	56,3±4,1 <sup>∗∧</sup>	104,8±4,1 <sup>∗∧</sup>	26,9±4,1 <sup>∧∗</sup>	< 0,001	< 0,001	0,442
<b>Lactato desidrogenase (nmol/mg tecido)</b>	194,7±13,7 <sup>∗</sup>	195,8±13,7	65,5±13,7 <sup>∗∧</sup>	209,3±13,7 <sup>∗</sup>	< 0,001	< 0,001	< 0,001

C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

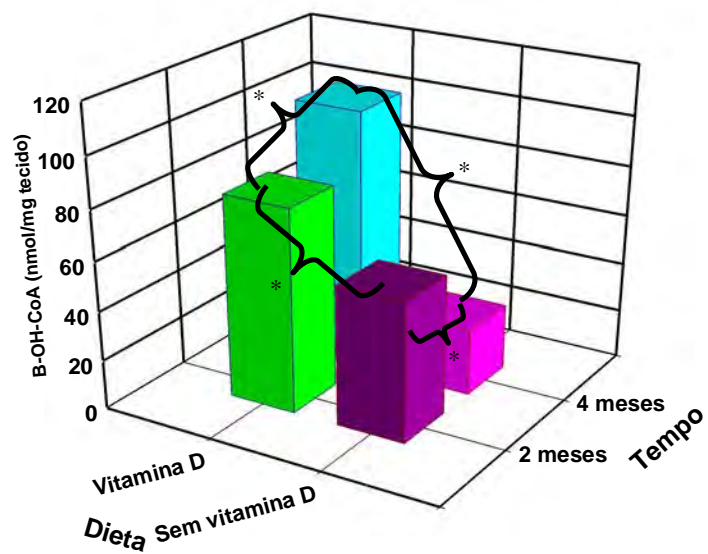
C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

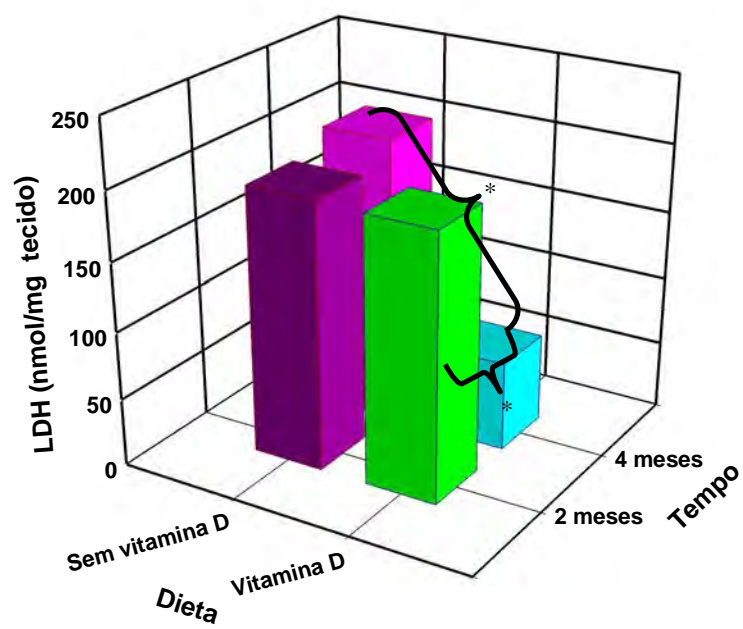
Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para p<0.05.

∗: Diferença significativa de C2; ∗: Diferença significativa de C4; ∧: Diferença significativa de D2;

∧: Diferença significativa de D4



**Figura 13.** Atividade da enzima  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase no tecido cardíaco dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4, avaliado na eutanásia. C2: vitamina D e 2 meses; D2: sem vitamina D e 2 meses; C4: vitamina D e 4 meses; D4: sem vitamina D e 4 meses. \*  $p < 0,05$



**Figura 14.** Atividade da enzima lactato desidrogenase no tecido cardíaco dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4, avaliado na eutanásia. C2: vitamina D e 2 meses; D2: sem vitamina D e 2 meses; C4: vitamina D e 4 meses; D4: sem vitamina D e 4 meses. \*  $p < 0,05$

---

## Estresse oxidativo e Nrf-2 cardíacos

Os dados relativos à avaliação do estresse oxidativo cardíaco estão apresentados na tabela 9.

Não houve efeito de interação entre a dieta e o tempo de uso da dieta sobre as variáveis estudadas para avaliação do perfil oxidativo no tecido cardíaco.

Houve efeito isolado da dieta sobre algumas variáveis, uma vez que animais que receberam dieta isenta de vitamina D apresentaram menor atividade das enzimas glutathiona peroxidase (Grupo com vitamina D:  $52,32 \pm 2,45$ ; Grupo sem vitamina D:  $37,34 \pm 2,45$ ;  $p_{dieta} = <0,001$ ; Fig. 15) e catalase (Grupo com vitamina D:  $1,48 \pm 0,11$ ; Grupo sem vitamina D:  $1,06 \pm 0,11$ ;  $p_{dieta} = 0,011$ ; Fig. 16), quando comparados aos animais que receberam dieta contendo vitamina D.

Além disso, houve efeito isolado da dieta ao analisarmos a maior concentração de hidroperóxido de lipídeos (Grupo com vitamina D:  $152,12 \pm 11,05$ ; Grupo sem vitamina D:  $273,41 \pm 11,05$ ;  $p_{dieta} = <0,001$ ; Fig. 17) e da proteína Nrf-2 (Grupo com vitamina D:  $0,70 \pm 0,05$ ; Grupo sem vitamina D:  $0,93 \pm 0,05$ ;  $p_{dieta} = 0,004$ ; Fig. 18) nos animais que receberam dieta isenta vitamina D em relação aos animais que receberam vitamina D na dieta.

O tempo de uso da dieta não influenciou as variáveis estudadas quando comparamos os animais que permaneceram em experimento por 2 e 4 meses.

**Tabela 10.** Estresse oxidativo cardíaco dos animais dos grupos C2, D2, C4 e D4

	Grupos				Interação	Valor p	
	C2 (n=6)	D2 (n=6)	C4 (n=6)	D4 (n=6)		Dieta	Tempo
<b>Glutationa peroxidase (nmol/mg tecido)</b>	59,13±3,47	37,64±3,47	45,50±3,47	37,05±3,47	0,075	<b>&lt; 0,001</b>	0,054
<b>Superóxido dismutase (nmol/mg proteína)</b>	13,09±1,41	13,25±1,41	11,86±1,41	8,72±1,41	0,255	0,303	0,055
<b>Catalase (µmol/mg proteína)</b>	1,61±0,15	1,02±0,15	1,35±0,15	1,11±0,15	0,253	<b>0,011</b>	0,553
<b>Hidroperóxido de Lipídios (nmol/mg tecido)</b>	160,7±15,62	289,4±15,6	143,5±15,6	257,4±15,6	0,642	<b>&lt; 0,001</b>	0,131
<b>Nrf-2</b>	0,69±0,08	0,87±0,07	0,71±0,07	0,99±0,07	0,514	<b>0,004</b>	0,344

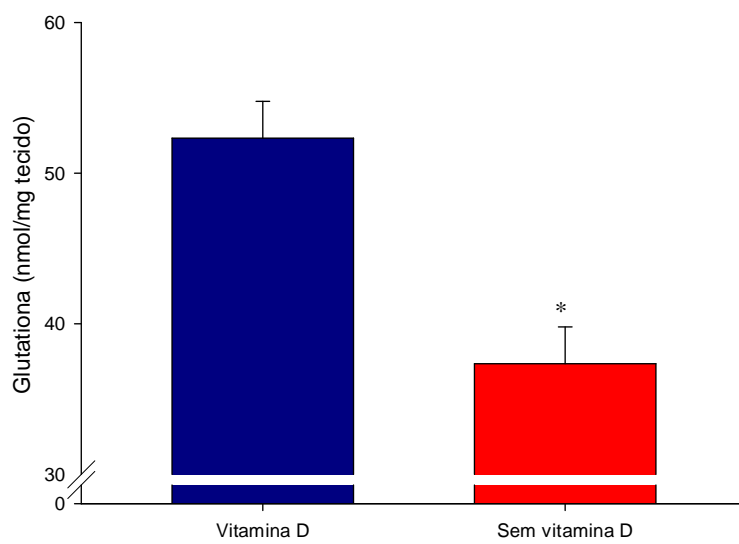
C2: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante dois meses.

D2: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante dois meses.

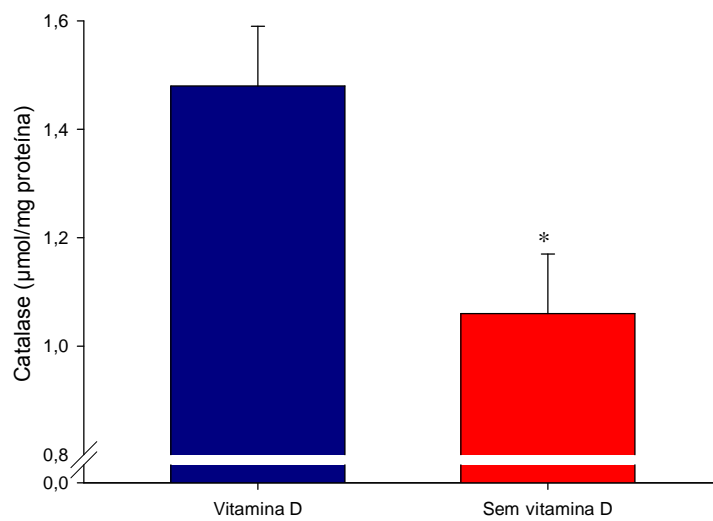
C4: animais que receberam 1.000IU de vitamina D/kg de ração durante quatro meses.

D4: animais que receberam dieta isenta de vitamina D durante quatro meses.

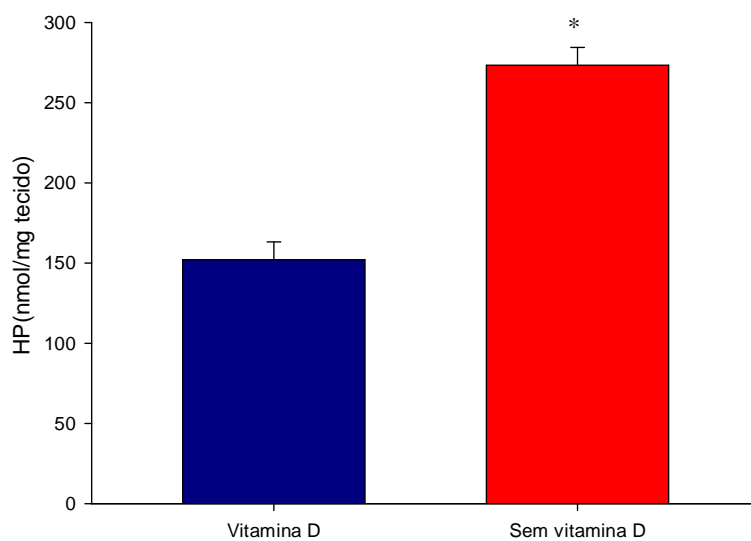
Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. Significância estatística para  $p < 0.05$ .



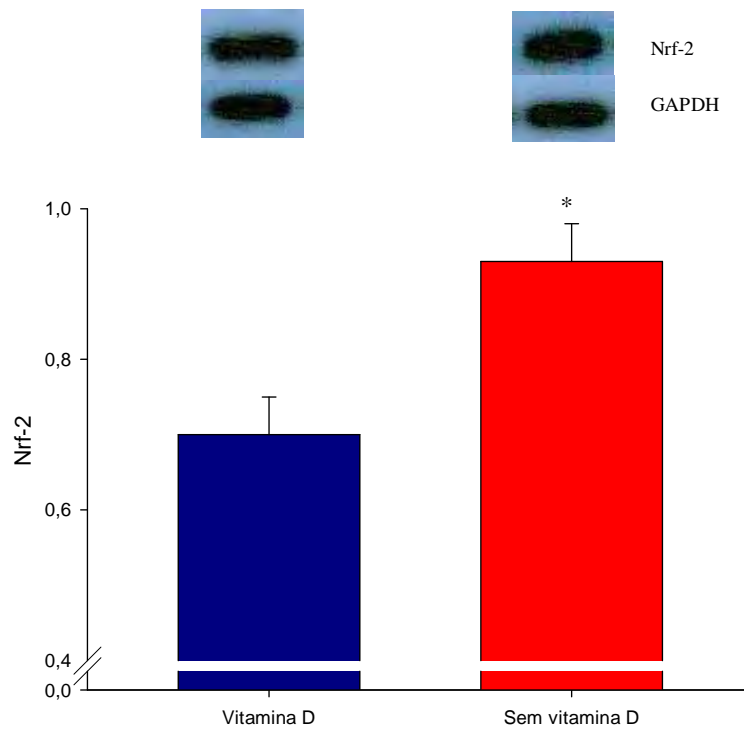
**Figura 15.** Atividade da enzima glutathiona peroxidase dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 16.** Atividade da enzima catalase dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 17.** Concentração de hidroperóxido de lipídios dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$



**Figura 18.** Nrf-2 dos animais que receberam dieta com vitamina D e sem vitamina D. \*  $p < 0,05$

*Discussão*

---

---

## Adequação do modelo proposto

O modelo utilizado neste experimento se mostrou eficiente na indução de estado nutricional caracterizado como deficiência de vitamina D <sup>(116)</sup> em ratos *Wistar*. A caracterização dessa situação de deficiência foi obtida por meio da dosagem da concentração plasmática de 25[OH]D, e animais que receberam dieta isenta de vitamina D apresentaram menor concentração deste metabólito em relação aos animais que receberam vitamina D na dieta.

A função clássica relacionada à vitamina D é regular o metabolismo de cálcio e fósforo <sup>(31)</sup>. Quando ocorre pequena redução da concentração sérica de cálcio ionizado, as glândulas da paratireóide aumentam a liberação do PTH, que por sua vez, regula a hidroxilação final da vitamina D, aumentando a síntese de seu metabólito fisiologicamente ativo, a 1,25[OH]<sub>2</sub>D <sup>(41)</sup>. Por sua vez, a vitamina D ativa atua em três tecidos-alvos relevantes para o metabolismo do cálcio. Inicialmente, a vitamina D estimula a desmineralização do tecido ósseo, promovendo a liberação de cálcio e fósforo para o sangue. Além disso, atua nos intestinos, aumentando a absorção do cálcio e fósforo ingeridos na dieta, e finalmente, atua no túbulo renal distal, ativando a reabsorção de cálcio <sup>(41)</sup>.

No sistema cardiovascular, a manutenção da homeostase do cálcio é importante uma vez que ele participa do processo de contração e relaxamento dos miócitos cardíacos. E, desde que a 1,25[OH]<sub>2</sub>D é importante fator na regulação da homeostase do cálcio intracelular no tecido cardíaco <sup>(117)</sup>, estudos mostram que a deficiência de vitamina D está associada à hipocalcemia e hiperparatireoidismo secundário <sup>(7, 92)</sup>. Assim, desde que tanto o cálcio quanto o PTH podem influenciar diretamente na função cardíaca <sup>(76)</sup>, alguns estudos <sup>(93, 94 118)</sup> que utilizam o modelo de dieta deficiente em vitamina D tentam, de alguma forma, manter as concentrações de cálcio e fósforo dentro dos valores de normalidade. A finalidade é de prevenir a hipocalcemia e o hiperparatireodismo secundário, e garantir que os efeitos no sistema cardiovascular sejam decorrentes da deficiência de vitamina D.

---

Anderson e colaboradores (2007) mostraram que a suplementação de 0,4% de cálcio na dieta é suficiente para manter a concentração sérica de cálcio em ratos mesmo quando a ingestão de vitamina D era nula <sup>(94)</sup>. Em estudo piloto realizado em nosso laboratório, por período de 1 mês, a dieta utilizada neste estudo mostrou-se eficiente em determinar estado de deficiência de vitamina D, sem alteração nos valores das dosagens séricas de cálcio e fósforo. Contudo, após período de 2 e 4 meses de experimento, mesmo com a suplementação de 0,7% de cálcio e 0,3% de fósforo, os animais que receberam dieta deficiente em vitamina D tiveram redução na concentração sérica de cálcio. É importante informar que, mesmo reduzidos, a concentração destes eletrólitos permaneceram dentro da faixa de normalidade para ratos.

No entanto, mesmo com a redução da concentração de cálcio, as alterações cardiovasculares encontradas no presente estudo não foram influenciadas por esse fator. Ao ajustar as variáveis estudadas pelo cálcio, por meio da Análise de Covariância, não observamos a influência do cálcio. Além disso, camundongos nocauteados para o gene do receptor da vitamina D e para a enzima 25-hidroxi 1 $\alpha$ -hidroxilase apresentam alterações cardíacas que persistem mesmo após a normalização das concentrações de cálcio e fósforo <sup>(119, 77, 120, 121, 122, 123)</sup>.

Com relação aos níveis séricos de fósforo, como previsto em modelo descrito por Anderson et al., 2007 <sup>(94)</sup>, e confirmado no estudo piloto, a suplementação de 0,3% de fósforo na dieta foi eficaz em promover a manutenção dos níveis de fósforo dentro da faixa de normalidade.

### *Pressão Arterial Sistólica*

A hipertensão arterial é bem caracterizada como fator de risco independente para doenças cardiovasculares <sup>(124)</sup>, e recentes estudos epidemiológicos e clínicos verificaram associação entre a hipertensão arterial e a concentração de 25[OH]D <sup>(124, 125, 126)</sup>. Além disso, os

---

níveis deste metabólito são inversamente relacionados ao risco de incidência de hipertensão (126, 127, 128).

Neste estudo, não houve diferença nas medidas de pressão arterial sistólica entre os animais que receberam dieta isenta de vitamina D e animais que receberam dieta contendo vitamina D. Isso mostra que neste modelo experimental, com os tempos de uso da dieta deficiente utilizados, a deficiência de vitamina D não esteve associada à hipertensão arterial. Assim, as alterações cardíacas observadas no presente estudo não foram decorrentes de sobrecarga pressórica.

### **Alterações cardíacas**

#### *Morfologia e função*

A ecocardiografia constitui a técnica diagnóstica não-invasiva que reúne as melhores qualificações para identificar o envolvimento cardíaco em roedores *in vivo* (129, 130, 131). Essa metodologia permite identificar e quantificar a hipertrofia ventricular, caracterizar o padrão geométrico ventricular, avaliar a função sistólica e diastólica ventricular. Assim, é boa ferramenta para avaliar a remodelação cardíaca.

A remodelação cardíaca pode ser definida como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestam clinicamente por alterações na arquitetura, tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a uma determinada injúria (132, 133, 134). Apesar de o processo de remodelação ocorrer em situações fisiológicas, como, por exemplo, o desenvolvimento normal do coração até a vida adulta, usualmente esse termo descreve alterações cardíacas patológicas que ocorrem como consequência de diversos estímulos (134). Atualmente, prevalece o conceito de que o processo de remodelação ventricular desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular. Ao reagir à determinada injúria, as alterações genéticas, estruturais e bioquímicas resultam, em

---

longo prazo, na deterioração da capacidade funcional do coração e no conseqüente aparecimento dos sinais e sintomas de insuficiência cardíaca <sup>(135, 136, 137)</sup>.

O estudo morfológico realizado por meio de ecocardiograma mostrou que animais deficientes em vitamina D apresentam maior massa do ventrículo esquerdo em relação aos demais animais. Essa maior massa do VE foi mostrada, também, pela análise da parede posterior do VE (EPP) e pela análise do peso do VE no momento da eutanásia, confirmando, portanto, a ocorrência de hipertrofia ventricular esquerda. Houve também aumento do peso do VD nos animais com deficiência de vitamina D, mostrando a ocorrência de hipertrofia ventricular direita e esquerda.

Na literatura são observados trabalhos experimentais com diversos modelos de deficiência em vitamina D como camundongos nocauteados para o gene do receptor da vitamina D (VDR) e para a enzima 25-hidroxi 1 $\alpha$ -hidroxilase, ratos mantidos com dieta deficiente em vitamina D e ratos neonatos nascidos de mães deficientes. Nestes trabalhos foi observada a presença de hipertrofia cardíaca <sup>(74, 119, 76, 120, 121, 138, 139, 81)</sup>.

Além da ocorrência de hipertrofia cardíaca, o ecocardiograma também mostrou que a deficiência de vitamina D está relacionada ao maior diâmetro diastólico do VE (DDVE), diâmetro sistólico do VE (DSVE), área do átrio direito, e do átrio esquerdo, indicando que a deficiência de vitamina D determina a ocorrência de aumento das cavidades cardíacas. Assim, a ocorrência de hipertrofia, associada ao aumento das cavidades, evidencia o processo de remodelação cardíaca que está ocorrendo em decorrência da deficiência de vitamina D.

Utilizando como variáveis ecocardiográficas o índice de massa e a espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo, é possível identificar quatro diferentes padrões de geometria: normal (índice de massa normal e espessura relativa normal); remodelamento concêntrico (índice de massa normal e espessura relativa aumentada); hipertrofia concêntrica (índice de massa aumentado e espessura relativa aumentada); e hipertrofia excêntrica (índice de massa aumentado e espessura relativa normal). Em relação à relevância dos padrões de remodelação

---

ventricular, no Jackson Cohort of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, o tipo de hipertrofia foi associado com o tipo de disfunção ventricular. Assim, hipertrofia excêntrica foi associada com disfunção sistólica, enquanto que hipertrofia concêntrica foi associada com disfunção diastólica. Por outro lado, a remodelação concêntrica não esteve associada com disfunção ventricular <sup>(140)</sup>.

Ao analisarmos a espessura relativa da parede posterior (ERPP), verificamos que apesar de estar ocorrendo hipertrofia e aumento de cavidades, houve aumento proporcional da EPP e do DDVE e, portanto, manutenção da geometria cardíaca. E, desde que a relação entre a ERPP e a massa do VE permite caracterizar o padrão geométrico de remodelação do VE <sup>(141)</sup>, foi possível caracterizá-lo como sendo do tipo excêntrico, já que houve aumento da massa do VE, porém a ERPP permaneceu inalterada.

Em relação à análise da função diastólica, as variáveis utilizadas foram a velocidade da onda E e da onda A, relação E/A, tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca. A diástole compreende uma série de eventos que interagem de modo complexo para que haja um enchimento ventricular adequado. A função diastólica é determinada pelas propriedades elásticas passivas do VE e pelo processo de relaxamento ativo. As alterações das propriedades elásticas passivas, bem como aquelas relacionadas ao relaxamento ativo, são geralmente causadas pela combinação de aumento da massa do miocárdio e alterações da rede de tecido intersticial e colágeno <sup>(142)</sup>.

Não houve alterações nas variáveis que avaliam a função diastólica no presente estudo. Este fato pode ter ocorrido devido à alta frequência cardíaca do rato, que prejudica a avaliação. Outra justificativa para a ausência de disfunção diastólica seria a dilatação do ventrículo esquerdo, que poderia levar a maior complacência da câmara, mudando a forma de enchimento, não permitindo a visualização desta disfunção.

O desempenho sistólico do VE é resultante de complexa interação de fatores que podem influenciar, em diferentes graus, a quantidade de sangue bombeada, sendo

---

fundamentalmente: a contratilidade intrínseca do miocárdio, as pré e pós-cargas e a frequência cardíaca <sup>(143)</sup>.

No presente estudo, o valor aumentado do diâmetro sistólico do VE e os valores diminuídos da fração de ejeção e da porcentagem de encurtamento mostram que a deficiência de vitamina D está relacionada à disfunção sistólica.

### *Fibrose cardíaca*

Os miócitos representam apenas 30% do número total de células miocárdicas, sendo as outras células as musculares lisas dos vasos, as endoteliais e os fibroblastos, entre outras. Circundando e interligando todas essas estruturas, está uma complexa e organizada rede de colágeno. As fibras de colágeno encontradas no interstício são predominantemente dos tipos I e III (95% do colágeno total), as quais formam a rede fibrilar em volta dos miócitos e das estruturas vizinhas. As principais funções dessa rede seriam: regular a apoptose, resistir às deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas e regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante o encurtamento da fibra cardíaca. Portanto, o tecido colágeno é um importante modulador tanto da função cardíaca diastólica como da função sistólica <sup>(144, 145)</sup>.

As fibras colágenas são firmemente justapostas, com fortes ligações químicas e resistentes à degradação causada pela maioria das proteases. Algumas enzimas, entretanto, têm atividade colagenolítica, entre as quais se destacam as metaloproteinases, responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular, e pertencentes à família das enzimas dependentes de zinco <sup>(146)</sup>.

Essas enzimas encontram-se em formas inativas (pró-enzima latente), podendo ser ativadas por uma série de estímulos mecânicos, isquêmicos, angiotensina II, fator de necrose tumoral, interleucina 1, entre outros. A quebra da rede de colágeno interfibrilar pode ter inúmeras conseqüências, tanto na arquitetura quanto na função ventricular <sup>(24)</sup>.

---

No presente estudo, a deficiência de vitamina D está relacionada ao maior conteúdo de colágeno da matriz extracelular. O aumento desproporcional da matriz intersticial colágena pode ocasionar disfunção diastólica pelo aumento da rigidez miocárdica <sup>(147)</sup>. Além disso, o crescimento não-proporcional da densidade de vasos ocasiona diminuição da reserva coronariana, com potencial deficiência de oxigenação e de nutrientes para o miócito, também determinando disfunção ventricular <sup>(132, 133, 135, 147)</sup>.

Já foi mostrado que a ablação do sistema de sinalização do receptor de vitamina D (VDR) resulta em relevantes alterações na estrutura cardíaca e que a deleção do VDR em camundongos, cria um fenótipo caracterizado por hipertrofia cardíaca e aumento na deposição intersticial de colágeno <sup>(148, 149)</sup>. Além disso, em modelo utilizando dieta deficiente em vitamina D, essas alterações também são observadas <sup>(94, 150)</sup>.

Alguns estudos que avaliaram a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no coração de ratos deficientes em vitamina D e camundongos VDR *knockout* mostraram que há aumento da atividade dessas enzimas <sup>(151)</sup>. No entanto, neste estudo não foram verificadas alterações na ativação das metaloproteinases 2 e 9. É possível que essa não concordância com os dados da literatura tenha ocorrido devido ao maior tempo de deficiência a que os animais deste estudo foram expostos, uma vez que em outras condições patológicas, como na ocorrência de fístula arterio-venosa, as metaloproteinases são rapidamente ativadas e permanecem significativamente elevadas durante aproximadamente cinco dias, retornando às condições basais em quatorze dias <sup>(152)</sup>.

#### *Metabolismo energético cardíaco*

O tecido cardíaco é capaz de satisfazer suas necessidades energéticas a partir da oxidação de ácidos graxos, glicose, lactato e outros substratos oxidáveis. Em situações normais, o coração utiliza os ácidos graxos como principal fonte de energia. Cerca de 60 a 90% do ATP produzido é proveniente desta fonte e o restante de glicose <sup>(153)</sup>.

---

Os ácidos graxos sofrem processo de beta-oxidação até a formação de acetil coenzima A que entrará no ciclo do citrato. Os carboidratos, pelo processo da glicólise, formam lactato, piruvato e depois acetil coenzima A para o ciclo do citrato. O ciclo do citrato resulta na formação de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH<sub>2</sub>) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) que entram em cadeia de transporte de elétrons gerando gradiente eletroquímico ao longo da membrana mitocondrial, permitindo a síntese de ATP. Este processo é denominado fosforilação oxidativa <sup>(154)</sup>.

A remodelação cardíaca patológica está associada a anormalidades no metabolismo energético <sup>(155)</sup>. Em situação de estresse cardíaco, os carboidratos passam a ser a principal fonte de energia, gerando, no entanto, quantidade menor de ATP. Várias enzimas participam deste processo e suas atividades podem sugerir se uma ou outra via estão em bom funcionamento <sup>(153, 154)</sup>.

O presente estudo encontrou aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase e redução da atividade da  $\beta$ -hidroxiacil coenzima A desidrogenase, mostrando que nos animais deficientes em vitamina D, a via glicolítica está mais ativa em relação à via de beta oxidação. Essa alteração do padrão metabólico do tecido cardíaco em decorrência da deficiência de vitamina D é dependente do tempo de uso da dieta, uma vez que essas alterações são mais evidentes após 4 meses de uso da dieta deficiente.

### **Estresse oxidativo cardíaco**

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres é chamado de estresse oxidativo <sup>(156)</sup>.

O metabolismo aeróbio do oxigênio por oxidação e redução, ocorre a todo o momento no organismo levando a formação de moléculas altamente reativas que incluem os radicais livres (superóxido, radical hidroxila), que apresentam um ou mais elétrons não-pareados. Outras moléculas como o peróxido de hidrogênio, apesar de não serem consideradas radicais

---

livres, detêm grande capacidade de causar toxicidade e dano celular <sup>(157, 158)</sup>. Deve haver, portanto, equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e os sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas antioxidantes enzimáticos mais conhecidos são dependentes da ação da glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Estes sistemas enzimáticos, de forma geral, são capazes de interceptar as espécies reativas já formadas, neutralizando os compostos oxidantes <sup>(159)</sup>. Existem ainda os antioxidantes não-enzimáticos hidrofílicos como proteínas, ácido ascórbico, ácido úrico, selênio, manganês, cromo, zinco e lipofílicos como o  $\alpha$ -tocoferol. Estes interceptam as espécies reativas de oxigênio, desativando-as por meio da formação de compostos que não são radicais livres e, portanto, não reativos <sup>(159)</sup>.

No presente estudo observamos que os sistemas enzimáticos cardíacos foram afetados pela deficiência de vitamina D, uma vez que houve redução na atividade das enzimas glutathiona peroxidase e catalase. Dessa forma, nota-se que a deficiência de vitamina D está relacionada à maior formação de radicais livres.

### **Nrf-2 e estresse oxidativo**

Os lipídios da membrana celular são particularmente susceptíveis à ação dos radicais livres devido à alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e à associação com sistemas enzimáticos e não-enzimáticos na membrana celular, que são capazes de gerar radicais livres <sup>(160)</sup>. Neste trabalho, observamos que a deficiência de vitamina D está relacionada à maior peroxidação lipídica no tecido cardíaco, confirmando o aumento do estresse oxidativo.

Os produtos finais da peroxidação lipídica formados durante o estresse oxidativo interagem com resíduos de cisteína, histidina, serina e lisina de diversas proteínas <sup>(161)</sup>. Tanto o Keap 1 quanto o Nrf-2 contém resíduos de serina em seu sítio ativo <sup>(87)</sup>. Assim, a ação dos hidroperóxidos de lipídios pode alterar o sítio de fosforilação, promovendo alteração conformacional do Keap 1 e do Nrf-2. Esta modificação faz com que o Nrf-2 se libere do Keap 1

---

e migre para o núcleo, onde irá atuar. Assim, em consequência do estresse oxidativo foi observado maior expressão da proteína Nrf-2 no núcleo dos cardiomiócitos. Este fenômeno pode ser tentativa das células cardíacas de aumentar o sistema de defesa antioxidante enzimático. Uma vez que o Nrf-2 ativa a resposta antioxidante e induz a transcrição de diversos genes relacionados ao combate aos efeitos deletérios do estresse oxidativo e à restauração da homeostase intracelular.

### **Influência do tempo**

A maioria das variáveis estudadas apresentam valores alterados no momento de 2 meses, mostrando que a deficiência de vitamina D promove alterações cardíacas com o uso da dieta deficiente por 2 meses, e estas alterações não se intensificam com o decorrer do tempo. Assim, para a maioria das variáveis, não se observa a influência do tempo sobre a deficiência de vitamina D, ou seja, o tempo de uso da dieta não influencia nas alterações encontradas.

No entanto, a massa do VE no tempo de 4 meses apresentou aumento mais evidente em relação ao tempo de 2 meses, mostrando que o tempo de uso da dieta acentuou as alterações na hipertrofia encontradas. Além disso, esta influência do tempo também foi observada quando analisamos a atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco.

Assim, o maior tempo de uso da dieta deficiente em vitamina D acarreta maior hipertrofia cardíaca e maior alteração no metabolismo energético.

*Conclusões*

---

---

A deficiência de vitamina D está relacionada à remodelação cardíaca do tipo excêntrica, piora da função sistólica, aumento do conteúdo de colágeno da matriz extracelular e alteração no metabolismo energético cardíaco.

O estresse oxidativo gerado pela deficiência de vitamina D é mecanismo participante do processo de remodelação cardíaca.

A maior expressão da proteína Nrf-2 nuclear pode ser tentativa das células cardíacas de aumentar o sistema de defesa antioxidante enzimático nos animais deficientes em vitamina D.

O maior tempo de uso da dieta deficiente em vitamina D acarreta maior hipertrofia cardíaca e maior alteração no metabolismo energético.

## *Bibliografia*

---

- 
- 1 - Pérez-López FR. Vitamin D and its implications for musculoskeletal health in women: An update. *Maturitas*. 2007; 58: 117-137.
  - 2 - Holick MF. Vitamin D: the underappreciated D-light full hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 2002; 9: 87–98.
  - 3 - Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, Hass E, Overbeck S, Thomsen J, Charles P, Eriksen EF. Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *J Intern Med*. 2000; 247: 260–268.
  - 4 - Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77: 204–210.
  - 5 - Holick MF. Vitamin D. In *Modern nutrition in health and disease*. 10th edition. M Shills et al., editors. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 2005; 329-345.
  - 6 - MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. *Science*. 1982; 216: 1001-1003.
  - 7 - Holick MF. Vitamin D. Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79:362-371.
  - 8 - Pérez-López FR. Vitamin D: the secosteroid hormone and human reproduction. *Gynecol Endocrinol*. 2007; 23: 13-24.
  - 9 - Barraguy JM, France MW, Corless D, Gupta SP, Switala S, Boucher BJ, Cohen RD. Intestinal cholecalciferol absorption in the elderly and in younger adults. *Clin Sci Mol Med*. 1978; 55: 213-220.
  - 10 - Clemens TL, Zhou X, Myles M, Endres D, Lindsay R. Serum vitamin D2 and vitamin D3 metabolite concentrations and absorption of vitamin D2 in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 63: 656–660.

- 
- 11- Clemens TL, Adams JS, Holick MF. Measurement of circulating vitamin D in man. *Clin Chim Acta*. 1982; 121: 301-308.
- 12 - Gray AW, Caldas AE, Wilz DR, Lemann J, Smith GA. Excretion of 3H-1,25-dihydroxyvitamin D3 in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 46: 756-765.
- 13 - Holick M F. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol*. 1981; 77: 51-58.
- 14 - Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357: 266-281.
- 15 - Brenza HL, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 381: 143-152.
- 16 - Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999; 277: F157-F175.
- 17 - Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Calcium and vitamin D metabolism during lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1997; 2: 253-263.
- 18 - Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y, Klotho A. Gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol*. 2003; 17: 2393-2403.
- 19 - Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289: F8-F28.
- 20- Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)<sub>2</sub>-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: 533-537.
- 21 - Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. *Science*. 2001; 294: 1866-1870.
- 22 - Rochel N, Wurtz JM, Mitscheler A, Klaholz B, Moras D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell*. 2000; 5: 173-179.

- 
- 23 - Pike JW, Meyer MB, Watanuki M, Kim S, Zella LA, Fretz JA, Yamazaki M, Shevde NK. Perspectives on mechanisms of gene regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103: 389-395.
- 24 - Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S. The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1- $\alpha$ -hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249: 11-16.
- 25 - Farach-Carson MC, Abe J, Nishii Y, Khoury R, Wright GC, Norman AW. 22-Oxacalcitriol: dissection of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> receptor mediated and Ca<sup>2+</sup> entry-stimulating pathways. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1993; 265: F705-F711.
- 26 - Zanello LP, Norman AW. 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225: 551-556.
- 27 - Nakagawa K, Sowa Y, Kurobe M, Ozono K, Siu-Caldera ML, Reddy GS, Uskokovic MR, Okano T. Differential activities of 1,25-dihydroxy-16-ene-vitamin D<sub>3</sub> analogs and their 3-epimers on human promyelocytic leukemia (HL-60) cell differentiation and apoptosis. *Steroids.* 2001; 66: 327-337.
- 28 - Beno DWA, Brady LM, Bissonnette M, Davis BH. Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase are required for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-stimulated Egr induction. *J Biol Chem.* 1995; 270: 3642-3647.
- 29 - Song X, Bishop JE, Okamura WH, Norman AW. Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in pro-myelocytic NB4 leukemic cells: a structure function study. *Endocrinology.* 1998; 139: 457-465.
- 30 - Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin d status. *Osteoporosis Int.* 2005; 16: 713-716.

- 
- 31 - Norman AW, Roth J, Orci L. The vitamin D endocrine system. *Endocr Rev.* 1982; 3: 331-366.
- 32- Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81: 253-273.
- 33 - Boonen S, Bischoff-Ferrari HA, Cooper C, Lips P, Ljunggren O, Meunier PJ, Reginster JY . Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int.* 2006; 78: 257-270.
- 34 - Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LM, Vieira JG, Kunii I, Hayashi LF, Côrrea MP, Lazaretti-Castro M. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23o 34'S) Brazil. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 1649-1654.
- 35 - Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LM, Vieira JG, Maeda SS, Borba VZC, Kunii I, Hayashi LF, Lazaretti-Castro M. Prevalência da Deficiência, Insuficiência de Vitamina D e Hiperparatiriodismo Secundário em Idosos institucionalizados e Moradores na Comunidade da Cidade de São Paulo, Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51: 437-442.
- 36 - Peters BSE, Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of vitamin D insufficiency in brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab.* 2009; 54: 15-21.
- 37 - Silva BC, Camargos BM, Fujii JB, Dias EP, Soares MMS. Prevalência de Deficiência e Insuficiência de Vitamina D e sua Correlação com PTH, Marcadores de Remodelação Óssea e Densidade Mineral Óssea, em Pacientes Ambulatoriais. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 52: 482-488.
- 38 - Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet.* 1982; 1: 74-76.
- 39 - Matsuoka LY, Wortsman J, Chen TC, Holick MF. Compensation for the interracial variance in the cutaneous synthesis of vitamin D. *J Lab Clin Med.* 1995; 126: 452-457.

- 
- 40 - Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 690-693.
- 41 - Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1678S– 1688S.
- 42 - Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, Saltzman E, Dawson-Hughes B. Vitamin D<sub>3</sub> in fat tissue. *Endocrine.* 2008; 33: 90-94.
- 43 - Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research. 2006; 129-137.
- 44 - Lomonte C, Antonelli M, Vernaglone L, Cazzato F, Casucci F, Chimienti D, Bruno A, Cocola S, Verrelli EA, Basile C. Are low plasma levels of 25-(OH) vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism independent of calcitriol in renal transplanted patients? *J Nephrol.* 2005; 18: 96.
- 45 - Larsen ER, Mosekilde L, Foldspang A. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based-3-year intervention study. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 370-378.
- 46 - Mawer EB, Hayes ME, Heys SE, Davies M, White A, Stewart MF, Smith GN. Constitutive synthesis of 1,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by a human small cell lung cancer cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 554-560.
- 47 - Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> from 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7: 391-395.
- 48 - Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ - hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids.* 2001; 66: 287-292.

- 
- 49 - Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, Tseng CC, Chen TC, Holt PR, Lipkin MS, Holick MF. 25-Hydroxyvitamin D- 1 $\alpha$ -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet*. 2001; 357: 1673-1674.
- 50 - Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, DeLuca HF. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology*. 1983; 113: 1511-1518.
- 51 - Lips P. Vitamin D physiology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2006; 92: 4-8.
- 52 - McGrath J, Selten JP, Chant D. Long-term trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration – data from Australia and Netherlands. *Schizophr Res*. 2002; 54: 199-212.
- 53 - Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D insufficiency in congestive heart failure: why and what to do about it? *Heart Fail Rev*. 2006; 11: 25.
- 54 - Bocchi EA. I Diretriz Latino-Americana para avaliação e conduta na insuficiência cardíaca descompensada. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005; 85: 1-45.
- 55 - Ministério da Saúde (Data SUS). Acesso em 25 de agosto de 2008. <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>
- 56 - Mesquita ET. Fisiopatogenia e etiopatogenia da insuficiência cardíaca. In: Mesquita ET, Bocchi EA, Vilas-Boas F, Villacorta H, Baima J, Tavares LR, Moura LAZ, Montera MW eds: *Avanços na Prática Clínica da Insuficiência Cardíaca Descompensada*, Office Editora e Publicidade, São Paulo- SP, Brasil. 2002; 3: 43-58.
- 57 - Sutton MGS, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction - Pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000; 101: 2981-2988.
- 58 - Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol de São Paulo*. 2002; 12: 371-378.

- 
- 59 - Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo OS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SAR, Zornoff, LAM. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit.* 2008; 14: BR62-66.
- 60 - Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-582.
- 61 - Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res.* 1991; 69: 1185-1195.
- 62 - Olivetti G, Abbi R, Quaine F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1131-1141.
- 63 - Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol.* 1978; 128: 79-85.
- 64 - Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation.* 1990; 82: 1387-1401.
- 65 - Villareal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation.* 1993; 88: 2849.
- 66 - Bozkeurt B, Kribbs SB, Clubb FJ. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor in cachectic patients with severe chronic heart failure. *Br Heart J.* 1991; 66: 356-358.
- 67 - Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure. *Eur. Heart J.* 19 Suppl. B:S138-41, 1998.
- 68 - Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2000; 1: 8-16.
- 69 - Scragg R. Sunlight, vitamin D and cardiovascular disease. In: Crass MF III, Avioli LV, eds. *Calcium-regulating hormones and cardiovascular function.* Boca Raton: CRC Press. 1995; 213-237.

- 
- 70 - Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Körfer R, Stehle P. A., Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *Journal of the American College of Cardiology*. 41(1): 105-112, 2003.
- 71 - Stumpf WE, Dar M, DeLuca HF. Sites of action of 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> identified by thae-mount autoradiography. In: Cohn DV, Talmage RV, Matthews JL (eds) *Hormonal control of calcium metabolism*. Excerpta Medica, Amsterdam. 1981; 222–229.
- 72 - O'Connell T, Simpson RU. Immunochemical identification of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor protein in human heart. *Cell Biol Int*. 1996; 20: 621-624.
- 73 - De Boland AR, Boland RL. Non-genomic signal transduction pathway of vitamin D in muscle. *Cell Signal*. 1994; 6: 717-724.
- 74 - Weishaar RE, Simpson RU. Vitamin D<sub>3</sub> and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest*. 1987; 79: 1706-1712.
- 75 - Weishaar RE, Simpson RU. The involvement of endocrine system in regulating cardiovascular function: emphasis on vitamin D<sub>3</sub>. *Endocr Rev*. 1989; 10: 351-365.
- 76 - Weishaar RE, Kim RE, Kim SN, Saunders DE, Simpson RU. Involvement of vitamin D<sub>3</sub> with cardiovascular function III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol*. 1990; 258: E134-E142.
- 77 - Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2007; 103: 521-524.
- 78 - Rahman A, Hershey S, Ahmed 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: 416-419.
- 79 - Wu JJ, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1577-1588.

- 
- 80 - Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Oiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li YC. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac rennin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288: E125-E132.
- 81 - Gezmish O, Tare M, Parkington HC, Morley R, Porrello ER, Bubb KJ, Jane M. Maternal Vitamin D Deficiency Leads to Cardiac Hypertrophy in Rat Offspring *Reproductive Sciences.* 2010; 17: 168-178.
- 82 - Azevedo PS, Minicucci MF, Minicucci FC, Justulin LA, Matsubara LS, Matsubara BB, Novelli E, Seiva F, Ebaid G, Campana AO, Zornoff LAM, Paiva SAR. Ventricular Remodeling Induced by Tissue Vitamin A Deficiency in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2010; 26: 395-402.
- 83 - Gulçin D, Elias R, Gepdiremen A, Boyer L. Antioxidant activity of lignans from fringe 579 tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Eur Food Res Technol.* 2006; 223: 759-767.
- 84 - Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 361-370.
- 85 - Yla-Herttuala S. Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 1999; 874: 134-137.
- 86 - Campanero MR, Flemington EK. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 2221-2226.
- 87 - Kensler T, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap 1-nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 89-116.
- 88 - Ishii T, Yanagawa T. Stress-induced peroxiredoxins. *Subcell Biochem.* 2007; 44: 375-384.
- 89 - Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46: 443-453.
- 90 - Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36: 1199-1207.
- 91 - González-Reimers E, Durán-Castellón MC, López-Lirola A, Santolaria-Fernández F, Abreu-González P, Alvisa-Negrín J, Sánchez-Pérez MJ. Alcoholic Myopathy: Vitamin D Deficiency is Related to Muscle Fibre Atrophy in a Murine Model. *Alcohol & Alcoholism.* 2010; 45: 223-230.

- 
- 92 - Holtrop ME, Cox KA, Carnes DL, Holick MF. Effects of serum calcium and phosphorus on skeletal mineralization in vitamin D-deficient rats. *Am J Physiol.* 1986; 251: E234-E240.
- 93 - Kollenkirchen U, Walters MR, Fox J. Plasma Ca influences vitamin D metabolite levels as rats develop vitamin d deficiency. *Am J Physiol.* 1991; 260: E447-E452.
- 94 - Anderson PH, Sawyer RK, May BK, O'Loughlin PD, Morris HA. 25-Hydroxyvitamin D requirement for maintaining skeletal health utilizing a Sprague-Dawley rat model. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2007; 103: 592-595.
- 95 - National Research Council. Nutrient requirements of the laboratory rat. Pp. 7–37 in *Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Third Revised Ed.* Washington, D.C.: National Academy Press. 1978.
- 96 - Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-Mode Standardization of the American Society of Echocardiography, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58: 1072-1083.
- 97 - Lang RM, Bierig M, Devereaux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005; 18: 1440-1463.
- 98 - Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebakk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000; 89: 1445-1454.
- 99 - Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Pai-Silva MD, Carvalho RF, Cicogna AC, Padovani CR, Novelli ELB, Novo R, Campana AO, Paiva SAR. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicological Sciences.* 2006; 90: 259-266.

- 
- 100 - Yin FCP, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol.* 1982; 243: H941-H947.
- 101 - Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980; 104: 179-183.
- 102 - Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SAR, Zornoff LAM, Matsubara BB. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 126-130.
- 103 - Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- 104 - Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278: 2396-2402.
- 105 - Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969; 11: 198-206.
- 106 - Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition.* 2004; 20: 230-34.
- 107 - Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável: estresse oxidativo e metabolismo energético.* Ribeirão Preto: Tecmedd; 2005.
- 108 - Bass A, Brdiczka PE, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969; 10: 198-206.
- 109 - Moura RA. *Técnicas de laboratório.* São Paulo: Atheneu; 1982.
- 110 - Nakamura W; Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1974; 358: 251-261.
- 111 - Crouch RK, Gandy SC, Kisey G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes.* 1981; 30: 235-241.

- 
- 112 - Aebi H. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York: Verlag chemie Weinheim. 1974
- 113 - Jiang ZY, Woolard AC, Wolf S. Lipid Hydroperoxide measurement by oxidation of Fe 2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. Lipids. 1991; 26: 853-856.
- 114 - 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: 339-343.
- 116 - Pedro-Botet, J. Vitamina d: ? Un nuevo factor de riesgo cardiovascular? Clin Invest Arterosc. Doi: 10.1016/j.artert.2009.07.001. 2010
- 117 - Fitzpatrick LA, Bilezikian JP, Sitverberg SJ. Parathyroid hormone and the cardiovascular system. Curr Osteoporos Rep. 2008; 6: 77-83.
- 118 - Lester GE, Vanderwiel CJ, Gray K, Talmage RV. Vitamin D deficiency in rats with normal serum calcium concentrations. Proc Natl Acad Sci. 1982; 79: 4791-4794.
- 119 - Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional Vitamin D Receptor (VDR) in the T-Tubules of Cardiac Myocytes: VDR Knockout Cardiomyocyte Contractility. Endocrinology. 2007; 149: 558-564.
- 120 - Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. Endocr Rev. 2008; 29: 726-776.
- 121 - Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z F, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. J Clin Invest. 2002; 110: 229-238.
- 122 - Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, et al. Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the reninangiotensin system in 1a-hydroxylase knockout mice. Kidney Int. 2008; 74: 170-179.
- 123 - Thadhani R. Targeted ablation of the vitamin D 1a-hydroxylase gene: getting to the heart of the matter. Kidney Int. 2008; 74: 141-143.

- 
- 124 - Kannel WB et al. Systolic blood pressure, arterial rigidity and stroke. The Framingham Study. JAMA. 1981; 245: 1225-1228.
- 125 - Snijder MB, et al. Vitamin D status and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure: a population - based study in older man and women. J. Intern. Med. 261: 558-565, 2007.
- 126 - Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity and blood pressure in the Third National Health and Nutritional Examination survey. Am J Hypert. 2007; 20: 713-719.
- 127 - Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25- hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. Hypertension. 2007; 49: 1063-1069.
- 128 - Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lainer K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasani RS: Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. Circulation. 2008; 117: 503-511.
- 129 - Hoit BD, Khan ZU, Pawloski-Dham CM, Walsh RA: In vivo determination of left ventricular wall stress-shortening relationship in normal mice. Am J Physiol 1997; 272: H1047-1052.
- 130 - Letwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiography assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. Circulation. 1994; 89: 345-354.
- 131 - Pawlusch DG, Moore RL, Musch IT, Davidson WR. Echocardiography evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophic rat ventricles. J Am Physiol. 1993; 74: 2598-2605.
- 132 - Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats - Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. Hypertension. 1996; 28: 269-75.
- 133 - Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Rev. 1999; 79: 215-262.

- 
- 134 - Weber KT. Targeting pathological remodeling - Concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation*. 2000; 102: 1342-1345.
- 135 - Devereux RB. Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2000; 139: S9-S14.
- 136 - Ciardullo AV, Azzolini L, Bevini M, et al. A diagnosis of left ventricular hypertrophy on ECG is associated with a high cardiovascular risk: findings from a 40-to 69-year-old cohort in general practice. *Fam Pract*. 2004; 21: 63-65.
- 137 - Messerli FH. Hypertension and sudden cardiac death. *Am J Hypertens*. 1999.
- 138 - Sood S, Reghunandanan R, Reghunandanan V, Gopinathan K, Sood A K. Effect of vitamin D deficiency on electrocardiogram of rats. *Indian J Exp Biol*. 1995; 33: 61-63.
- 139 - Bazzani C, Arletti R, Bertolini A, Vitamin D deficiency reduces the inotropic effect of ouabain. *Acta Vitaminol Enzymol*. 1983; 5: 147-151.
- 140 - Fox E, Taylor J, Taylor H, Han H, Samdarshi T, Arnett D, et al. Left ventricular geometric pattern in the Jackson Cohort of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: clinical correlates and influences on systolic and diastolic dysfunction. *Am Heart J*. 2007; 153: 238-44.
- 141 - Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba OS. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992; 19: 1550-1558.
- 142 - Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation*. 2002; 105: 1503-1508.
- 143 - Graziosi P. Análise ecocardiográfica da função diastólica do ventrículo esquerdo na hipertensão arterial. *HiperAtivo*. 1998; 3: 175-188.
- 144 - Weber KT. Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2001; 38: 588-91.
- 145 - Zannad F, Dousset B, Alla F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone- cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension*. 2001; 38: 1227-1232.

- 
- 146 - Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res.* 1996; 816-21.
- 147 - Janicki JS. Myocardial Collagen remodeling and left ventricular diastolic function. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25: 975-982.
- 148 - Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Franco M, Cicogna AC. Myocardial fibrosis rather than hypertrophy induces diastolic dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997; 75: 1328-1334.
- 149 - Namba T, Tsutsui H, Tagawa H, et al. Regulation of fibrillar collagen gene expression and protein accumulation in volume-overloaded cardiac hypertrophy. *Circulation.* 1997; 95: 2448-2454.
- 150 - O'Connell T, Barry J, Jarvis A, Sommerman M, Simpson R. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1984; 272: H1751-H1758.
- 151 - Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson R U. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103, 416-419.
- 152 - Brower GL, Chancey AL, Thanigaraj S, Matsubara BB, Janicki JS. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol.* 2002; 283: H518-H525.
- 153 - Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-508.
- 154 - Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut.* 2004; 9: 31-45.
- 155 - Van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ. Metabolic remodeling of the heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res.* 2009; 81: 420-428.

- 
- 156 - Sies, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*. 1993; 215: 213-219.
- 157 - Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart Lung Circ*. 2004; 13: 132-138.
- 158 - Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras*. 1997; 43: 61-68.
- 159 - Sies H. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiol*. 1997; 82: 291-295.
- 160 - Aruoma O. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc*. 1998; 75: 199-212.
- 161 - Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11: 81-128.

*Anexos*

---



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99




Comissão de Ética em Experimentação Animal

## CERTIFICADO

**CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 693 sobre o Projeto de Pesquisa "Remodelação cardíaca induzida pela deficiência de vitamina D em ratos: Adaptação fisiológica ou patológica", a ser conduzido por Heloísa Balan Assalin orientada pelo Prof. Dr. Sérgio Alberto Rupp de Paiva, Co-orientada pelo Prof. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 25 de setembro de 2.008

  
Prof. Dr.ª Regina Helena G. Martins  
Presidente da CEEA

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA



Araçoiaba da Serra, 04 de Fevereiro de 2010.

**ESCLARECIMENTO TÉCNICO**

Vimos por meio desta, informar que não foi possível produzir a solicitação da pesquisadora Heloisa Balan Assalin da UNESP de uma Dieta AIN-93G *Modificada* com 2% de Cálcio, 1,25% de Fósforo e 20% de Lactose por quilo de dieta baseando-nos na Referência Bibliográfica do J.Nutr.123: 1939-1951, 1993 intitulada "AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet". A já citada formulação possibilitou um ajuste máximo de 0,7% de Cálcio por quilo de dieta respeitando todas as demais concentrações mineral vitamínicas originais.

A Dieta isenta de vitamina D foi produzida com 0,7% de Cálcio e 0,3% de Fósforo.

Sem mais pelo momento subscrevemo-nos atentiosamente,



Rhoster Indústria e Comércio Ltda.