

*Lucienne da Cruz Oliveira*

**Influência da Suplementação de Ácido  
Retinóico no Processo de Remodelação  
Cardíaca Induzida pela Exposição à Fumaça  
do Cigarro em Ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica, área de concentração Cardiologia.

Orientador: Prof. Adj. *Leonardo A. M. Zornoff*

Co-orientador: Prof. Adj. *Sergio A. R. de Paiva*

Botucatu  
2009

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

Lucienne da Cruz Oliveira.

Influência da suplementação de ácido retinóico no processo de remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro em ratos / Lucienne da Cruz Oliveira. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Adj. Leonardo A. M. Zornoff

Co-orientador: Prof. Adj. Sérgio A. R. de Paiva

Assunto CAPES: 40101002

1. Cardiologia. 2. Fumo – Efeito fisiológico. 3. Clínica médica.

CDD 363.4

Palavras chave: Ácido retinóico; Fumaça do cigarro; Remodelação cardíaca.

**Dedicatória**

---

Aos meus pais Lucilo e Isaura, pelos ensinamentos, pelo exemplo de caráter, de vida e determinação, base sob a qual me faço Ser. À vocês que são meu refúgio, meu alicerce, meu mundo, meu tudo, o meu muito obrigada pelo amor, carinho, orgulho, confiança e incentivo de sempre.

Ao meu irmão Lucio pelas muitas brincadeiras de criança, pela amizade, pelo orgulho e amor.

Ao meu pequenino Lucas pela alegria contagiante. Você é meu anjinho, minha alegria, meu príncipe.

Ao Franco, que me preenche e me acompanha em todos os momentos da minha vida, pela sua ajuda imprescindível, pelo apoio incansável, pela amizade e pelo amor incondicional.

À tia Cida, que me dedica sempre suas orações.

À todos vocês, Minha Família, que me completam, que são simplesmente tudo. Sempre e para todo sempre. Deus os abençoe! Amo vocês demais!

# Agradecimientos

---

À Deus, pois sem Ele nada seria possível.

A Professora Adjunta Beatriz Bojikian Matsubara pela realização do ecocardiograma nesta pesquisa e pela participação em minha qualificação, sempre me ensinando de forma carinhosa e serena.

Aos Prof. Assistente Doutor Katashi Okoshi pela participação em minha qualificação, pela paciente leitura, pelas questões levantadas e correções valorosas.

Aos Professores do Departamento de Clínica Médica que possibilitaram meu aprendizado e a conclusão desta pesquisa.

Aos Funcionários do Laboratório Experimental pela inestimável colaboração, em especial a Corina Julieta Corrêa, Elenize Jamas, José Carlos Georgette, Mário Batista Bruno, Sandra Ângela Fábio, Sueli Aparecida Clara e Vitor Marcos de Souza.

Aos Funcionários e Secretária do Departamento de Clínica Médica pela consideração.

Aos Funcionários da Pós-Graduação por toda gentileza e apoio administrativo em especial à Regina Célia Spadin.

Aos Colegas e Amigos da Pós-graduação em especial Alexandre Rodrigues, André dos Santos Moro, Cristiana Maria Murbach Freire, Daniela de Rezende Duarte, Fabiana Gouveia Denipote, Lidiane Paula Ardisson, Marcos Ferreira Minicucci, Paula Schmidt Azevedo Gaiolla e Olga Mendes, pela ajuda, vivência e convivência

Aos amigos Regina Valle e João Carlos Fontanari, pela amizade e hospitalidade.

Ao amigo Cristiano Machado Galhardi, pela amizade, confiança e por me possibilitar a realização de um sonho.

## Agradecimentos Especiais

Ao Professor Adjunto *Leonardo Antonio Mamede Zornoff*, pela oportunidade de aprendizado, pela segurança, tranquilidade e competência de sua orientação.

Ao Professor Adjunto *Sergio Alberto Rupp de Paiva*, pela participação na co-autoria desta dissertação.



# Sumário

---

1. Introdução .....	1
2. Hipótese .....	7
3. Objetivos .....	9
4. Material e Métodos .....	11
4.1 Exposição ao Fumo .....	12
4.2 Peso Corporal dos Animais .....	13
4.3 Avaliação da Pressão Arterial Caudal .....	13
4.4 Avaliação Morfológica e Funcional pelo Ecocardiograma .....	13
4.5 Estudo Morfométrico .....	15
4.6 Análise Estatística .....	16
5. Resultados .....	17
5.1 Peso Inicial e Final dos Animais .....	18
5.2 Pressão Sistólica Caudal .....	18
5.3 Estudo Ecocardiográfico .....	18
5.4 Estudo Morfométrico .....	20
6. Discussão .....	31
7. Conclusão .....	38
8. Resumo .....	40
9. Abstract .....	42
10. Referências Bibliográficas .....	44

## Lista de Abreviações

---

<b>AE</b>	- diâmetro do átrio esquerdo
<b>AE/Ao</b>	- diâmetro do átrio esquerdo ajustado ao diâmetro da aorta
<b>AE/PC</b>	- diâmetro do átrio esquerdo ajustado ao peso corporal
<b>Ao</b>	- diâmetro da aorta
<b>DDVE</b>	- diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
<b>DDVE/PC</b>	- diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal
<b>DSVE</b>	- diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
<b>DSVE/PC</b>	- diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal
<b>E/A</b>	- relação entre as ondas E e A do fluxo diastólico transmitral
<b>EPP</b>	- espessura da parede posterior
<b>EPP/DDVE</b>	- espessura da parede posterior ajustado ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
<b>FC</b>	- frequência cardíaca
<b>FE</b>	- fração de ejeção
<b>Grupo C</b>	- grupo controle
<b>Grupo EFC</b>	- grupo exposto à fumaça do cigarro
<b>Grupo EFC-AR</b>	- grupo exposto à fumaça do cigarro e suplementado com ácido retinóico
<b>IMVE</b>	- índice de massa do ventrículo esquerdo
<b>MMP</b>	- metaloproteases
<b>TRIV</b>	- tempo de relaxamento isovolumétrico
<b>VAo</b>	- velocidade do sangue na valva aórtica
<b>VD</b>	- ventrículo direito
<b>VD/PC</b>	- ventrículo direito ajustado ao peso corporal
<b>VE</b>	- ventrículo esquerdo
<b>VE/PC</b>	- ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal

# 1. Introdução

---

O tabagismo é a principal causa evitável de morte e incapacidade física em todo o mundo. As mortes associadas ao fumo devem ultrapassar nove milhões ao ano em 2030, em todo o mundo, segundo as projeções. Outro aspecto importante é que o impacto financeiro nos serviços de saúde é considerável<sup>(1)</sup>.

As principais conseqüências cardiovasculares da exposição à fumaça do cigarro são os acidentes vasculares cerebrais agudos, a angina do peito, o infarto do miocárdio e a morte súbita<sup>(2-4)</sup>. Os mecanismos pelos quais o tabagismo aumenta o risco de doença cardíaca são múltiplos e interagem uns com os outros. Esses mecanismos incluem aumento da agregação plaquetária, vasoconstrição, disfunção endotelial, aumento da rigidez arterial, aumento da aterosclerose, aumento do estresse oxidativo e diminuição da defesa antioxidante, inflamação, diminuição da produção energética no músculo cardíaco e uma diminuição da atividade do sistema parassimpático<sup>(5)</sup>.

O entendimento das ações cardiovasculares do fumo implica no estudo das complexas características do cigarro. Em relação à composição do cigarro, a folha do fumo contém intrincada mistura de componentes químicos: hidrocarbonetos, fenóis, ácidos graxos, isoprenos, ésteres e minerais inorgânicos<sup>(6,7)</sup>.

A fumaça do cigarro é composta por mais de 4.000 substâncias tóxicas e por aproximadamente 48 substâncias pré-cancerígenas<sup>(8,9)</sup>. Ela é formada por mistura heterogênea de gases, vapores e partículas líquidas, sendo dividida em duas fases, particulada e gasosa. A fase gasosa representa cerca de 60% do total da fumaça do cigarro e destes, 98,9% são compostos de nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, monóxido de carbono, hidrogênio, argônio e metano<sup>(6,7)</sup>. A fase de partículas compreende partículas metálicas, nicotina, anabatina, fenol, catecol, hidroquinona, colesterol, quinona, harmana, ácido benzóico, ácido láctico, ácido glicólico e ácido succínico<sup>(10,11)</sup>.

Um dos principais componentes do cigarro é a nicotina. Essa substância é uma amina terciária composta por anéis de piridina e pirolodina<sup>(12)</sup>, encontrada no tabaco tanto na fase particulada como na fase gasosa, e pode estar livre ou ligada a sais diversos. A nicotina livre existe em maior quantidade na fase gasosa, é rapidamente absorvida e causa impacto maior nos centros cerebrais,

enquanto que a presa está geralmente na fase particulada<sup>(6,12)</sup>. Essa substância é responsável pelo padrão de dependência e é o principal componente psicoativo do tabaco, responsável pelo estímulo de sensações prazerosas como redução de ansiedade e tensão. Quando aspirada, a nicotina chega ao cérebro em oito segundos ao passo que se fosse aplicada por via direta (endovenosa) levaria 14 segundos<sup>(6,9,13)</sup>.

A fumaça do cigarro liberada no meio ambiente é constituída pela fumaça central ou principal e fumaça periférica ou lateral. A fumaça central é gerada quando o fumante traga o cigarro, ela produzida em altas temperaturas (acima de 950°C) e constitui a fonte predominante de exposição dos indivíduos fumantes ativos<sup>(14-16)</sup>.

A fumaça periférica é formada em temperaturas mais baixas (cerca de 350°C), durante a queima lenta e espontânea do cigarro que ocorre entre as tragadas e é a fonte de exposição de todos aqueles que inalam a fumaça presente no meio ambiente, os chamados fumantes passivos. Este tipo de fumaça corresponde a 85% da fumaça de cigarro presente no ambiente. A composição química dos dois tipos de fumaça é similar. O que as diferencia é que a fumaça central é filtrada, enquanto que a periférica não<sup>(14,15,17,18)</sup>. Os fumantes passivos absorvem menor quantidade de fumaça em comparação com a quantidade absorvida por um fumante ativo<sup>(14,19)</sup>. Devemos considerar, entretanto, que embora o risco para fumantes passivos seja menor do que para fumantes ativos, a proporção de pessoas fumantes passivas é muito maior<sup>(5,14,20)</sup>.

Como exemplos da relação entre a ação da fumaça periférica e o sistema cardiovascular, um estudo caso-controle na China mostrou que mulheres que convivem com maridos fumantes apresentam maior incidência de artérias coronárias estenosadas. Adicionalmente, o número de artérias estenosadas aumentou significativamente com o aumento do número de cigarros fumados por ano pelos maridos<sup>(21)</sup>. No modelo de camundongo expostos à fumaça do cigarro por período de 6 horas por dia, as lesões ateroscleróticas foram maiores nos ratos expostos ao fumo em comparação com o grupo controle<sup>(22)</sup>. Em estudo transversal realizado em 2001 e 2003 com 1218 participantes, verificou-se que a exposição ao cigarro em casa ou no trabalho está associada a menor variabilidade

e maior frequência cardíaca, sugerindo que a exposição ao fumo aumenta o risco cardíaco através de distúrbios no sistema autônomo<sup>(23)</sup>. Exposição à fumaça por longo prazo resulta em desequilíbrio sistêmico oxidantes-antioxidantes, com aumento dos produtos da peroxidação lipídica e esgotamento dos níveis de antioxidantes, como as vitaminas A e C no plasma dos fumantes<sup>(5)</sup>.

Recentemente, estudos em nosso laboratório analisaram os efeitos da exposição à fumaça do cigarro em variáveis funcionais e morfológicas cardíacas no modelo do rato. De forma consistente, foi demonstrado que a exposição à fumaça do cigarro resultou em aumento da cavidade do ventrículo esquerdo, aumento do índice de massa ventricular esquerda, aumento da área seccional do miócito, acompanhado por queda de variáveis da função ventricular, como a fração de ejeção e de encurtamento sistólico<sup>(10,24-26)</sup>. Assim, aceita-se que a exposição à fumaça do cigarro, no modelo do rato, resulta em remodelação cardíaca e queda da função ventricular.

Remodelação pode ser definida como alteração na expressão gênica cardíaca, caracterizada por variações moleculares, celulares e intersticiais, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, constituição, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão<sup>(27,28)</sup>.

Apesar do 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 conseqüência de diversos estímulos. Assim, fatores mecânicos (sobrecarga hemodinâmica pressórica ou volumétrica), bioquímicos (angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6, fator de crescimento transformador beta 1, fator de crescimento símile-insulina 1, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) e genéticos (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada) podem tanto desencadear como regular a remodelação cardíaca<sup>(29-34)</sup>.

Inicialmente, em conseqüência do crescimento celular, a remodelação pode contribuir para manter ou restaurar a função cardíaca. Cronicamente, ocorrem variações bioquímicas, genéticas e estruturais que irão resultar em disfunção ventricular progressiva e morte<sup>(27-34)</sup>. Aspecto importante é que a velocidade de instalação da deterioração miocárdica é variável; quando a agressão



é muito intensa e/ou a capacidade reacional encontra-se diminuída, surge precocemente a disfunção ventricular<sup>(33)</sup>.

Entre os fatores que podem estar envolvidos no fenômeno de deterioração progressiva da função ventricular, destacam-se: morte celular (apoptose, necrose e autofagia), alterações das proteínas contráteis, fibrose, alterações das metaloproteases, alterações da via beta-adrenérgica e do transporte de cálcio, alterações do citoesqueleto, alterações das proteínas de membrana (integrinas ADAM e as metaloproteases de membrana), alterações das proteínas da matriz (trombospondina 2, osteopontina e tenascina C), déficit energético, aumento do estresse oxidativo, hipertrofia e alterações geométricas<sup>(33,34)</sup>.

Pelo exposto, existem diversos mecanismos fisiopatológicos que podem estar envolvidos na deterioração funcional no coração remodelado. Em função dessas alterações, usualmente o processo de remodelação cardíaca está associado com prognóstico ruim. Assim, em diferentes modelos experimentais, inúmeras estratégias vêm sendo testadas para atuar nos mecanismos citados acima no intuito de prevenir, atenuar ou reverter esse processo. Entre essas estratégias, destaca-se a vitamina A.

A vitamina A constitui termo nutricional que descreve uma família de compostos alimentares essenciais lipossolúveis que são estruturalmente relacionados com o retinol e que compartilham a mesma atividade biológica. O termo retinóides se refere tanto ao retinol e seus metabólitos naturais como a um grande número de análogos sintéticos que apresentam semelhanças estruturais com o retinol, como o ácido retinóico. A vitamina A, em suas diversas formas, é necessária para a visão, crescimento, proliferação celular, diferenciação celular e a integridade do sistema imune <sup>(35)</sup>.

Os efeitos da vitamina A no coração também têm sido estudados. Estudos experimentais, em diferentes laboratórios, sugerem que a suplementação de ácido retinóico, um metabólito da vitamina A, atenuou a remodelação cardíaca induzida por infusão de endotelina, adrenalina, angiotensina II, sobrecarga pressórica por hipertensão arterial sistêmica e constrição da aorta e após o infarto agudo do miocárdio<sup>(36-40)</sup>. Portanto, o ácido retinóico parece proteger o coração frente a diferentes estímulos. Devemos considerar, entretanto, que os efeitos da suplementação de ácido retinóico no processo de remodelação induzido pelo tabagismo não são conhecidos.

## 2. Hipótese

---

Os dados apresentados anteriormente permitem a hipótese de que a suplementação de ácido retinóico atenua a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro.

## 3. Objetivos

---

Analisar os efeitos da suplementação de ácido retinóico em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas de ratos expostos à fumaça do cigarro.

## 4. Material e Métodos

---

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina - UNESP (Protocolo 555/06), estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g, provenientes do Biotério Central do Campus da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas para adaptação, alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), de temperatura (aproximadamente 25° C) e de umidade.

Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo C (n=8), formado pelos animais controle, grupo EFC (n=9), formado pelos animais expostos à fumaça de cigarro e grupo EFC-AR (n=9), formado pelos animais expostos à fumaça do cigarro e que receberam ácido retinóico misturado na dieta (0,3 mg/kg de dieta). A dose de ácido retinóico utilizada neste protocolo foi a mesma utilizada em estudos prévios<sup>(36,37)</sup>. Os animais foram observados por 2 meses.

#### **4.1 Exposição ao Fumo**

Para expor os animais à fumaça de cigarro, foi utilizado o método proposto por Wang et al<sup>(41)</sup>, já padronizado em nosso laboratório<sup>(10,24-26)</sup>. Os ratos foram colocados em uma câmara transparente, cujas medidas são aproximadamente 95x80x65 cm e conectada ao dispositivo para produção de fumaça dos cigarros. A fumaça dos cigarros aspirada por vácuo era veiculada para câmara em que estavam alojados os animais, durante um período de 30 minutos. Após esse período, a fumaça era exaurida com intervalos de 10 minutos e o procedimento repetido. Na primeira semana, a fumaça era obtida a partir de 5 cigarros, duas vezes por dia no período da tarde. Nas semanas seguintes, o número de cigarros foi aumentado para o total de 10 cigarros, duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde, totalizando neste período do estudo experimental, exposição à 40 cigarros/dia. Utilizou-se cigarro comercial



comum com a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono.

## **4.2 Peso Corporal dos Animais**

Para aquisição do peso corporal (PC), todos os animais do grupo controle, do grupo exposto à fumaça do cigarro e os animais do grupo expostos à fumaça do cigarro e suplementados com ácido retinóico foram pesados semanalmente e no dia da eutanásia por balança analítica de precisão.

## **4.3 Avaliação da Pressão Sistólica Caudal**

Após 45 dias do início do experimento, foi mensurada a pressão sistólica caudal (PSC) através de um pletismógrafo de cauda, formado por um polígrafo (Byu-Sistem PE 300, NARCO) com sensor e um pletismógrafo, possibilitando desta forma o registro gráfico da pressão arterial. Antes do procedimento, os animais foram aquecidos em uma caixa de madeira com 2 lâmpadas de filamento gerando calor de 37 ° C. Os animais permaneciam nesta caixa por 4 minutos e posteriormente eram transferidos para um suporte cilíndrico de ferro, especialmente desenhado para permitir que a cauda do animal ficasse completamente exposta para a mensuração da pressão sistólica caudal. Na região proximal da cauda foi colocado um sensor (KSM-microfone) ligado ao pletismógrafo. Os resultados dessa mensuração foram registrados em papel com o polígrafo na velocidade de 2,5mm/s.

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

Após o período de 2 meses de tratamento, os animais dos 3 grupos foram submetidos a estudo ecocardiográfico, segundo método descrito previamente<sup>(10,24,25)</sup>. Resumidamente, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg), por via intramuscular, e após tricotomia da região anterior do tórax, foram posicionados

em decúbito lateral esquerdo. O ecocardiograma foi realizado com equipamento da Philips (HDI 5500), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. A avaliação dos fluxos foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5 MHz. A partir do corte paraesternal em eixo menor, obteve-se a imagem monodimensional transversa do ventrículo esquerdo, utilizando-se a imagem bidimensional como guia para posicionamento do feixe ultrassônico logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. A imagem foi registrada no modo monodimensional, ajustada para a velocidade de 100 mm/s e realizada por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Para análise das estruturas cardíacas as medidas foram realizadas manualmente no próprio monitor e em acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography<sup>(42)</sup>.) As estruturas cardíacas foram medidas em três a cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do VE (EPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento de máxima excursão sistólica da parede posterior da cavidade. A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a porcentagem de encurtamento sistólico  $(DDVE-DSVE/DDVE) \times 100$  e a fração de ejeção  $(DDVE^3-DSVE^3/DDVE^3)$ . O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. Os picos de velocidade nas fases de enchimento ventricular rápido (onda E) e durante a contração atrial (onda A) foram medidas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, em cinco ciclos cardíacos consecutivos. Para o cálculo do índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) a massa do VE foi normalizada para o peso corporal. Na posição apical de cinco câmaras foi medido o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), correspondendo ao intervalo entre o final do fluxo sistólico pela via de saída do VE e o início do enchimento do VE.

## 4.5 Estudo Morfométrico

No dia seguinte à realização do ecocardiograma os animais foram anestesiados com tiopental sódio (50mg/Kg). Efetuou-se a esternotomia mediana e os órgãos foram retirados para o estudo morfométrico, segundo técnica já padronizada<sup>(10,24,26)</sup>. Os corações retirados foram dissecados e os ventrículos direito (VD) e o esquerdo (VE), incluindo o septo interventricular, separados e pesados em balança de precisão (modelo B-6000 da Micromal) correspondendo ao peso úmido. Após a pesagem os fragmentos foram colocados em estufa, previamente regulada em 80 ° C, por um período de 48 horas. Novamente os fragmentos desidratados foram pesados na mesma balança para obtenção do peso seco. O peso úmido do ventrículo esquerdo (PVE) e do ventrículo direito (PVD), normalizado para peso corpóreo final do rato (PC), foi utilizado como índice de hipertrofia ventricular. O conteúdo de água do pulmão foi avaliado pela relação entre peso úmido e seco do tecido.

Amostras de tecido cardíaco foram então fixadas em solução de formol a 10% por período de 48 horas, segundo relato prévio<sup>(43)</sup>. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes histológicos coronais de 4 µm. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução Hematoxilina - Eosina (HE) ou Masson para medir a área seccional transversa dos miócitos (ASM), empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentando forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localizados na camada sub-endocárdica do ventrículo esquerdo. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada VE foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 µm e corados pela técnica de Picro Sirius red, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. Para a leitura

utilizou-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cyberetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo, utilizando objetiva de 40X<sup>(43)</sup>.

#### **4.6 Análise Estatística**

As variáveis obtidas com distribuição normal estão apresentadas com médias  $\pm$  desvios-padrão e as comparações entre os grupos foram efetuadas pela análise de variância para experimentos inteiramente casualizados, complementada pelo teste de Tukey. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, os valores estão apresentados em mediana e intervalo interquartilício e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn. O nível de significância foi de 5%.

## 5. Resultados

---

## 5.1 Peso Inicial e Final dos Animais

Considerando o peso dos animais no início (C =  $256 \pm 8$  g; EFC =  $257 \pm 4$  g; EFC-AR =  $258 \pm 6$  g;  $p = 0,818$ ) e no final (C =  $382 \pm 46$  g; EFC =  $343 \pm 40$  g; EFC-AR =  $362 \pm 43$  g;  $p = 0,212$ ) do tratamento proposto, não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

## 5.2 Pressão Sistólica Caudal

Em relação à pressão sistólica caudal não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (C =  $116 \pm 27$  mmHg; EFC =  $129 \pm 17$  mmHg; EFC-AR =  $139 \pm 19$  mmHg;  $p = 0,102$ ).

## 5.3 Estudo Ecocardiográfico

Os resultados do estudo ecocardiográfico estão apresentados nas tabelas 1 e 2 e nas figuras de 1 à 6.

Considerando os dados morfológicos, o diâmetro do átrio esquerdo (C =  $3,88 \pm 0,65$  mm; EFC =  $4,13 \pm 0,74$  mm; EFC-AR =  $4,14 \pm 0,72$  mm;  $p = 0,697$ ), o diâmetro da aorta (C =  $3,35 \pm 0,29$  mm; EFC =  $3,29 \pm 0,28$  mm; EFC-AR =  $3,40 \pm 0,26$  mm;  $p = 0,692$ ), o diâmetro do átrio esquerdo ajustado ao diâmetro da aorta (C =  $1,16 \pm 0,18$ ; EFC =  $1,25 \pm 0,18$ ; EFC-AR =  $1,21 \pm 0,16$ ;  $p = 0,545$ ), diâmetro do átrio esquerdo ajustado ao peso corporal (C =  $10,22 \pm 1,69$  mm/kg; EFC =  $12,01 \pm 1,61$  mm/kg; EFC-AR =  $11,47 \pm 1,85$  mm/kg;  $p = 0,117$ ) não mostraram diferença estatisticamente significante. Em relação ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (C =  $6,92 \pm 0,67$  mm; EFC =  $7,82 \pm 0,56$  mm; EFC-AR =  $7,05 \pm 0,70$  mm;  $p = 0,042$ ), houve diferença estatisticamente significante; no entanto, não houve poder para identificar quais as diferenças entre os grupos, Em relação ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal (C =  $18,42 \pm 3,57$  mm/kg; EFC =  $23 \pm 1,85$  mm/kg; EFC-AR =  $19,51 \pm 0,99$  mm/kg;  $p = 0,001$ ), o grupo EFC apresentou diferença estatisticamente significante quando comparado com o

grupo C e quando comparado ao grupo EFC-AR. O mesmo ocorreu no diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ( $C = 3,09 \pm 0,67$  mm;  $EFC = 3,93 \pm 0,44$  mm;  $EFC-AR = 3,01 \pm 0,59$  mm;  $p = 0,004$ ) e na relação diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal dos animais ( $C = 8,25 \pm 2,16$  mm/kg;  $EFC = 11,53 \pm 1,31$  mm/kg;  $EFC-AR = 8,25 \pm 0,71$  mm/kg;  $p = <0,001$ ). A espessura da parede do ventrículo esquerdo não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $C = 1,55 \pm 0,45$  mm;  $EFC = 1,26 \pm 0,24$  mm;  $EFC-AR = 1,36 \pm 0,15$  mm;  $p = 0,144$ ), em relação a espessura da parede do ventrículo esquerdo ajustado ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ( $C = 0,20$  (0,18-0,23);  $EFC = 0,15$  (0,14-0,18);  $EFC-AR = 0,19$  (0,17-0,22);  $p = 0,030$ ) o grupo EFC apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. O índice de massa do ventrículo esquerdo ( $C = 1,79 \pm 0,22$  g/kg;  $EFC = 1,92 \pm 0,36$  g/kg;  $EFC-AR = 1,67 \pm 0,17$  g/kg;  $p = 0,169$ ) não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Considerando os resultados funcionais, a frequência cardíaca ( $C = 284$  (273-297bpm);  $EFC = 267$  (257-292bpm);  $EFC-AR = 286$  (263-318bpm);  $p = 0,655$ ) não se mostrou diferente entre os grupos. Em relação à função sistólica, a fração de ejeção ( $C = 0,91 \pm 0,02$ ;  $EFC = 0,87 \pm 0,03$ ;  $EFC-AR = 0,92 \pm 0,03$ ;  $p = 0,003$ ) e a porcentagem de encurtamento ( $C = 55,77 \pm 4,41\%$ ;  $EFC = 49,73 \pm 4,43\%$ ;  $EFC-AR = 57,60 \pm 5,15\%$ ;  $p = 0,005$ ) mostraram diferença estatisticamente significativa no grupo EFC quando comparado com o grupo C e EFC-AR. A velocidade do sangue na valva aórtica ( $C = 83,75 \pm 21,77$ ;  $EFC = 91,55 \pm 16,35$ ;  $EFC-AR = 92,26 \pm 6,60$ ;  $p = 0,491$ ) não mostrou diferença entre os grupos. As variáveis relacionadas à função diastólica como onda E ( $C = 76,12 \pm 14,21$  cm/s;  $EFC = 77,33 \pm 7,04$  cm/s;  $EFC-AR = 75,70 \pm 8,11$  cm/s;  $p = 0,939$ ), onda A ( $C = 49,50$  (43-54 cm/s);  $EFC = 44$  (41,25-59,75 cm/s);  $EFC-AR = 48$  (40,75-52,25 cm/s);  $p = 0,841$ ), relação E/A ( $C = 1,60 \pm 0,36$ ;  $EFC = 1,62 \pm 0,24$ ;  $EFC-AR = 1,58 \pm 0,32$ ;  $p = 0,953$ ) e tempo de relaxamento isovolumétrico ( $C = 24,25 \pm 5,85$  ms;  $EFC = 22,47 \pm 5,11$  ms;  $EFC-AR = 22,64 \pm 3,21$  ms;  $p = 0,711$ ) não mostraram diferença estatisticamente significativa.

## 5.4 Estudo Morfométrico

A figura 8 e a tabela 3 exibem os dados obtidos nas análises morfométricas.

Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao peso do ventrículo esquerdo ( $C = 0,75 \pm 0,12$  g; EFC =  $0,71 \pm 0,11$  g; EFC-AR =  $0,72 \pm 0,10$  g;  $p = 0,706$ ), peso do ventrículo direito ( $C = 0,20 \pm 0,04$  g; EFC =  $0,19 \pm 0,04$  g; EFC-AR =  $0,19 \pm 0,03$  g;  $p = 0,838$ ), peso do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal do animal ( $C = 1,96 \pm 0,10$  mg/g; EFC =  $2,07 \pm 0,16$  mg/g; EFC-AR =  $1,97 \pm 0,14$  mg/g;  $p = 0,240$ ), peso do ventrículo direito ajustado ao peso corporal do animal ( $C = 0,53$  (0,49-0,55 mg/g); EFC =  $0,58$  (0,51-0,64 mg/g); EFC-AR =  $0,53$  (0,52-0,54 mg/g);  $p = 0,447$ ), teor de água no pulmão ( $C = 3,41 \pm 0,29$  %; EFC =  $3,25 \pm 0,44$  %; EFC-AR =  $3,34 \pm 0,40$  %;  $p = 0,713$ ), teor de água no fígado ( $C = 3,18$  (3,09-3,28 %); EFC =  $3,22$  (3,14-3,36 %); EFC-AR =  $3,22$  (3,16-3,26 %);  $p = 0,707$ ) e porcentagem de colágeno ( $C = 2,32$  (1,72-2,84) %; EFC =  $3$  (2,52-3,46) %; EFC-AR =  $3,14$  (2,70-4,56) %;  $p = 0,061$ ). Em relação à área seccional do miócito, o grupo EFC apresentou maiores valores que C e EFC-AR ( $C = 294 \pm 21$   $\mu\text{m}^2$ ; EFC =  $347 \pm 44$   $\mu\text{m}^2$ ; EFC-AR =  $310 \pm 37$   $\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,016$ ).



**Tabela 1.** Resultados morfológicos do ecocardiograma 2 meses após o tratamento.

	<b>Grupo C</b> (N = 8)	<b>Grupo EFC</b> (N = 9)	<b>Grupo EFC-AR</b> (N = 9)
<i>AE (mm)</i>	3,88 ± 0,65	4,13 ± 0,74	4,14 ± 0,72
<i>Ao (mm)</i>	3,35 ± 0,29	3,29 ± 0,28	3,40 ± 0,26
<i>AE/Ao</i>	1,16 ± 0,18	1,25 ± 0,18	1,21 ± 0,16
<i>AE/PC</i>	10,22 ± 1,69	12,01 ± 1,61	11,47 ± 1,85
<i>DDVE (mm)</i>	6,92 ± 0,67	7,82 ± 0,56	7,05 ± 0,70
<i>DDVE/PC (mm/kg)</i>	18,42 ± 3,57	23 ± 1,85*#	19,51 ± 0,99
<i>DSVE (mm)</i>	3,09 ± 0,67	3,93 ± 0,44*#	3,01 ± 0,59
<i>DSVE/PC (mm/kg)</i>	8,25 ± 2,16	11,53 ± 1,31*#	8,25 ± 0,71
<i>EPP (mm)</i>	1,55 ± 0,45	1,26 ± 0,24	1,36 ± 0,15
<i>EPP/DDVE</i>	0,20 (0,18-0,23)	0,15 (0,14-0,18)*	0,19 (0,17-0,22)
<i>IMVE (g/kg)</i>	1,79 ± 0,22	1,92 ± 0,36	1,67 ± 0,17

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-AR: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com ácido retinóico; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Ao: diâmetro da aorta; PC: peso corporal do animal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP: espessura da parede posterior; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). \*P<0,05 vs C; # P<0,05 vs EFC-AR. Teste Anova de uma via ou Kruskal-Wallis.

**Tabela 2.** Resultados funcionais do ecocardiograma 2 meses após o tratamento.

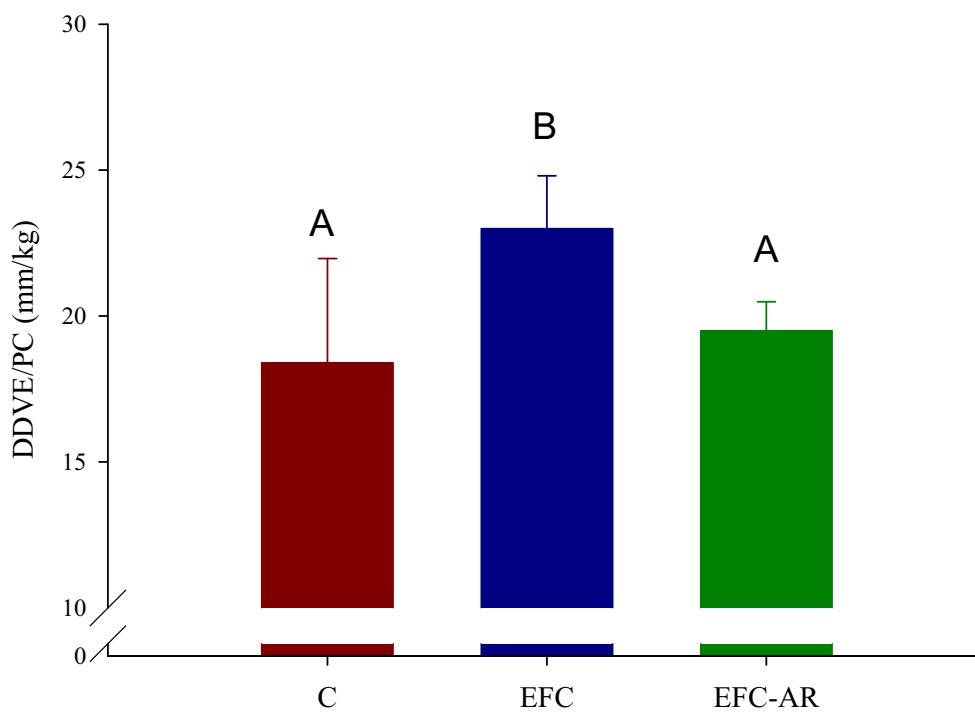
	<b>Grupo C</b> (N = 8)	<b>Grupo EFC</b> (N = 9)	<b>Grupo EFC-AR</b> (N = 9)
<i>FC (bpm)</i>	284 (273-297)	267 (257-292)	286 (263-318)
<i>FE</i>	0,91 ± 0,02	0,87 ± 0,03*#	0,92 ± 0,03
<i>% de Encurtamento</i>	55,77 ± 4,41	49,73 ± 4,43*#	57,60 ± 5,15
<i>VAo (cm/s)</i>	83,75 ± 21,77	91,55 ± 16,35	92,26 ± 6,60
<i>Onda E (cm/s)</i>	76,12 ± 14,21	77,33 ± 7,04	75,70 ± 8,11
<i>Onda A (cm/s)</i>	49,50 (43-54)	44 (41,25-59,75)	48(40,75-52,25)
<i>E/A</i>	1,60 ± 0,36	1,62 ± 0,24	1,58 ± 0,32
<i>TRIV (ms)</i>	24,25 ± 5,85	22,47 ± 5,11	22,64 ± 3,21

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-AR: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com ácido retinóico; FC: frequência cardíaca; FE: fração de ejeção; % de Encurtamento: porcentagem de encurtamento; VAo: velocidade do sangue na valva aórtica; E/A: relação entre as ondas E e A do fluxo diastólico transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). \*P<0,05 vs C; # P<0,05 vs EFC-AR. Teste Anova de uma via ou Kruskal-Wallis.

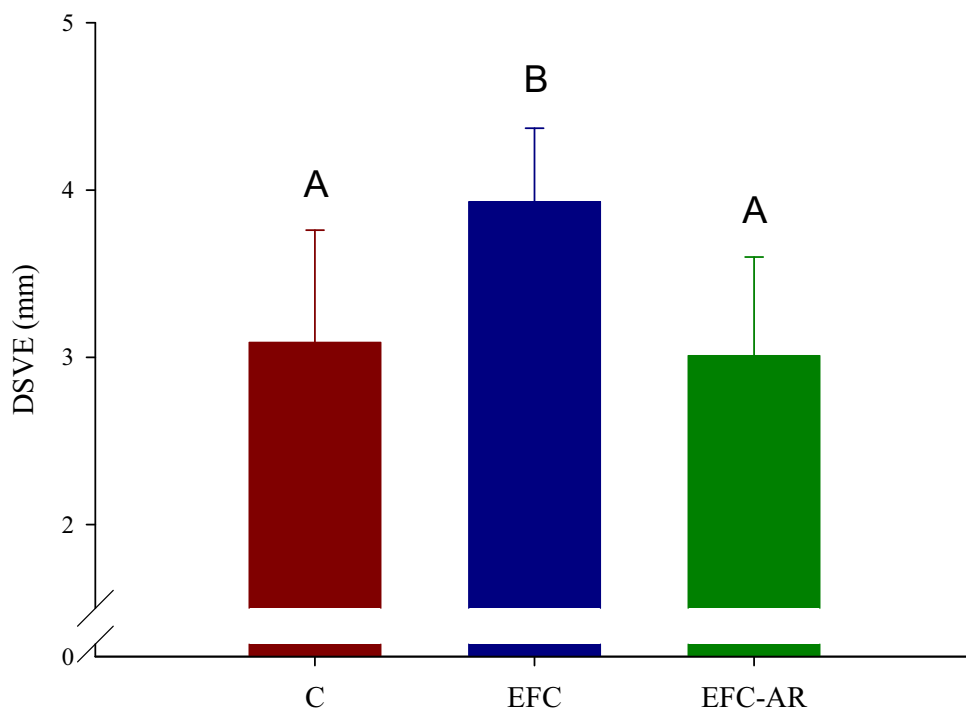
**Tabela 3.** Resultados morfométricos 2 meses após o tratamento.

	<b>Grupo C</b> (N = 8)	<b>Grupo EFC</b> (N = 9)	<b>Grupo EFC-AR</b> (N = 9)
VE (g)	0,75 ± 0,12	0,71 ± 0,11	0,72 ± 0,10
VD (g)	0,20 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,03
VE/PC (mg/g)	1,96 ± 0,10	2,07 ± 0,16	1,97 ± 0,14
VD/PC (mg/g)	0,53 (0,49-0,55)	0,58 (0,51-0,64)	0,53 (0,52-0,54)
Teor água no pulmão(%)	3,41 ± 0,29	3,25 ± 0,44	3,34 ± 0,40
Teor água fígado(%)	3,18 (3,09-3,28)	3,22 (3,14-3,36)	3,22 (3,16-3,26)
Colágeno (%)	2,32 (1,72-2,84)	3 (2,52-3,46)	3,14 (2,70-4,56)
Área seccional do miócito ( $\mu\text{m}^2$ )	294 ± 21	347 ± 44*	310 ± 37

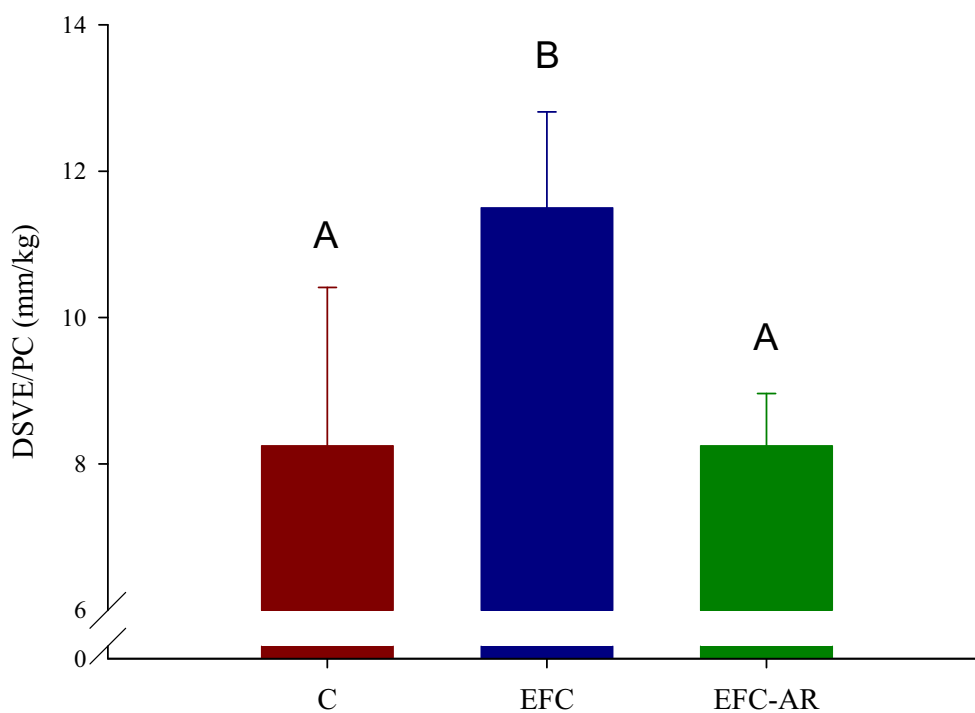
Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-AR: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com ácido retinóico; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; PC: peso corporal do animal. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). \*P<0,05 vs C. Teste Anova de uma via ou Kruskal-Wallis.



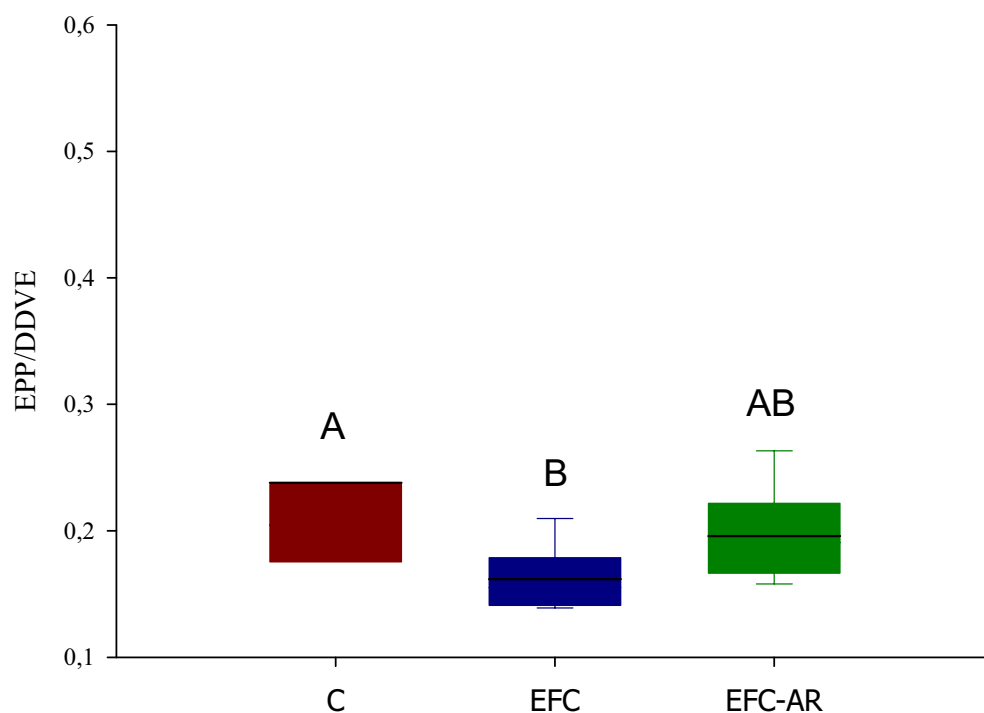
**Figura 1.** Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal dos animais, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.



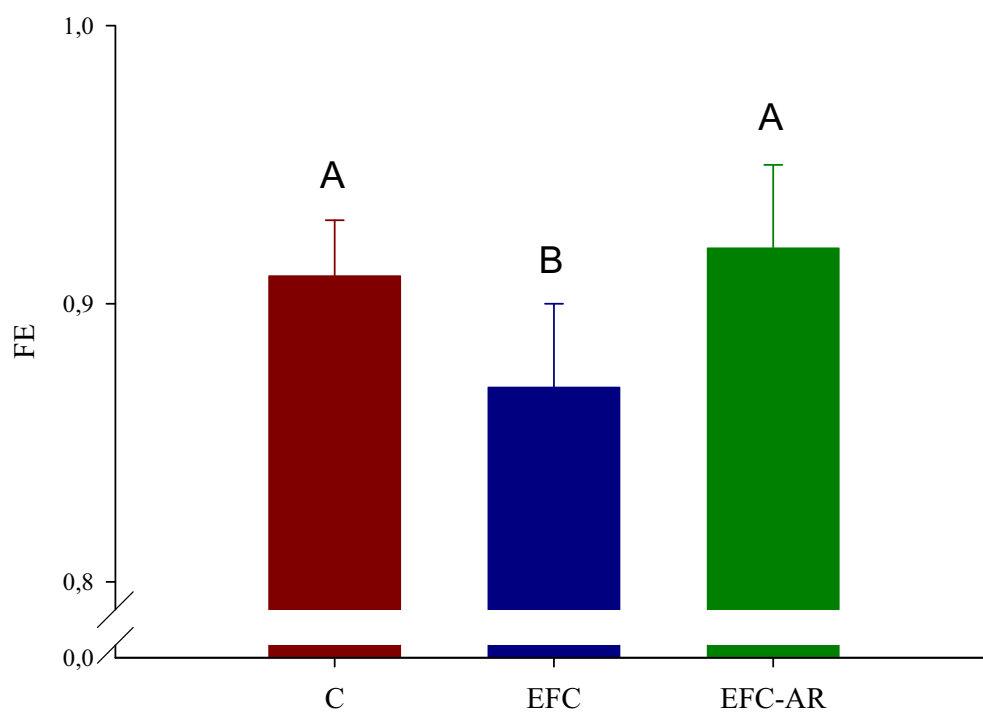
**Figura 2.** Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.



**Figura 3.** Diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal dos animais, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.

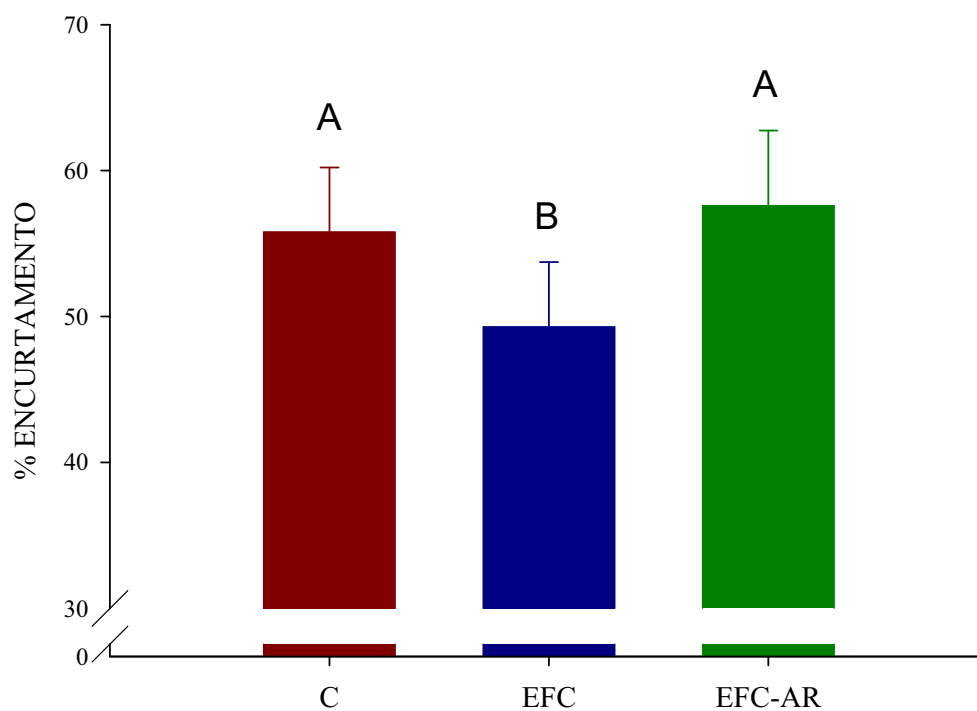


**Figura 4.** Espessura da parede do ventrículo esquerdo ajustado ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.

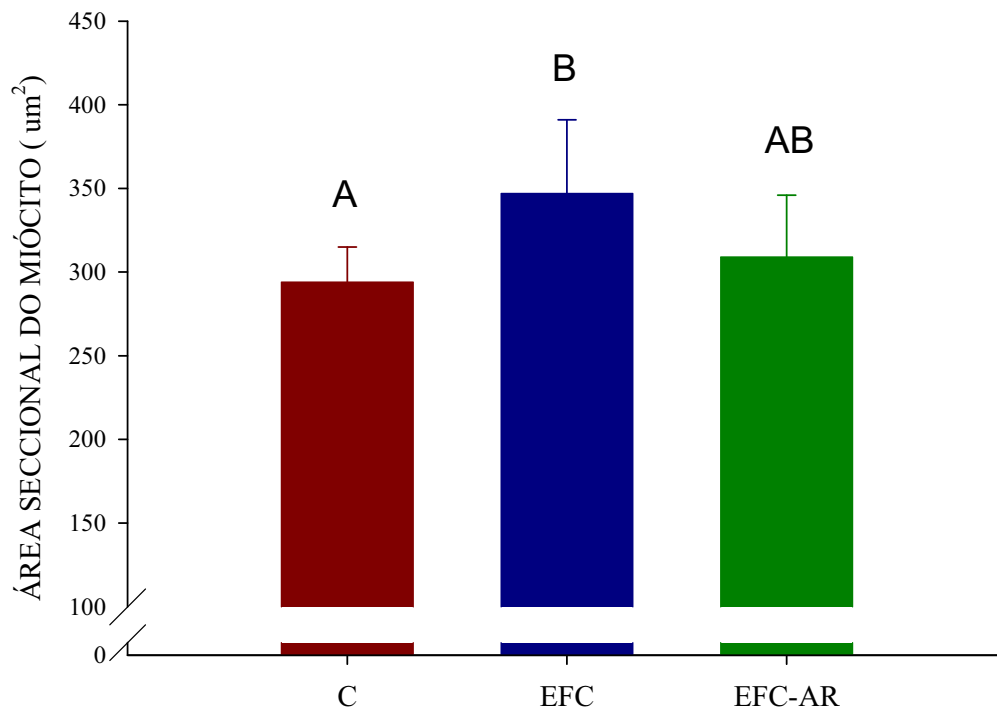


**Figura 5.** Fração de ejeção, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.





**Figura 6.** Porcentagem de encurtamento, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.



**Figura 7.** Área seccional do miócito, nos grupos controle (C), expostos à fumaça do cigarro (EFC) e expostos à fumaça do cigarro suplementados com ácido retinóico (EFC-AR). Letras diferentes significam diferença estatística.

## 6. Discussão

---

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da administração de ácido retinóico no processo de remodelação cardíaca induzido pela exposição à fumaça do cigarro, no modelo do rato. Nossos dados indicam que o tratamento foi associado com melhora de variáveis morfológicas e funcionais cardíacas. Portanto, nosso estudo sugere que o ácido retinóico preveniu a remodelação cardíaca induzida pelo tabagismo.

A associação entre o fumo e a doença cardiovascular tem aceitação universal. Devemos considerar que os efeitos do tabagismo têm sido amplamente explorados, mas principalmente em relação à aterosclerose e alterações na hemostasia. Recentemente, entretanto, diversos trabalhos analisaram os efeitos do tabagismo diretamente em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas.

Estudos experimentais envolvendo a exposição à fumaça do cigarro, no modelo de ratos saudáveis, observaram aumento dos diâmetros diastólicos e sistólicos do ventrículo esquerdo, acompanhado por aumento da área seccional dos miócitos, indicando hipertrofia miocárdica. Essas alterações morfológicas foram seguidas por piora na função sistólica, verificada por meio da fração de ejeção e porcentagem de encurtamento, e da função diastólica, avaliada pela derivada negativa de pressão ( $-dp/dt$ )<sup>(9,24)</sup>. O mesmo fenômeno foi observado em animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio<sup>(30,44)</sup>. Assim, podemos concluir que, em modelos experimentais, a exposição à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca, com prejuízo da função ventricular.

O primeiro aspecto a ser considerado em nosso trabalho foi que a administração de ácido retinóico teve efeito biológico nas alterações morfológicas induzidas pelo fumo. Os animais submetidos à exposição a fumaça do cigarro e tratados com ácido retinóico apresentaram menores diâmetros sistólicos e diastólicos do ventrículo esquerdo, corrigidos pelo peso corporal dos animais. Adicionalmente, os animais tratados apresentaram menor índice de massa do ventrículo esquerdo e menor área seccional dos miócitos, em relação aos animais fumantes utilizados como controle. É importante enfatizar que, apesar da extrema complexidade do processo de remodelação ventricular, esse termo é freqüentemente utilizado como sinônimo de crescimento celular. Portanto, nossos

dados permitem a afirmação de que a administração de ácido retinóico preveniu a remodelação cardíaca induzida pelo tabagismo.

A remodelação cardíaca resulta, freqüentemente, em queda progressiva da função ventricular. Inicialmente, em consequência do crescimento celular, a remodelação pode contribuir para manter ou restaurar a função cardíaca. Cronicamente, entretanto, ocorrem alterações bioquímicas, genéticas e estruturais que vão resultar em disfunção ventricular progressiva. Os mecanismos responsáveis por esse fenômeno não estão completamente esclarecidos, mas incluem: modificações no trânsito de cálcio, alterações da via beta-adrenérgica, alterações das proteínas contráteis, aumento da morte celular, acúmulo de colágeno, alterações das metaloproteases, aumento do estresse oxidativo, déficit energético, alterações das proteínas do citoesqueleto, da membrana e da matriz e alterações da geometria ventricular<sup>(45)</sup>. Nosso trabalho está em concordância com esse conceito, pois os animais tratados com ácido retinóico apresentaram melhor função sistólica, avaliada pela fração de ejeção e porcentagem de encurtamento, em comparação aos animais fumantes utilizados como controle. Portanto, podemos inferir que a atenuação das alterações morfológicas induzidas pelo fumo foi acompanhada, nos animais tratados com ácido retinóico, por atenuação da disfunção sistólica ventricular esquerda. Aspecto interessante a ser comentado foi que o ácido retinóico não modificou as variáveis da função diastólica, o que seria esperado, já que a disfunção diastólica precede a disfunção sistólica em diferentes modelos de agressão cardíaca. Porém em nosso modelo não foram observadas alterações nos indicadores de alteração diastólica talvez pela alta freqüência cardíaca encontrada nesses animais, o que dificulta a técnica de avaliação.

Outro aspecto a ser considerado é que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na remodelação cardíaca, em consequência da exposição à fumaça do cigarro, não estão completamente esclarecidos. Potenciais candidatos, entretanto, são discutidos a seguir.

Estudos prévios, utilizando a mesma metodologia do presente trabalho, mas com períodos de observação de 4 e 6 meses, não observaram alterações no PO<sub>2</sub> e na porcentagem de saturação da hemoglobina pelo oxigênio.

Assim, hipoxemia crônica e alterações na viscosidade sanguínea provavelmente não têm participação na fisiopatologia das alterações induzidas pelo cigarro<sup>(10,46)</sup>.

O segundo potencial mecanismo envolvido nas alterações do cigarro é a pressão arterial. Em estudo prévio com exposição à fumaça do cigarro, foram avaliados os níveis pressóricos após três meses de exposição. O grupo tabagista apresentou aumento da pressão sistólica caudal em relação ao grupo controle<sup>(10)</sup>. Esse resultado pode sugerir que aumento da pressão arterial, provavelmente secundário a ativação de fatores neurohumorais, tenha participação nas alterações morfológicas e funcionais em consequência do tabagismo.

Outro mecanismo que pode estar envolvido nas alterações induzidas pelo fumo é o estresse oxidativo. Devemos considerar que o estresse oxidativo desempenha papel fisiopatológico no processo de remodelação secundário a diversos modelos de agressão. Adicionalmente, o estresse oxidativo participa da lesão induzida pelo cigarro em outros tecidos. Por essas razões, em trabalho prévio de nosso laboratório, analisamos os efeitos da suplementação de beta-caroteno, substância que apresenta ação antioxidante, em animais expostos à fumaça do cigarro. As alterações ultra-estruturais foram avaliadas por meio da microscopia eletrônica. Nos animais fumantes foi observada desorganização ou alterações de miofilamentos, irregularidades na membrana plasmática, dilatação do retículo sarcoplasmático, mitocôndrias polimórficas, edemaciadas e com diminuição das cristas. Já os animais fumantes e suplementados com beta-caroteno apresentaram alterações significativamente menores que os fumantes sem beta-caroteno, com a maioria das fibras apresentando aspecto normal. Esses dados indicam que a suplementação de substância antioxidante atenuou as alterações ultra-estruturais induzidas pela fumaça do cigarro<sup>(25)</sup>.

O papel desempenhado pelas metaloproteases na remodelação induzida pelo tabagismo também foi avaliado em estudos anteriores. Durante o processo de remodelação ventricular ocorrem alterações na matriz extracelular, em parte relacionadas com a ativação da família de enzimas proteolíticas, as metaloproteases (MMP). Diversas metaloproteases têm sido associadas com o processo de remodelação secundário a diferentes estímulos, destacando-se as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9)<sup>(47-49)</sup>. Por esse motivo, estudo prévio analisou

o grau de ativação das MMP-2 e MMP-9 em ratos expostos à fumaça do cigarro, em comparação a animais controle. O tabagismo foi associado com alterações morfológicas e queda da função ventricular. Não foram encontradas diferenças, entretanto, na ativação da MMP-2 e da MMP-9 nos animais fumantes em relação aos animais controle<sup>(50)</sup>. Portanto, o processo de remodelação induzido pelo tabagismo não parece ser dependente da ativação das metaloproteases, pelo menos as MMP-2 ou MMP-9.

Recentemente, a participação do sistema adrenérgico nas alterações causadas pelo fumo também foi avaliada. Os animais fumantes e tratados com propranolol apresentaram menor frequência cardíaca, menores diâmetros sistólicos e diastólicos do ventrículo esquerdo e menor massa que os animais fumantes sem propranolol. Um dado relevante está associado ao fato de que não houve diferenças entre os grupos nos valores da pressão arterial. Assim, a administração de propranolol atenuou algumas variáveis da remodelação ventricular induzida pela exposição à fumaça do cigarro. Adicionalmente, esses resultados sugerem que o efeito do propranolol envolveu vias de sinalização intracelulares moduladas pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, mas que provavelmente não foram em decorrência de efeitos hemodinâmicos<sup>(51)</sup>.

Portanto, o conjunto dos resultados apresentados permite a suposição de que a remodelação induzida pelo tabagismo é dependente, pelo menos em parte, de aumento na pressão arterial, estresse oxidativo e ativação do sistema adrenérgico, mas não está relacionada com a hipóxia, aumento da viscosidade sanguínea e ativação das MMP-2 e MMP-9.

O papel da vitamina A em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas tem sido objeto de diversos estudos.

No período embrionário, o ácido retinóico tem papel essencial no desenvolvimento cardíaco, atuando por meio de seus dois receptores nucleares: RXR e RAR. A concentração de ácido retinóico no embrião é altamente regulada para prevenir o excesso ou falta dessa molécula, condições que produzem efeitos teratogênicos, que podem variar com o tempo e intensidade de exposição. Nesse contexto, a participação do ácido retinóico no desenvolvimento ventricular cardíaco tem sido mostrada em fetos transgênicos de camundongos com deleção

dos receptores  $RXR\alpha$  ( $RXR\alpha^{-/-}$ ). Observou-se que esses animais morreram durante o desenvolvimento fetal devido a defeitos miocárdicos, como permanência de parede ventricular anormalmente fina e incapacidade do coração em adaptar-se a carga de trabalho demandada pelo feto em crescimento<sup>(52)</sup>. Outras alterações encontradas foram miócitos com diferenciação celular precoce, morfologia alongada e com baixo nível de divisão celular mitótica<sup>(52,53)</sup>. Defeitos nos septos ventriculares e vários graus de bloqueio átrio-ventricular são também observados nesses animais<sup>(54)</sup>. Desta forma, aceita-se que o ácido retinóico é requerido nos primeiros estágios de desenvolvimento cardíaco embrionário para a correta diferenciação, manter adequada proliferação e controlar a forma celular.

Além da participação no desenvolvimento cardíaco, os retinóides também desempenham papel decisivo no desenvolvimento vascular, sendo necessária para controlar a proliferação de células endoteliais e remodelagem vascular durante a vasculogênese<sup>(55)</sup>.

No período pós-embrionário, o ácido retinóico também parece ter papel na modulação da morfologia e da função cardíaca. Em nosso laboratório, ratos Wistar saudáveis foram suplementados com ácido retinóico (0,3 mg/kg) por 90 dias. O grupo suplementado apresentou aumento da massa do ventrículo esquerdo e da área seccional do miócito, mas com manutenção da geometria normal ventricular. Em relação à avaliação funcional, observou-se aumento na velocidade de contração e do relaxamento ventricular.

Análise da matriz intersticial não observou variações do volume de fração do colágeno. O conjunto desses dados sugere que a suplementação de ácido retinóico induziu remodelação cardíaca, com melhora da função ventricular, semelhante à remodelação fisiológica causada pelo exercício físico<sup>(36)</sup>.

Os efeitos do ácido retinóico em situações de agressão cardíaca também foram estudados. Dados recentes mostraram o efeito inibitório do ácido retinóico, através da atenuação da expressão do sistema renina-angiotensina, sobre o desenvolvimento da remodelação cardíaca em modelo de ratos com sobrecarga de pressão. O tratamento impediu alterações na estrutura e função cardíaca, diminuindo a expressão de genes associados à hipertrofia<sup>(56)</sup>. Em outro modelo animal, com ratos espontaneamente hipertensos, os animais foram



tratados com ácido retinóico por 3 meses. Os resultados deste ensaio mostraram que o ácido retinóico impediu a hipertrofia das artérias intramiocárdicas e intrarenal e a fibrose ventricular, porém não houve redução da pressão arterial<sup>(57)</sup>. Outros estudos experimentais em modelos de ratos sugerem que o ácido retinóico pode atenuar a hipertrofia cardíaca induzida por diferentes estímulos como, por exemplo, pela endotelina-1, angiotensina II e catecolaminas<sup>(38-40)</sup>. Em nosso laboratório, ratos Wistar foram submetidos a infarto do miocárdio e tratados com ácido retinóico (0,3 mg/kg) por período de 6 meses. Os animais tratados apresentaram diminuição da área seccional de miócito, redução da fração de colágeno e aumento na velocidade de contração em relação ao grupo infartado sem o ácido retinóico. Os dados acima indicam que a suplementação de ácido retinóico atenuou o processo de remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio em ratos<sup>(37)</sup>.

Em nosso trabalho, os mecanismos pelos quais o ácido retinóico preveniu o processo de remodelação cardíaca não foram estudados, no entanto a diminuição da pressão sistólica caudal não é um dos mecanismos envolvidos no processo.

Pelo exposto, em modelos experimentais, o ácido retinóico possui papel na atenuação do processo de remodelação ventricular secundária a diversos estímulos. O nosso atual protocolo adiciona conhecimentos sobre os efeitos protetores do ácido retinóico, considerando que o tratamento preveniu o processo de remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro. Um aspecto relevante é que os efeitos do ácido retinóico são semelhantes aos efeitos observados em modelos experimentais com os inibidores de enzima conversora da angiotensina e com os beta-bloqueadores. Atualmente, essas medicações são usadas na prática clínica para atenuação do processo de remodelação em situações de disfunção ventricular, melhorando o prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca.

O conjunto de dados obtidos no presente trabalho nos permite concluir que a suplementação com ácido retinóico preveniu o processo de remodelação cardíaca, em ratos expostos à fumaça do cigarro.

## 7. Conclusão

---

O ácido retinóico previne a remodelação cardíaca induzida pelo tabagismo.

## 8. Resumo

---

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do ácido retinóico na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro.

**Métodos:** Os ratos foram divididos em três grupos: controle (C, n = 8); animais expostos à fumaça do cigarro (EFC, n = 9); animais expostos à fumaça de cigarro e suplementados com ácido retinóico (EFC-AR, n = 9). Após dois meses, foram submetidos ao ecocardiograma e análise morfométrica. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão ou medianas e intervalo interquartilício ( $Q_1$ - $Q_3$ ).

**Resultados:** Não houve diferença na pressão sistólica caudal entre os grupos (C =  $116 \pm 27$  mmHg; EFC =  $129 \pm 17$  mmHg; EFC-AR =  $139 \pm 19$  mmHg;  $p = 0,102$ ). O grupo EFC mostrou maior diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ajustado ao peso corporal (C =  $18,42 \pm 3,57$  mm/kg; EFC =  $23 \pm 1,85$  mm/kg; EFC-AR =  $19,51 \pm 0,99$  mm/kg;  $p = 0,001$ ) e sistólico ajustado ao peso corporal (C =  $8,25 \pm 2,16$  mm/kg; EFC =  $11,53 \pm 1,31$  mm/kg; EFC-AR =  $8,25 \pm 0,71$  mm/kg;  $p = <0,001$ ) quando comparado com C grupo e EFC-AR. Por outro lado, não houve diferença entre C e EFC-AR. A espessura da parede do ventrículo esquerdo ajustado ao diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo foi maior no grupo C do que nos EFC (C =  $0,20$  ( $0,18$ - $0,23$ ); EFC =  $0,15$  ( $0,14$ - $0,18$ ); EFC-AR =  $0,19$  ( $0,17$ - $0,22$ );  $p = 0,003$ ). A fração de ejeção (C =  $0,91 \pm 0,02$ ; EFC =  $0,87 \pm 0,03$ ; EFC-AR =  $0,92 \pm 0,03$ ;  $p = 0,003$ ) e a fração de encurtamento (C =  $55,77 \pm 4,41\%$ ; EFC =  $49,73 \pm 4,43\%$ ; EFC-AR =  $57,60 \pm 5,15\%$ ;  $p = 0,005$ ) foram mais elevados nos animais do grupo C e EFC-AR em relação aos animais do grupo EFC. Por outro lado, não houve diferenças entre C e EFC-AR. Além disso, o tabagismo está associado com um aumento significativo da área seccional do miócito (C =  $294 \pm 21 \mu\text{m}^2$ ; EFC =  $347 \pm 44 \mu\text{m}^2$ ; EFC-AR =  $310 \pm 37 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,016$ ). Por outro lado, não houve diferenças entre C e EFC-AR. O ácido retinóico não afetou outras variáveis morfológicas e funcionais.

**Conclusão:** A suplementação de ácido retinóico atenua remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro.

**Palavras-chave:** Ácido retinóico; Remodelação cardíaca; Fumaça do cigarro.

## 9. Summary

---

The objective of this study was to evaluate the role of retinoic acid in the myocardial remodeling induced by tobacco smoke exposure.

**Methods:** Rats were allocated into three groups: control (C, n=8); exposed to tobacco smoke (ETS, n=9); exposed to tobacco smoke and all-trans-retinoic acid (ETS-AR, n = 9). After two months, were submitted to echocardiogram, and morphometric analyses. Data are expressed as mean  $\pm$  SD or medians (including the lower quartile and upper quartile).

**Results:** There were no differences in the tail systolic pressure among the groups (C =  $116 \pm 27$  mmHg, ETS =  $129 \pm 17$  mmHg, ETS-AR =  $139 \pm 19$  mmHg;  $p = 0,102$ ). ETS showed higher normalized left ventricular diastolic (C =  $18,42 \pm 3,57$  mm/kg, ETS =  $23 \pm 1,85$  mm/kg, ETS-AR =  $19,51 \pm 0,99$  mm/kg;  $p = 0,001$ ) and systolic (C =  $8,25 \pm 2,16$  mm/kg, ETS =  $11,53 \pm 1,31$  mm/kg, ETS-AR =  $8,25 \pm 0,71$  mm/kg;  $p = <0,001$ ) diameters than C and ETS-AR. On the other hand, there were no differences between C and ETS-RA. LVWT/LVEDD was higher in C than ETS (C =  $0,20$  ( $0,18-0,23$ ), ETS =  $0,15$  ( $0,14-0,18$ ), ETS-RA =  $0,19$  ( $0,17-0,22$ ;  $p = 0,030$ ). The ejection fraction (C =  $0,91 \pm 0,02$ , ETS =  $0,87 \pm 0,03$ , ETS-AR =  $0,92 \pm 0,03$ ;  $p = 0,003$ ) and fractional shortening (C =  $55,77 \pm 4,41$  %, ETS =  $49,73 \pm 4,43$  %, ETS-AR =  $57,60 \pm 5,15$  %;  $p = 0,005$ ) were higher in C and ETS-RA animals than ETS animals. On the other hand, there were no differences between C and ETS-RA. Also, smoking was associated with significantly increased myocyte cross-sectional area (C =  $294 \pm 21$   $\mu\text{m}^2$ , ETS =  $347 \pm 44$   $\mu\text{m}^2$ , ETS-RA =  $310 \pm 37$   $\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,016$ ). On the other hand, there were no differences between C and ETS-RA. Retinoic acid did not affect other functional or morphological variables.

**Conclusion:** In conclusion, retinoic acid supplementation prevents cardiac remodelling induced by exposure to tobacco smoke in the rat model.

**Keywords:** ventricular remodeling, retinoic acid, tobacco smoke.

## 10. Referências Bibliográficas



1. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EFM. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007; 131:1557-66.
2. Torres BS, Godoy I. Doenças tabaco-relacionadas. *J Bras Pneumol*. 2004; 30:19-29.
3. U.S. Department of Health and Human Service. The health consequences of smoking: cardiovascular disease. A report of the surgeon general. Rockville. 1983; 58.
4. Mann SJ, James GD, Wang RS, Pichering TG. Elevation of ambulatory blood pressure in hypertensive smokers - Acase-control study. *JAMA*. 1991; 265:2226-8.
5. Barnoya J, Glantz AS. Cardiovascular effects of secondhand smoke - nearly as large as smioking. *Circulation*. 2005; 111:2684-98.
6. Batista SP. Inhalation studies of toxicity of tobacco smoke. In Gori GB, Bock FG (editors). *Bambury Report 3-A safe cigarette?* Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980; 51-62.
7. Silva CAR. Composição química da fumaça do cigarro. *J Bras Pneumol*. 2004; 30:8-10.
8. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer. Avaieble from: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=faq>.
9. Seelig FM, Jacondino CR, Carvalho JC. A Ventilação e a fumaça ambiental de cigarros. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2005; 10:83-90.
10. Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, *et al*. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84:320-4.
11. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001; 158:257-67.

12. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer. Available from: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>.
13. Silva MAM. Efeitos do tabagismo sobre o sistema cardiovascular: hemodinâmica e propriedades elásticas arteriais. São Paulo: 2005. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
14. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição a fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28:143-50.
15. Weiss ST, Tager IB, Schenker M, Speizer FE. The health effects of involuntary smoking. *Am Rev Respir Dis.* 1983; 128:933-42.
16. Scherer G, Conze C, von Meyerinck L, Sorsa M, Adlkofer F. Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. *Int Arch Occup Environ Health.* 1990; 62:459-66.
17. Law RL, Hackshaw AK. Environmental tobacco smoke. *Br Med Bull.* 1996; 52:22-34.
18. Soperi ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol.* 1998; 83:148-56.
19. Centro Latinoamericano de Perinatología y Desarrollo Humano (CLAP). Tabaquismo y embarazo: hay que ayudar a parar. *Salud Perinat.* 1987; 2:65-77.
20. Chen LH, Petitti DB. Case-control study of passive smoking and the risk of small-for-gestational-age at term. *Am J Epidemiol.* 1995; 142:158-65.
21. He Y, Lam T, Li LS, Du R, Jia G, Huang J, *et al.* The number of stenotic coronary arteries is associated with the amount of passive smoking exposure. *Atherosclerosis.* 1996; 127:229-38.
22. Gairola CG, Drawdy ML, Block AE, Daugherty A. Sidestream cigarette smoke accelerates atherogenesis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis.* 2001; 156:49-55.

23. Dietrich DF, Schwartz J, Schindler C, et al. Effects of passive smoking on heart rate variability, heart rate and blood pressure: an observational study. *Int J Epidemiol* 2007; 36:834-40.
24. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 81:221-4.
25. Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Katashi O, Paiva SAR MD, *et al.* Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicol Sci*. 2006; 90:259-66.
26. Paiva SAR, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo OS, Minicucci MF, *et al.*  $\beta$ -carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *J Nutr*. 2005; 135:2109-13.
27. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985; 57:84-95.
28. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990; 81:1161-72.
29. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35:569-82.
30. Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol*. 1997; 68:453-60.
31. 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.
32. Gaudron P, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C, Ertl G. Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after

- myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38:33-40.
33. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001; 110:375-465.
34. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79:215-62.
35. Shils ME, Olson JÁ, Shile M, Ross AC. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. Manole, 9<sup>o</sup> Edição, Vol I, 2003.p 325-49.
36. Paiva SAR, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, *et al.* Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284:H2242-6.
37. Paiva SAR, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, *et al.* Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr.* 2005; 135:2326-8.
38. Wang HJ, Zhu YC, Yao T. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy. *J Appl Physiol.* 2002; 92:2162-8.
39. Wu JM, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D-3 and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1996; 97:1577-88.
40. Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial-cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:7391-5.
41. Wang X-D, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Rusel RM. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given  $\beta$ -carotene supplements and exposure to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:60-6.
42. 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 echocardiography measurements. *Circulation*. 1978; 58:1072-83.
43. Matsubara LS, Narikawa S, Machado ALF, Paiva, SAR, Zornoff LAM, Matsubara BB. Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão ou de volume no coração de ratos. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 86:126-30.
44. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo OS, Campana AO, *et al*. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Brasil Cardiol*. 2006; 86:276-82.
45. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelação e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2002; 12:371-8.
46. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, *et al*. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit* 2008; 14:62-66.
47. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res*. 2006; 69:666-76.
48. Jugdutt BI. Matrix metalloproteinases as markers of adverse remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2006; 12:73-6.
49. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart J, Murray D, *et al*. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res*. 2006; 69:657-65.
50. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, *et al*. Tobacco smoke-induced left ventricular remodelling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *European Journal of Heart Failure*. 2007; 9:1081-85.
51. Duarte DR, Azevedo PS, Minicucci MF, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva AR, *et al*. Influência dos sistemas adrenérgico e renina-angiotensina na

remodelação cardíaca induzida pelo tabagismo. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2008; 18:80.

52. Kartner P, Grondona J, Mark M, et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. Cell. 1994; 78:987-1003.
53. Kartner P, Messaddeq N, Mark M, et al. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. Development. 1997; 124:4749-58.
54. Dyson E, Sucov HM, Kubalak SW, Schmid-Schönbein GW, Delano FA, Evans RM, et al. Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid-X receptor-alpha  $-/-$  mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:7386-90.
55. Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, Hirschi KK. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. Development. 2003; 130:6465-74.
56. Choudhary R, Palm-Leis A, Scott RC 3rd, Guleria RS, Rachut E, Baker KM, et al. All-trans retinoic acid prevents development of cardiac remodeling in aortic banded rats by inhibiting the renin-angiotensin system. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294:H633-44.
57. Lei Lu, Tai Yao, Yi-Zhun Zhu, Huang GY, Cao YX, Zhu YC. Chronic all-*trans* retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intrarenal arteries in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 285:H1370-H7.