



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

Amanda de Menezes Figueiredo

**Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea*
Mart.) na razão sobre a remodelação cardíaca em ratos
submetidos a infarto agudo do miocárdio**

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2016

Amanda de Menezes Figueiredo

Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos a infarto agudo do miocárdio

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

Orientador (a): Prof.Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientadora: Prof.^aDr.^a Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Figueiredo, Amanda de Menezes.

Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos a infarto agudo do miocárdio / Amanda de Menezes Figueiredo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Bertha Furlan Polegato
Capes: 40101100

1. Açaí. 2. Suplementos dietéticos. 3. Stress oxidativo. 4. Infarto do miocárdio. 5. Inflamação. 6. Remodelação ventricular. 7. Metabolismo energético.

Palavras-chave: Açaí; Estresse oxidativo; Infarto do miocárdio; Inflamação; Metabolismo energético.

AMANDA DE MENEZES FIGUEIREDO

Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea Mart.*)
na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos
a infarto agudo do miocárdio

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

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Bertha Furla Polegato

Comissão examinadora

Prof(a). Dr(a).....

Universidade.....

Prof(a). Dr(a).....

Universidade.....

Prof(a). Dr(a).....

Universidade.....

Botucatu, _____ de fevereiro de 2016.

Dedicatória

Aos meus pais Wilson e Maria Nilcilene, por serem meu exemplo, estarem sempre
ao meu lado e me incentivarem em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão Rodrigo, pelo apoio e conselhos, que nunca me deixam enfraquecer.

Aos meus avós Pedro (in memorian), Diva, José in memorian) e Maria, pela
sabedoria e incentivo.

Amo vocês.

Agradecimientos

A Deus, pelas bênçãos sem fim e pela alegria de viver em Tua presença.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio A. R. Paiva, pela oportunidade, por toda sua competência, dedicação, ensinamentos e carinho. Neste projeto cresci muito e tenho muito orgulho de tê-lo como orientador. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a. Bertha F. Polegato, pelo incentivo e suporte na realização deste projeto.

A todos os docentes do departamento de Clínica Médica, em especial ao Dr. Marcos F. Minicucci, Dr. Leonardo A. M. Zornoff, Dr.^a Paula S. Azevedo Gaiolla, Dr.^a Silméia Garcia Zanati Bazan e Dr. Katashi Okoshi pelas contribuições no decorrer de todo projeto.

À professora Dr.^a. Ana Angélica H. Fernandes do Instituto de Biociências - UNESP, pela realização das análises bioquímicas.

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

A todos os funcionários do Departamento e Laboratório Experimental da Clínica Médica, por todo apoio no transcorrer do curso, em especial ao Mário Bruno (in memorian), pela atenção e disponibilidade em todo auxílio requisitado e a Silvia por realizar a análise de malondialdeído.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Ana Carolina, Andréa, Angélica, Bruna Camargo, Bruna Letícia, Bruna Paola, Diego, Livia, Pamela, Patrícia, Priscila, Renata, Renan e Tatiana pela troca de

conhecimentos e por todo companheirismo, em especial a Ana Carolina, pela amizade, apoio e auxílio durante todo o curso, sua presença fez os meus dias mais felizes.

Aos meus primos Giovani e Duda, por serem minha maior paixão e por me ensinarem a enxergar a vida de forma simples.

Às minhas primas Maraisa, Paula, Mariana e Bruna, por tornarem nossos encontros únicos e mesmo com a distância, se fizerem presentes.

Aos meus primos Rafael (in memorian) e Babhy (in memorian), por serem meu maior exemplo de luta e fé. Amo vocês meus anjinhos!

Aos meus tios Mário, Nilva, Nivaldo, Nilson, Cleide, Nena, Vilma, Arno, Nilza, Flávio e Có, por estarem sempre presentes, em especial a Nilva, por estar disponível nos momentos que mais preciso.

À minha madrastra Tuca e irmã postiça Adhara, por terem participação ativa em minha vida e nesse projeto.

Aos meus avós postiços Dona Mirinha (in memorian) e Sr. Smith (in memorian), pelas orações diárias e ensinamentos.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

-Madre Teresa de Calcutá

Sumário

Resumo.....	13
Abstract	15
Introdução.....	17
Hipótese e Objetivo.....	23
Métodos	25
Delineamento Experimental	26
Suplementação com polpa de açaí	27
Infarto experimental	27
Avaliação ecocardiográfica.....	28
Coleta de material biológico	29
Análise histológica.....	30
Determinação da atividade das enzimas dos marcadores do estresse oxidativo e do metabolismo energético	30
Determinação de malondialdeído.....	33
Determinação dos mediadores inflamatórios e do inibidor tecidual de metaloproteinase-1	35
Determinação da expressão proteica por Western Blot.....	36
Análise estatística.....	39
Resultados.....	42
Número de animais, mortalidade e tamanho do infarto	43
Peso dos animais e consumo de ração	47
Estudo ecocardiográfico.....	50
Estudo morfométrico do ventrículo direito e esquerdo, átrio direito e esquerdo.....	74
Análise histológica do miocárdio do ventrículo esquerdo.....	78
Avaliação do estresse oxidativo cardíaco no miocárdio do ventrículo esquerdo.....	81
Avaliação do metabolismo energético cardíaco no miocárdio do ventrículo esquerdo	90
Avaliação da produção de citocinas no miocárdio do ventrículo esquerdo	105
Determinação de inibidor tecidual de metaloproteinase-1, colágeno I e III, caspase-3 no miocárdio do ventrículo esquerdo	111
Discussão.....	116
Alterações cardíacas após o infarto do miocárdio	117
Influência da suplementação de polpa de açaí no coração “normal”	121
Influência da suplementação de polpa de açaí no coração infartado	122
Equivalência da suplementação de polpa de açaí de ratos para seres humanos.....	123
Limitações do estudo	124
Conclusão	125
Referências.....	127

Resumo

FIGUEIREDO, A.M. **Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos a infarto agudo do miocárdio.** 2016. 132f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Introdução: A remodelação cardíaca tem papel importante na disfunção ventricular pós-infarto. Alguns mecanismos como estresse oxidativo, metabolismo energético e processo inflamatório modulam este processo. Neste contexto, há interesse em utilizar alimentos naturais, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, destacando-se o açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Objetivo:** Avaliar a influência da suplementação de açaí na ração sobre a remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio (IM) em ratos. **Métodos:** Ratos *Wistar* machos, com peso entre 200-250g, foram submetidos ao infarto experimental ou à cirurgia simulada (Sham) e alocados em seis grupos após estudo ecocardiográfico, para verificar o tamanho do infarto: 1) grupo Sham alimentado com ração padrão (SA0, n=14); 2) grupo Sham alimentado com ração padrão suplementada com 2% de polpa de açaí pasteurizado (SA2, n=13); 3) grupo Sham alimentado com ração padrão suplementada com 5% de polpa de açaí pasteurizado (SA5, n=14); 4) grupo infartado alimentado com ração padrão (IA0, n=12); 5) grupo infartado, alimentado com ração padrão suplementada com 2% de polpa de açaí pasteurizado (IA2, n=12); 6) grupo infartado, alimentado com ração padrão suplementada com 5% de polpa de açaí pasteurizado (IA5, n=12). Os animais foram suplementados por três meses e foi observada a mortalidade. Após esse período, os animais foram submetidos à segunda avaliação ecocardiográfica e posteriormente à eutanásia e coleta de material biológico para realização das demais avaliações. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. As comparações foram feitas por teste ANOVA de duas vias, com nível de significância adotado de 5%. **Resultados:** infarto induziu alterações cardíacas morfológicas e funcionais (sistólicas e diastólicas), com hipertrofia do ventrículo, maior concentração de hidroperóxido de lipídeo e malondialdeído, maior atividade de superóxido dismutase, menor atividade da glutathione peroxidase e menor expressão de fator nuclear eritróide 2, menor atividade do complexo piruvato desidrogenase, de citrato sintase, do Complexo I e II da cadeia respiratória, da ATP sintase e de beta-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase, maior atividade do lactato desidrogenase, maior concentração de interleucina-10, menor concentração de interferon gama, maior concentração de inibidor tecidual de metaloproteinase e maior expressão de colágeno I. Os animais infartados que receberam suplementação de polpa de açaí apresentaram menor concentração do malondialdeído e menor atividade de superóxido dismutase, maior atividade do complexo piruvato desidrogenase, de citrato sintase, do Complexo I da cadeia respiratória, de beta-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase, menor atividade de ATP sintase, do lactato desidrogenase, menor concentração de interleucina-10 e de inibidor tecidual de metaloproteinase. **Conclusão:** A suplementação de polpa de açaí nos animais infartados atenuou o estresse oxidativo, melhorou o metabolismo energético e modulou o processo inflamatório no coração. A influência da suplementação de açaí foi dose dependente.

Palavras-chave: Açaí; Infarto do miocárdio; Estresse oxidativo, Metabolismo energético; Inflamação.

Abstract

FIGUEIREDO, A.M. **Influence of açai supplementation (*Euterpe oleracea* Mart.) in chow on cardiac remodeling in rats after myocardial infarction.** 2016. 132f. Dissertation (Master) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Introduction: Cardiac remodeling plays a key role in post-infarction ventricular dysfunction. Some mechanism, such as oxidative stress, energy metabolism and inflammation can modulate this process. In this context, there is great interest in natural foods, with antioxidant and anti-inflammatory properties, as açai (*Euterpe oleracea* Mart). **Objective:** To analyze the influence of açai supplementation in chow on cardiac remodeling after myocardial infarction (MI) in rats. **Methods:** Male Wistar rats with 200-250 g, were submitted to the experimental infarction or simulated surgery and divided into six groups: 1) Sham group fed standard chow and not subjected to the IM (SA0, n=14); 2) Sham group fed standard chow supplemented with 2% açai pulp pasteurized and not subjected to IM (SA2, n=13); 3) Sham group fed standard chow supplemented with 5% açai pulp pasteurized and not subjected to IM (SA5, n=14); 4) group submitted to MI and fed standard chow (IA0, n=12); 5) group submitted to MI and fed standard chow supplemented with 2% açai pulp pasteurized (IA2, n=12); 6) group submitted to MI and fed standard chow supplemented with 5% açai pulp pasteurized (IA5, n=12). The animals were supplemented for three months and observed mortality. After this period, the animals underwent echocardiography and subsequently euthanized and collecting biological material for other evaluations. The values were expressed as mean $\pm$ standard error. The comparisons were made by two-way ANOVA test with significance level of 5%. **Results:** Infarction induced heart morphological and functional changes (systolic and diastolic), ventricular hypertrophy, higher concentration of lipid hydroperoxide and malondialdehyde, higher activity of superoxide dismutase, decrease glutathione peroxidase activity and lower expression of Nrf-2, decrease pyruvate dehydrogenase complex, citrate synthase, complex I and II, ATP synthase and β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase activity, higher activity of lactate dehydrogenase, higher concentration of interleukin-10 and lower concentration of interferon gamma, higher concentration of tissue inhibitor of metalloproteinase and higher expression of collagen I. The infarcted animals that received açai pulp supplementation decrease malondialdehyde concentration and decrease superoxide dismutase activity, higher activity of pyruvate dehydrogenase complex, citrate synthase, complex I, β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, decrease ATP synthase and lactate dehydrogenase activity, decrease interleukin-10 and tissue inhibitor of metalloproteinase concentration. **Conclusion:** The supplementation with açai pulp attenuated cardiac remodeling after infarction by acting on oxidative stress, energy metabolism, inflammation and tissue inhibitor of metalloproteinase in heart. The findings of this study also suggest that supplementation with açai pulp appears to be dose dependent response.

Keywords: Açai; Myocardial infarction; Oxidative stress, Energy metabolism; Inflammation.

Introdução

As doenças cardiovasculares constituem uma das principais causas de morte no Brasil. Entre elas, destaca-se o infarto do miocárdio (IM), responsável por mais de 80.000 óbitos no ano de 2012, segundo o DATASUS (1, 2). Estima-se que, em 2030, o número de mortes envolvendo as doenças cardiovasculares serão responsáveis por aproximadamente 23,6 milhões (3).

O IM é definido como foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas consequentes da morte celular cardíaca (4). Após o IM, ocorrem alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a região infartada quanto a não infartada. Essas alterações morfológicas são consequências de alterações genéticas, celulares e intersticiais cardíacas que ocorrem em resposta à isquemia. Entre as alterações celulares e moleculares estão o estresse oxidativo, a inflamação, a apoptose, e alterações no metabolismo energético cardíaco (5-7). O conjunto dessas adaptações, que são detectadas clinicamente por alterações na composição, na massa, no volume e na geometria ventricular após a lesão cardíaca, é chamado “remodelação cardíaca” (8, 9). Inicialmente, essas alterações morfológicas são importantes para a manutenção da função cardíaca. No entanto, cronicamente pode causar disfunção diastólica e/ou sistólica (8, 10).

Em decorrência da expansão do infarto, o ventrículo esquerdo (VE) perde sua forma elíptica e assume a conformação esférica causando elevação do estresse parietal diastólico e sistólico, principalmente na região apical do VE. O aumento do estresse parietal é importante estímulo para a síntese de sarcômeros, preferencialmente em série. Cronicamente, ocorre aumento do raio da cavidade e redução da espessura da parede ventricular esquerda, alterações características da hipertrofia excêntrica. Todas essas alterações também envolvem a região não infartada e ativam os sistemas neuro-hormonais, como o sistema nervoso autônomo simpático e o renina-angiotensina-aldosterona (11, 12). Desta forma, a remodelação cardíaca é um fator importante na progressão da doença cardiovascular, pois desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular (8, 11, 13). Entretanto, caso o insulto exceda a capacidade de adaptações, as alterações podem progressivamente levar ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), principal responsável pelo aumento da mortalidade após o IM (6).

Durante o IM ocorre isquemia do miocárdio e necrose dos cardiomiócitos, seguido por aumento do estresse oxidativo. Este é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio, e/ou diminuição de antioxidantes endógenos (14). No estresse oxidativo, a membrana é um dos componentes celulares mais atingidos, isso ocorre devido à peroxidação lipídica dos fosfolipídios da membrana celular, que acarreta alterações na estrutura e permeabilidade celular. O malondialdeído (MDA) é proveniente da peroxidação lipídica e se encontra em concentrações elevadas em patologias associadas ao estresse oxidativo (15, 16).

Durante o processo de isquemia há redução das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Assim como ocorre aumento da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), xantina oxidase, citocromo P450 e ciclooxigenase (17). Os quais são sistemas geradores de EROs e nitrogênio, que levam ao estresse oxidativo no infarto do miocárdio.

O fator de transcrição nuclear eritróide-2 (Nrf-2) desempenha importante função na proteção celular contra o estresse oxidativo. Quando o Nrf-2 está presente no núcleo, acopla-se a elementos de resposta antioxidante (ARE), na região promotora de genes alvo, induzindo a transcrição de diversos genes relacionados à defesa celular (18).

As EROs ou o estresse oxidativo podem também ativar o fator nuclear Kappa B (NF- κ B). Assim, a produção de EROs durante o infarto do miocárdio, torna ativa a resposta inflamatória. Desta forma, ocorre liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6), que podem estimular a expressão de outros mediadores inflamatórios por leucócitos e células endoteliais. Estes são responsáveis por realizar a fagocitose de células necróticas e por iniciar o depósito de colágeno (19, 20). Além disso, as EROs e citocinas inflamatórias são capazes de mediar o reparo e o remodelamento cardíaco através da ativação de metaloproteinases (MMP) e do depósito de colágeno, que contribuem para reparação do tecido lesado e mudanças estruturais no coração (11, 21). Após o IM, inicia-se o processo de reparação cardíaca por meio da ativação de MMPs latentes, que degradam a matriz celular. O aumento das MMPs e diminuição dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) podem levar a degradação do

colágeno normal e aumento do colágeno tipo I (12). Progressivamente, a distorção na estrutura tecidual cardíaca devido ao acúmulo adverso de colágeno pode levar ao prejuízo na função ventricular (22).

Outras alterações, também, estão ocorrendo durante a remodelação cardíaca. Em condições normais, os substratos energéticos utilizados para sua produção são fornecidos por meio da oxidação dos ácidos graxos e glicose. Os ácidos graxos são o substrato principal e sua metabolização contribuem com 60 a 90% da formação de ATP (23). Com a remodelação cardíaca, ocorre aumento da concentração de catecolaminas e cortisol, que estimulam a lipólise e aumentam os ácidos graxos no soro e no miocárdio. Além disso, para produzir a mesma quantidade de ATP, os ácidos graxos necessitam de acréscimo de 10 a 12% de oxigênio, quando comparados com a glicose (24, 25). Adicionalmente, o uso de glicose como substrato pode gerar mais radicais superóxidos, manutenção estresse oxidativo, estimula o processo inflamatório o que aumenta o dano para o coração (23).

As citocinas inflamatórias também podem estimular a apoptose, esta pode ocorrer tanto por meio da ativação da via de receptor TNF- α /caspase, como por aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (21). Entretanto, a resposta inflamatória está mais relacionada com o aumento da expressão de TNF- α que ao se ligar a receptores específicos transmembrânicos ativa diferentes cascatas de sinalização (26, 27). Assim, após ocorrer o infarto do miocárdio, há superprodução de TNF- α de modo explosivo, ou seja, sua concentração plasmática se encontra elevada, porém sua duração é transitória (28).

Diante disso, o estresse oxidativo e o processo inflamatório são potenciais alvos para atenuar o processo de remodelação ventricular após o infarto.

Com a finalidade de atenuar a remodelação cardíaca e reduzir a mortalidade após o IM, tem-se utilizado suplementos antioxidantes que podem ser benéficos após a injúria do miocárdio. Em estudos com modelo de infarto que utilizaram antioxidantes como ácido ascórbico, quercetina e alfa-tocoferol, observou-se que o uso de antioxidantes exerceu efeito protetor contra danos ao tecido cardíaco (29, 30). Também têm sido utilizados produtos naturais, como alecrim e tomate, que atenuaram o processo de remodelação cardíaca causada pelo infarto do miocárdio em ratos (31, 32). Neste contexto, grande interesse tem sido focado nas propriedades antioxidantes de produtos naturais, fontes de

compostos cardioprotetores (33). Dentre estes produtos, destaca-se o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), com elevado teor de compostos fenólicos e antocianinas (34).

Santos e colaboradores estudaram a atividade antioxidante da polpa de açaí e a sua associação com os compostos bioativos (vitamina C, carotenoides, antocianinas e compostos fenólicos) presentes na polpa de açaí (35). Os autores mostraram que a atividade antioxidante do açaí esteve associada, principalmente, com as antocianinas e os compostos fenólicos (35).

Estudos experimentais mostraram que a suplementação de açaí atenuou o estresse oxidativo em vários modelos de agressão. Em ratos hipertensos, o extrato de açaí reduziu a concentração de MDA, aumentou da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e diminuiu a NADPH oxidase na artéria mesentérica dos animais tratados (36). Em ratos submetidos à ração hipercolesterolêmica, observou-se menor atividade de SOD no soro dos animais suplementados (37). Em ratos diabéticos, observou-se menor concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonil, dosadas no fígado de animais suplementados (38). E, finalmente, em camundongos expostos à fumaça de cigarros, a suplementação de açaí diminuiu a atividade da SOD, da CAT e do GPx no pulmão (39). O açaí pode atuar de outros modos além do estresse oxidativo. Em modelo de aterosclerose em coelhos, Feio e colaboradores mostraram a ação do açaí na redução da síntese e da absorção de esteróis e na melhora da função endotelial (40).

O açaí pode estar atuando no organismo por meio de sua atividade anti-inflamatória. Em estudo realizado com camundongos expostos a fumaça de cigarros, Moura e colaboradores relatam que o efeito anti-inflamatório do extrato do açaí pode ser atribuído a inibição da expressão do TNF- α (39). Em outro trabalho, com células miofibroblásticas de cólon de humanos, Dias e colaboradores mostraram que o extrato de açaí apresentou atividade anti-inflamatória por redução da ativação do NF- κ B, diminuição da expressão de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e da molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) (41). A ação anti-inflamatória do açaí pode ser fornecida pelos compostos fenólicos e pelas antocianinas (42, 43). São descritos como mecanismo de ação das antocianinas: a inibição da ativação do NF- κ B, a redução da concentração plasmática da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), a inibição da resposta inflamatória e da

apoptose de células endoteliais humanas induzidas pelo fator CD40, a inibição da produção de óxido nítrico e da expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (43).

A literatura apresenta poucos trabalhos relativos ao açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e coração (44-47) e nenhum deles trata das ações antioxidante e/ou anti-inflamatória. Contudo, há um estudo que associou suplementação do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí em animais submetidos ao infarto do miocárdio e atividade física. A suplementação durante 4 semanas atenuou a hipertrofia, a fibrose e a disfunção cardíaca. Porém, existe grande problema neste trabalho. O estudo não avaliou o tamanho de infarto nos grupos suplementados e não suplementados com açaí. É conhecido que animais com menores tamanhos de infarto apresentam melhores parâmetros de função sistólica e diastólica do que animais com maiores tamanho de infarto. Desta forma, o grupo que recebeu suplementação de açaí pode ter tamanho de infarto menor e isso explicaria a menor hipertrofia, menor fibrose e melhor função no coração infartado dos animais tratados (48).

Hipótese e Objetivo

Hipótese

- A suplementação de polpa de açaí atenua a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio.
- A redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório são os mecanismos envolvidos nesse modelo.

Objetivo

Objetivo geral

Verificar se a influência de suplementação de polpa de açaí na ração atenua as alterações na morfologia e função cardíaca, o aparecimento de estresse oxidativo, alterações dos mediadores inflamatórios, do metabolismo energético e da apoptose, decorrentes da remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio em ratos.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o estresse oxidativo cardíaco por meio da produção de espécies reativas, marcadores de estresse oxidativo em lipídios, análise da atividade de enzimas antioxidantes,
- ✓ Avaliar alterações de mediadores inflamatórios,
- ✓ Avaliar alterações no metabolismo energético,
- ✓ Avaliar a morfologia e função cardíaca por meio do ecocardiograma e histologia.

Métodos

Delineamento Experimental

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (nº1066/2013), em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200g a 250g acondicionados no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu. Os animais foram submetidos ao infarto experimental, de acordo com método descrito inicialmente por Heimbürger e modificado por Pfeffer e colaboradores (49-51), ou à cirurgia simulada (mesmo procedimento do infarto experimental, porém, sem a oclusão da artéria coronária).

Após 7 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado o primeiro estudo ecocardiográfico para aferição do tamanho do infarto e da fração de variação de área. Esse primeiro ecocardiograma foi realizado para garantir que o tamanho do infarto fosse semelhante entre os grupos infartados antes de iniciar o tratamento. No final dos três meses de acompanhamento, foi realizado novo estudo ecocardiográfico.

Após o estudo ecocardiográfico inicial, os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Permaneceram em gaiolas individuais, com livre acesso à água e comida. A ingestão alimentar foi controlada diariamente e o peso corporal (PC) foi medido semanalmente durante todo o período experimental.

Os animais foram distribuídos em seis grupos: 1) grupo Sham alimentado com ração padrão e submetido à cirurgia simulada (SA0, n=14); 2) grupo Sham alimentado com ração padrão suplementada com 2% de polpa de açaí pasteurizado e submetido à cirurgia simulada (SA2, n=13); 3) grupo Sham alimentado com ração padrão suplementada com 5% de polpa de açaí pasteurizado e submetido à cirurgia simulada (SA5, n=14); 4) grupo infartado alimentado somente com ração padrão (IA0, n=12); 5) grupo infartado, alimentado com ração padrão suplementada com 2% de polpa de açaí pasteurizado (IA2, n=12); 6) grupo infartado, alimentado com ração padrão suplementada com 5% de polpa de açaí pasteurizado (IA5, n=12). Os animais foram suplementados por três meses e foi observada a mortalidade. Após esse período, os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e

posteriormente à eutanásia e coleta de material biológico para realização das demais avaliações.

Neste estudo utilizamos apenas os resultados de animais que apresentaram área de infarto avaliado pela análise histológica, maiores que 30%, pois trabalhos prévios do grupo observaram alterações característica de remodelação com área infartada superior a essa porcentagem (51).

Suplementação com polpa de açaí

Toda a polpa de açaí foi adquirida comercialmente e, em seguida, homogeneizada com a finalidade de apresentarem a mesma composição durante todo o experimento. A análise da porcentagem do teor lipídico realizada em laboratório para polpa de açaí utilizada neste trabalho foi de $6,02 \pm 0,02$. Assim, não foi necessário acrescentar calorias à ração dos animais que não receberam suplementação com polpa de açaí. A análise de umidade foi de 88%, e esta porcentagem foi considerada para o cálculo de quantidade de polpa de açaí utilizada na suplementação. O valor calórico total, presente no rótulo da polpa de açaí, é de 122 kcal para uma porção de 200 ml.

A dose de 2% utilizada no estudo foi à proposta por Souza e colaboradores (52), que estudaram o uso de polpa de açaí no modelo de hipercolesterolemia. A dose de 5% utilizada no estudo foi proposta por Fragoso e colaboradores (53), que estudaram a suplementação de açaí no modelo de carcinogênese de cólon. A polpa foi adicionada a ração comercial para ratos a base de cereais da Nuvilab® (Nuvital Nutrientes S/A, Brazil). A composição aproximada por kg de ração é de 220g de proteína, 40g de gordura, 100g de mineral, 80g de fibra, e 1.800UI de vitamina D. Inicialmente a ração foi triturada para posterior adição de polpa de açaí, sendo que a mistura foi peletizada e, em seguida, secada em temperatura ambiente. A ração foi armazenada em freezer (-20°C).

Infarto experimental

Após anestesia com cloridrato de cetamina (70mg/kg) e xilazina (1mg/kg), por via intraperitoneal, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria coronária descendente anterior foi ligada a aproximadamente 2 mm da origem, com fio de

polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos por ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado, com aspiração do pneumotórax (49-51).

Avaliação ecocardiográfica

Nos dois momentos (ecocardiograma inicial: após 7 dias da cirurgia, e final: após os 3 meses de acompanhamento) os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg) via intramuscular. Em seguida foi realizada tricotomia da região anterior do tórax dos animais e posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do ecocardiograma transtorácico. O equipamento utilizado foi o General Electric Medical System, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-11,5 MHz.

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional, na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. 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. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography* (54) e já validadas no modelo de ratos infartados.

O ecocardiograma inicial foi realizado nos animais infartados para verificar o tamanho do infarto e a fração de variação da área, com a finalidade de homogeneizar o tamanho de infarto entre os grupos.

No ecocardiograma final, as estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e as espessuras diastólicas da parede posterior do ventrículo esquerdo (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da

excursão sistólica máxima da parede da cavidade. As áreas diastólicas e sistólicas foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo maior e eixo menor. A espessura relativa do ventrículo esquerdo foi calculada pela fórmula: $[(2 \times \text{EDPP})/\text{DDVE}]$. O índice de massa do ventrículo esquerdo foi calculado pela fórmula: $[(\text{DDVE} + \text{EDPP} + \text{EDSIV})^3 - \text{DDVE}^3] \times 1,04/1000$, sendo que 1,04 representa a densidade específica miocárdica.

A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor, operando em 5,0 MHz, na posição apical quatro câmaras. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 5) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ($\text{TRIV}/\text{RR}^{0,5}$); 6) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A'), obtidas pelo doppler tissular; 7) razão entre as ondas E e E' (E/E').

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada pelos seguintes índices: 1) fração de variação de área ($\text{FVA} = \text{AD} - \text{AS} / \text{AD} \times 100$); 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; 3) porcentagem de encurtamento endocárdico $[(\text{DDVE} - \text{DSVE})/\text{DDVE}]$; 4) velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S) média obtida por doppler tissular; 5) índice de performance miocárdica do ventrículo esquerdo (índice de Tei). Algumas variáveis ecocardiográficas foram normalizadas pelo peso corporal e pelo diâmetro da aorta.

Coleta de material biológico

Após a realização do ecocardiograma final, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de pentobarbital. O coração foi lavado em soro fisiológico e dissecado em átrio direito (AD), átrio esquerdo (AE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) foram separados e pesados. Em seguida, os corações tiveram o VE seccionado de 4 a 6 milímetros à partir do ápice, sendo um anel de aproximadamente 3 mm, pelo fato deste corte refletir a média dos resultados dos tamanhos dos infartos de cortes de todo o ventrículo. A base e ponta do VE, assim como o VD, foram colocados em nitrogênio líquido e depois

armazenados em freezer a -80°C para posteriores dosagens bioquímicas. O sangue foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm, por 20 minutos a 4°C, e o soro foi coletado e armazenado a -80°C.

Análise histológica

Após coleta, o anel do VE foi colocado em formol tamponado (formol a 10%) por 24 horas e, em seguida, foi lavado em água corrente por mais 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram armazenados em álcool 70% e inclusos em blocos de parafina (55-57) obtendo-se, a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica.

Foram realizados cortes histológicos de 4 µm nos blocos de parafina e, os mesmos, corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para que posteriormente fossem aferidas as áreas seccional transversa dos miócitos (ASM) e do tamanho de infarto. Empregou-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador com programa de análise de imagens *Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA)*. Foram mensuradas de 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente, apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

O tamanho do infarto foi calculado pela soma do comprimento endocárdico e epicárdico do segmento infartado em relação à soma do comprimento endocárdico e epicárdico total do ventrículo esquerdo x 100. A quantificação do tamanho do infarto por meio da análise histológica é considerada mais precisa do que a análise pelo ecocardiograma. Isso se deve ao ecocardiograma quantificar apenas o perímetro endocárdico do infarto, que pode estar superestimado devido ao processo de expansão do infarto (58).

Determinação da atividade das enzimas dos marcadores do estresse oxidativo e do metabolismo energético

As enzimas do metabolismo energético e os marcadores de estresse oxidativo foram determinados por método colorimétrico.

Primeiramente foi realizada a extração de proteína em amostras de 100 mg do ventrículo esquerdo, homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas a 10.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de proteína total; da atividade das enzimas do metabolismo energético: lactato desidrogenase, fosfofrutoquinase, complexo piruvato desidrogenase, citrato sintase, β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase; para atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase; e para a concentração de hidroperóxido de lipídio. O pellet foi ressuspensionado com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, para posterior determinação da atividade de NADH desidrogenase e de succinato desidrogenase (complexo enzimático mitocondrial de cadeia respiratória I e II, respectivamente) e da ATP sintase (59).

As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes utilizados foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

a) Determinação dos marcadores de estresse oxidativo

✓ Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólio (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH₂ e fenazina metassulfato (60).

✓ Atividade da glutathione peroxidase (GPx)

Foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio à mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathione reduzida, azida sódica, EDTA, glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada (61).

✓ Atividade da catalase (CAT)

A atividade enzimática da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando 15µL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm (62).

✓ Concentração de hidroperóxido de lipídio (HL)

O hidroperóxido de lipídio foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe_2^+) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90% (63).

b) Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético

✓ Lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi determinada de acordo com metodologia proposta por Wilkinson (1965) (64) com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH_2 , (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

✓ Fosfofrutoquinase (PFK)

A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl_2 , gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose -6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH_2 , segundo método descrito por Bass et al. (1969) (65).

✓ Complexo piruvato desidrogenase (PIDH)

Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) foi determinada a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotreitól, MgCl_2 , NBT (nitrobluetetrazóilico), piruvato de sódio e fenazina metasulfato, onde foi medido a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD (65).

✓ Citrato sintase (CS)

A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB (dithiobis-2-nitrobenzoato) em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0 (65).

✓ β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH)

Foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (65).

✓ Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (complexo I)

A atividade do complexo I foi determinada pelo método de Singer (66) em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, onde monitorou a velocidade de oxidação do NADH.

✓ Succinato desidrogenase (complexo II)

A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi medida pelo método descrito por Fischer et al. (1985) (67) em meio com tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e DPIP (diclorofenolindofenol), o qual teve a absorbância, a 600nm, diminuída.

✓ ATP sintase

A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0), na presença de $MgCl_2$, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase (68).

Determinação de malondialdeído

O malondialdeído (MDA) foi determinado no tecido e no soro. Para o tecido é necessário realizar extração do lisado celular total. Para isso foi utilizado 100mg de tecido do VE. A extração foi realizada na luz vermelha e um dia antes da análise. O tecido foi transferido para um tubo plástico com 500 μ l de PBS e homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA). Em outro tubo, foi adicionado 500 μ l de PBS e colocou no aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25

Basic, Wilmington USA). O conteúdo dos dois tubos foi transferido para um eppendorf. O aparelho foi lavado antes de homogeneizar uma nova amostra. Todas as amostras foram colocadas em um isopor fechado (abrigado da luz) e levadas para centrifugar a 3.000 rpm, 10 minutos, 4°C. Em seguida, as amostras foram transferidas para um novo eppendorf e foi realizado a quantificação segundo Bradford (69).

Para determinação do MDA no soro, é necessário apenas coletar a quantidade de amostra necessária, ou seja, 100µl.

A metodologia utilizada foi a descrita por Nielsen et al., (1997). Foi pipetado em um tubo de vidro 100µl de amostra e adicionado 700µl de ácido ortofosfórico 1%, em seguida, foi agitado por 10 segundos no vórtex. Adicionou 200µl de TBA 42 mmol/L, agitou por 10 segundos no vórtex, e depois aqueceu por 60 minutos a 100°C, seguido por banho de gelo durante 10 minutos. Foi pipetado 200µl de amostra em um eppendorf e adicionou 200µl de NaOH : metanol (1:12), agitou por 10 segundos no vórtex. Em seguida, foi centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm e 200µl de sobrenadante foi utilizado para injeção (70).

Especificações do aparelho de HPLC:

- Detector ultravioleta (UV – 532 nm)
- Fase móvel: 0,5mL/min
- Volume de injeção: 50µl

Os reagentes utilizados para a determinação foram: TBA (42mmol/L) - ácido tiobarbitúrico (0,6g de TBA + 80ml de água, em seguida foi aquecido a 35–45°C até dissolver e completou com 100ml no balão volumétrico). Também foi utilizado NaOH:metanol (1:12) (8g de NaOH em 100ml de água) e a proporção de 1 vol de NaOH para 12 de metanol.

Para fase móvel foi utilizado tampão fosfato: metanol (60V:40V), tampão fosfato 1 mmol/L – pH 6,8 e acertou o pH com KOH (2mol/L). Em seguida foram preparados os padrões com: TEP (tetraetoxipropano 97%), solução mãe (50µl de TEP em etanol - 400ml/L, em balão volumétrico de 25 ml), e solução intermediária (0,5 ml da solução mãe em etanol - 400ml/L em balão volumétrico de 100ml).

Os padrões foram: P1: 0,61 µmol/L (0,150ml de TEP em água), P2: 1,22 µmol/L (0,300 ml de TEP em água), P3: 2,43 µmol/L (0,600 ml de TEP em água) e P4: 4,86 µmol/L (1,200 ml de TEP em água).

Os resultados apresentados para determinação do tecido cardíaco foram corrigidos pela quantidade de proteína presente na amostra.

Determinação dos mediadores inflamatórios e do inibidor tecidual de metaloproteinase-1

A dosagem de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), interleucina-10 (IL-10) e inibidor tecidual de metaloproteinase - 1 (TIMP-1) foram realizadas pelo método de ELISA sanduíche.

Primeiramente foi realizada a extração da proteína do tecido cardíaco adicionando-se 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmongton USA). O material foi centrifugado por 20 minutos à 4° C e 12.000 rpm e o sobrenadante foi coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford (69) e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. Nesse extrato proteico foi avaliada a concentração de TNF- α , INF- γ , IL-10 e TIMP-1.

Após a extração de proteína, placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-TNF- α , anti- INF- γ , anti-IL-10 ou anti-TIMP de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionada 300 μ L da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas padrões, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-TNF- α , anti- INF- γ , anti-IL-10 ou anti-TIMP de rato biotinilados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluído 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492 nm.

Determinação da expressão proteica por Western Blot

Foi realizada a determinação da expressão da proteína fator nuclear eritróide-2 (Nrf-2) (banda observada de 57kDa – Nrf-2), do colágeno I e III (banda observada de 90kDa e 70 – 75kDa, respectivamente), do NF- κ B total e fosforilado (banda observada de 65kDa para ambos), do marcador inflamatório TNF- α (banda observada de 25kDa), do marcador de apoptose: caspase-3 (banda observada foi a ativa de 17kDa) pela técnica Western Blot.

a) Extração do lisado celular total

Para determinação de todas as proteínas estudadas, exceto o Nrf-2, a extração de proteína foi realizada utilizando-se amostras de 100 mg do ventrículo esquerdo homogeneizadas com 1ml de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmongton USA). A seguir, as amostras foram centrifugado por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenadas em freezer a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (69).

b) Extração nuclear

Amostras de 60 mg de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas com 500 μ l de tampão de extração (10mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,05% NP40). As amostras foram homogeneizadas manualmente, com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, as amostras foram centrifugados a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado (fração citoplasmática) e o pellet ressuspendido com tampão (5mM HEPES, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 0,5mM DTT, 26% glicerol (v/v)) e NaCl. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmongton USA). Após aguardar 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 rpm, por 20 minutos 4°C e coletado o sobrenadante (fração nuclear), que foi utilizado para a quantificação do Nrf-2. A

concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (69).

c) Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras (contendo 50 μ g de proteína total) foram 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 4° C.

A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 10% e a concentração do gel de resolução varia de 10 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes os grupos foram pipetados de maneira alternada. A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

d) Transferência e Bloqueio

Após a corrida, 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 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.

e) Incubação com os Anticorpos primário e secundário

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução basal. As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos também em solução basal. As membranas permaneceram incubadas por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana será lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA).

A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel pro Image32 versão 3.1.00 (*Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA*), que mede as bandas escuras em fundo claro do *blot* em unidade de imagem denominada pixel.

Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH. As mesmas membranas foram lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos para o GAPDH e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente.

Uma vez com os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi feita da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pela amostra de um animal e repetido em todos os géis; 2) o GAPDH, da mesma forma, foi normalizado pelo animal repetido em todos os géis; 3) as proteínas (já normalizadas) foram então normalizadas pelo GAPDH (já normalizado), para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot.

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- ✓ Nrf-2, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 722), diluição 1:400.
- ✓ Caspase 3, rabbit monoclonal IgG (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA, 9664), diluição 1:500.
- ✓ NF- κ B total, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 8008), diluição 1:200.
- ✓ NF- κ B fosforilado, rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 3302), diluição 1:200.
- ✓ Colágeno I, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 8784), diluição 1:100.
- ✓ Colágeno III, mouse monoclonal IgG1 (Abcam plc, Inc, Massachusetts, US, ab 6310), diluição 1:5.000.
- ✓ TNF- α , rabbit monoclonal IgG (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA, 11948S), diluição 1:1.000.
- ✓ GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233), diluição 1:10.000.

Os Anticorpos secundários utilizados serão os seguintes:

- ✓ Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
- ✓ Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

Análise estatística

Os testes foram realizados por meio do software SigmaStat for Windows v2.03 da SPSS. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. As variáveis com distribuição não normal foram normalizadas por meio de transformação matemática mais adequada para serem testadas no teste de ANOVA de duas vias. Para os dados que não conseguiram ser normalizados, foram utilizados os testes de *Kruskal-Wallis* (comparação entre os grupos Sham: SA0, SA2 e SA5; e entre os grupos infartados IA0, IA2 e IA5) e *Mann-Whitney* (comparação entre os grupos SA0 e IA0; SA2 e IA2 e SA5 e IA5) e realizado a correção por *Bonferroni* (o valor de p foi multiplicado por 5, visto que foram realizadas 5 comparações).

Para a comparação do tamanho do infarto, área sistólica e área diastólica foi utilizado o teste ANOVA de uma via e para avaliar a mortalidade entre os animais infartados, foi utilizado teste χ^2 . O teste de Análise de Sobrevivência de LogRank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevivência dos animais infartados.

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

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

Com base nessas considerações, discutimos os resultados da seguinte maneira: 1) alterações causadas pelo infarto, correspondendo às comparações entre os grupos SA0 e IA0 na ocorrência de interação, e as comparações entre todos os animais sem infarto e todos os animais com infarto na ausência de interação entre os fatores; 2) influência da suplementação de polpa de açaí no coração sem agressão, correspondendo às comparações entre os grupos SA0, SA2 e SA5 na ocorrência de interação; 3) influência da suplementação de polpa de açaí tanto no infarto como no coração sem agressão, correspondendo à comparação entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí na ausência de interação entre os fatores; 4) influência da suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, correspondendo à comparação entre os grupos IA0, IA2 e IA5 na ocorrência de interação.

O nível de significância adotado foi de 5%.

Para análise dos dados e a construção dos gráficos, foi utilizado software *SigmaStat para Windows* versão 11.0 da SPSS (Systat Software, Inc).

Resultados

Número de animais, mortalidade e tamanho do infarto

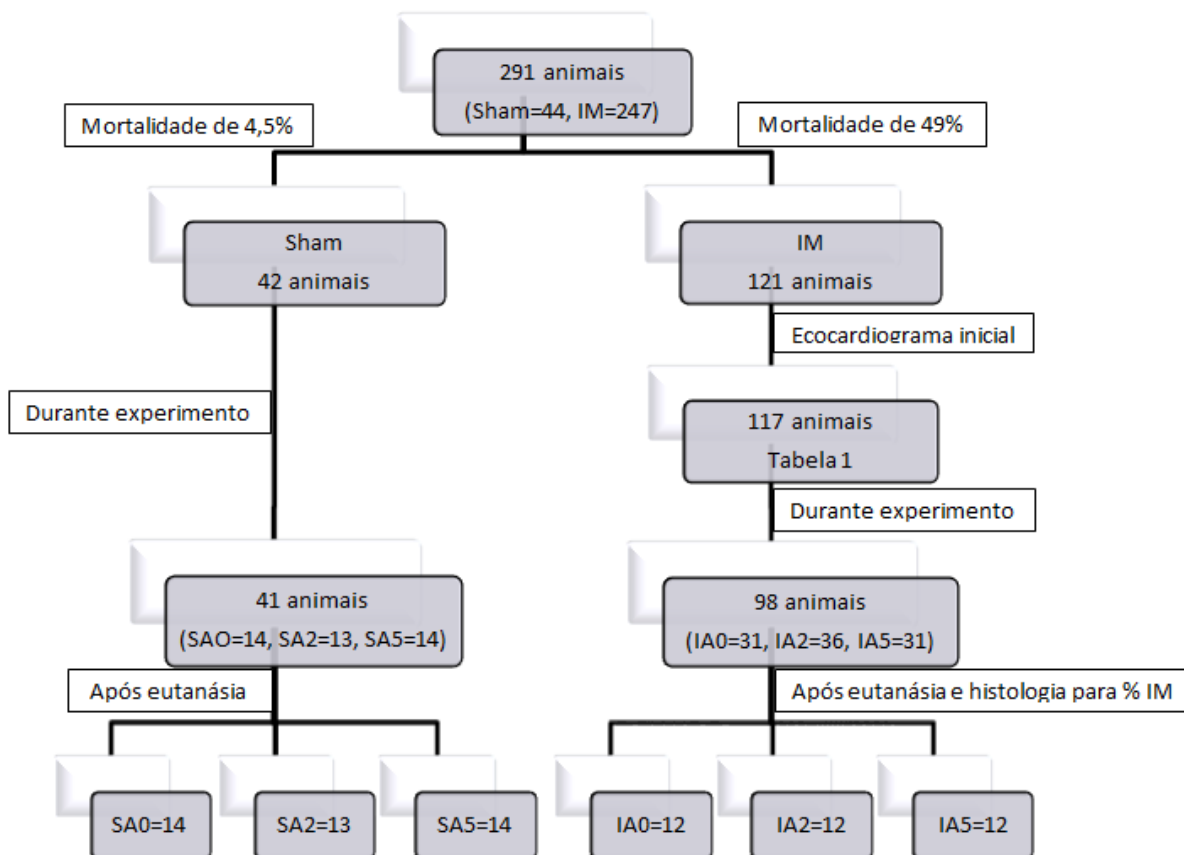
O número de animais, mortalidade e tamanho do infarto estão na Figura 1. Foram utilizados 291 ratos Wistar machos, 44 animais foram submetidos à cirurgia simulada e a mortalidade foi de 2 animais (4,5%), 247 animais foram submetidos ao infarto experimental e apresentaram 126 mortes (49%), até 48 horas após a cirurgia.

Após 7 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado o primeiro estudo ecocardiográfico para aferição do tamanho do infarto e da fração de variação de área. Esse ecocardiograma inicial foi realizado para garantir que o tamanho do infarto era semelhante entre os grupos infartados antes do tratamento, os resultados estão representados na Tabela 1.

A princípio, foram estudados 42 animais Sham, alocados em SA0 (n=14), SA2 (n=14) e SA5 (n=14) e 117 animais IM, alocados em IA0 (n=39), IA2 (n=42), IA5 (n=36). Porém, durante os 3 meses de experimento, morreu 1 animal do grupo SA2. Em relação à mortalidade nos animais infartados, morreram 8 animais do grupo IA0, 6 animais do grupo IA2 e 5 animais do grupo IA5. Não houve diferença na mortalidade entre os grupos ($p=0,728$). Na Figura 2 estão plotadas as curvas de sobrevivência dos animais infartados. A comparação do tempo de sobrevivência dos animais de cada grupo pelo teste LogRank não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,486$).

Após 3 meses de experimento, foi realizada eutanásia dos animais sobreviventes e, nos animais infartados, foi feita análise histológica para verificar o tamanho do infarto. Foram excluídos os infartos inferiores a 30%. Desta maneira, excluímos 19 animais do grupo IA0, 24 animais do grupo IA2 e 19 animais do grupo IA5. Assim, os grupos IA0, IA2 e IA5 ficaram com 12 animais cada. A comparação do tamanho do infarto entre os grupos não apresentou diferenças estatisticamente (IA0 $42,8 \pm 1,9$; IA2 $39,7 \pm 2,7$; IA5 $42,1 \pm 1,8$; $p=0,556$).

Figura 1. Número de animais, mortalidade e tamanho do infarto.



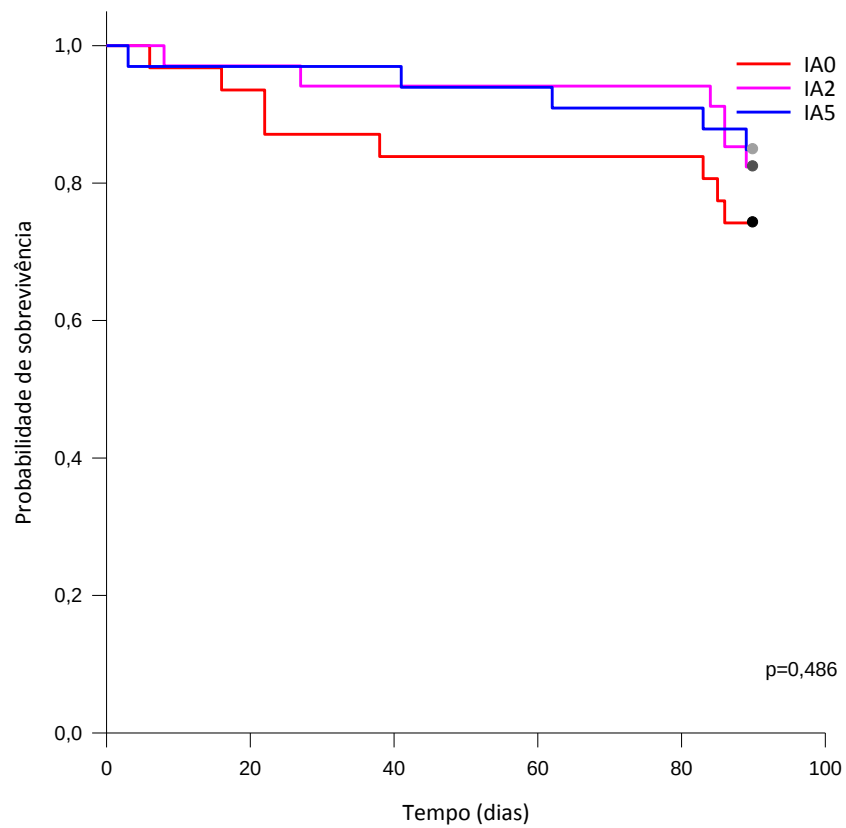
SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí.

Tabela 1. Estudo ecocardiográfico inicial realizado 7 dias após o IM.

Variável	IA0(n=39)	IA2(n=40)	IA5(n=38)	P
Área sistólica (mm ²)	39,3±1,77	37,3±2,10	38,5±2,20	0,782
Área diastólica (mm ²)	61,9±2,00	57,8±1,98	60,1±2,05	0,342
Tamanho do infarto (%)	34,5±1,77	34,5±1,59	33,7±1,65	0,924
*FVA	37,0±1,63	37,0±2,10	37,6±1,96	0,909

Dados expressos em média ± erro padrão. *variável normalizada para realização do teste ANOVA de duas vias.
IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí.
FVA: fração de variação da área.

Figura 2. Curva de sobrevivência dos animais infartados.

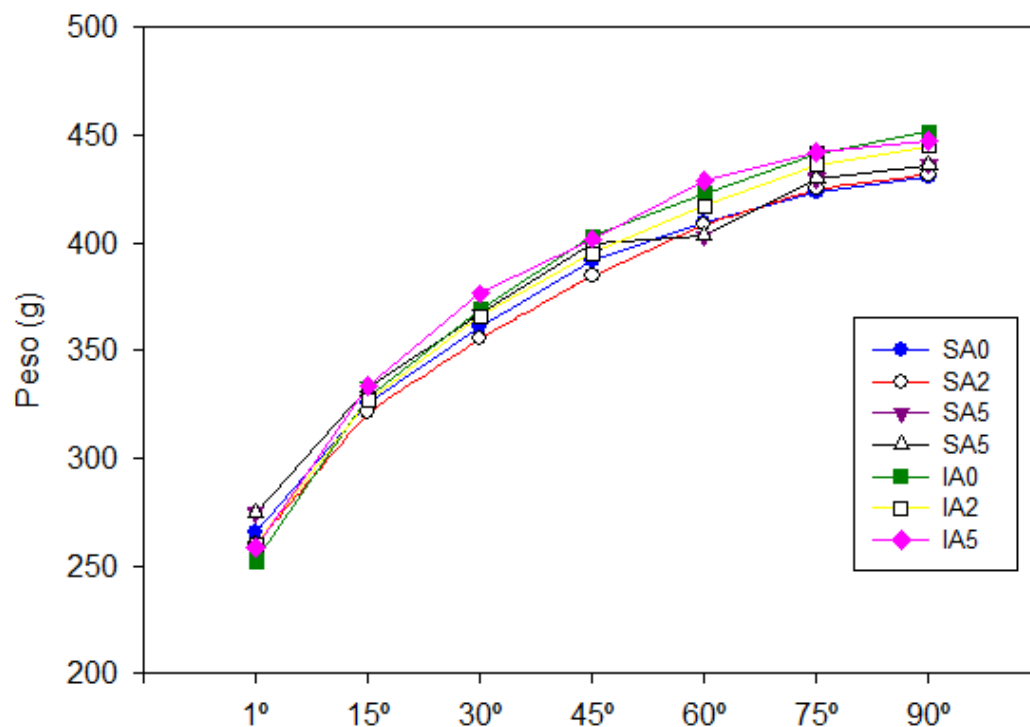


IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí.
P do teste de Análise de Sobrevivência de LogRank.

Peso dos animais e consumo de ração

Os animais foram pesados semanalmente e o ganho de peso médio quinzenal por grupo está representado na Figura 3. Os pesos corporais iniciais e finais não apresentaram diferença significativa e estão representados na Tabela 2. O consumo médio diário, em gramas, de ração consumida entre os grupos não diferiu significativamente (Tabela 2).

Figura 3. Média de ganho de peso corporal em 90 dias de experimento após a cirurgia.



SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açúcar; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açúcar; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açúcar; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açúcar.

Tabela 2. Peso corporal inicial, final e consumo de ração diário.

Variável	SA0(n=14)	SA2(n=13)	SA5(n=14)	IA0(n=12)	IA2(n=12)	IA5(n=12)	p(I)	p(A)	p(IxA)
Peso corporal inicial (g)	266±8,95	260±9,08	275±8,46	252±5,04	260±7,82	258±7,19	0,133	0,605	0,595
Peso corporal final (g)	430±9,58	432±13,5	436±11,1	452±11,1	445±13,2	447±13,0	0,127	0,949	0,906
Consumo de ração (g/dia)	23,0±0,55	22,6±0,72	23,7±0,61	24,8±0,53	23,1±0,49	23,2±0,81	0,257	0,254	0,194

Dados expressos em média ± erro padrão. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados obtidos pelo estudo ecocardiográfico estão nas Tabelas 3, 4 e 5 (variáveis morfológicas e funcionais).

O infarto causou alterações morfológicas, tais como maior diâmetro sistólico e diastólico do VE corrigidos pelo PC (Figuras 4 e 5), maior espessura diastólica da parede posterior do VE (Figura 6) e maior espessura diastólica do septo interventricular (Figura 7), maior índice de massa do VE (Figura 8), maior diâmetro do átrio esquerdo (Figura 9) e maior diâmetro do átrio esquerdo corrigido pela aorta e pelo peso corporal (Figuras 10 e 11). Foram observadas alterações funcionais sistólicas, como menor porcentagem de encurtamento endocárdico (Figura 12), menor velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (Figura 13), menor fração de ejeção (Figura 14), menor fração de variação da área do VE (Figura 15), maior índice de performance miocárdica (Figura 16), menor onda sistólica do anel mitral lateral e septal (Figuras 17 e 18), e menor média da onda sistólica do anel mitral lateral e septal (Figura 19). Também foram observadas alterações funcionais diastólicas, como maior onda E do fluxo mitral (Figura 20), menor onda diastólica tardia do anel mitral lateral (Figura 21), menor média da onda diastólica inicial do anel mitral lateral e septal (Figura 22), menor média da onda diastólica tardia do anel mitral lateral e septal (Figura 23).

Não observamos influência da suplementação de polpa de açaí nas variáveis ecocardiográficas no coração sem agressão. Assim como não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí.

Em relação à influência da suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, não apresentaram diferenças nas variáveis ecocardiográficas no coração infartado.

Tabela 3. Variáveis ecocardiográficas estruturais.

Variável	SA0(n=14)	SA2(n=13)	SA5(n=14)	IA0(n=12)	IA2(n=12)	IA5(n=12)	p(I)	p(A)	p(IxA)
*DSVE/PC									
(mm/kg)	9,52±0,43	9,39±0,29	8,81±0,33	17,5±0,98	17,6±1,09	18,5±0,84	<0,001 ¹	0,994	0,297
*DDVE/PC									
(mm/kg)	18,4±0,31	18,8±0,51	17,8±0,49	22,7±0,76	22,9±0,98	23,3±0,76	<0,001 ¹	0,901	0,428
#EDPP (mm)	1,35±0,02	1,39±0,02	1,38±0,02	1,62±0,03	1,6±0,06	1,69±0,07	<0,005 ¹	0,209	0,567
#EDSIV (mm)	1,36±0,01	1,40±0,02	1,38±0,02	1,67±0,07	1,48±0,06	1,45±0,07	<0,005 ¹	0,229	0,063
#Esp. Rel.	0,34±0,01	0,35±0,01	0,36±0,01	0,32±0,01	0,32±0,02	0,33±0,01	0,165	0,133	0,928
*IMVE (g/kg)	1,69±0,04	1,82±0,07	1,67±0,07	3,25±0,21	2,97±0,20	3,18±0,22	<0,001 ¹	0,921	0,217
#AE (mm)	5,30±0,11	5,59±0,06	5,29±0,12	7,31±0,34	6,66±0,34	6,77±0,33	<0,005 ¹	0,070	0,351
#AE/AO	1,36±0,02	1,41±0,02	1,35±0,03	2,00±0,1	1,76±0,10	1,84±0,10	<0,005 ¹	0,216	0,245
#AE/PC (mm/kg)	12,4±0,27	13,1±0,42	12,2±0,33	16,4±0,96	15,2±1,07	15,3±0,92	0,005 ¹	0,132	0,665

Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí; ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. PC: Peso corporal (kg); DDVE: diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; Esp. Rel.: espessura relativa do VE; IMVE: índice de massa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta.

Tabela 4. Variáveis ecocardiográficas da função sistólica do VE.

Variável	SA0(n=14)	SA2(n=13)	SA5(n=14)	IA0(n=12)	IA2(n=12)	IA5(n=12)	p(I)	p(A)	p(IxA)
#FC (bpm)	279±9,09	276±11,2	267±10	277±12,7	274±13,4	290±14,5	0,857	0,412	0,699
% Enc. Endo	48,4±1,86	49,8±1,46	50,7±0,98	23,3±2,32	23,7±1,97	21,0±1,74	<0,001 ¹	0,851	0,38
VEPP (mm/s)	39,8±1,55	38,2±1,56	39,2±1,16	27,0±2,49	25,5±2,59	27,0±1,87	<0,001 ¹	0,696	0,983
*FE	85,6±1,28	86,9±1,23	87,9±0,72	53,6±3,76	54,6±3,53	49,9±3,2	<0,001 ¹	0,794	0,338
#FVA	68,9±1,65	66,7±1,14	68,1±1,19	32,2±2,99	33,1±1,75	31,4±3,27	<0,005 ¹	0,538	0,605
*Índice de Tei	0,49±0,01	0,49±0,02	0,47±0,01	0,70±0,05	0,78±0,06	0,72±0,04	<0,001 ¹	0,662	0,718
#S lateral (cm/s)	3,49±0,09	3,43±0,12	3,6±0,11	3,15±0,08	2,82±0,12	3,29±0,18	0,045 ¹	0,518	0,090
S septal (cm/s)	3,29±0,11	3,26±0,13	3,23±0,06	2,89±0,12	2,73±0,17	2,95±0,16	<0,001 ¹	0,683	0,593
S média (cm/s)	3,39±0,09	3,35±0,08	3,41±0,06	3,02±0,06	2,77±0,12	3,12±0,13	<0,001 ¹	0,072	0,285

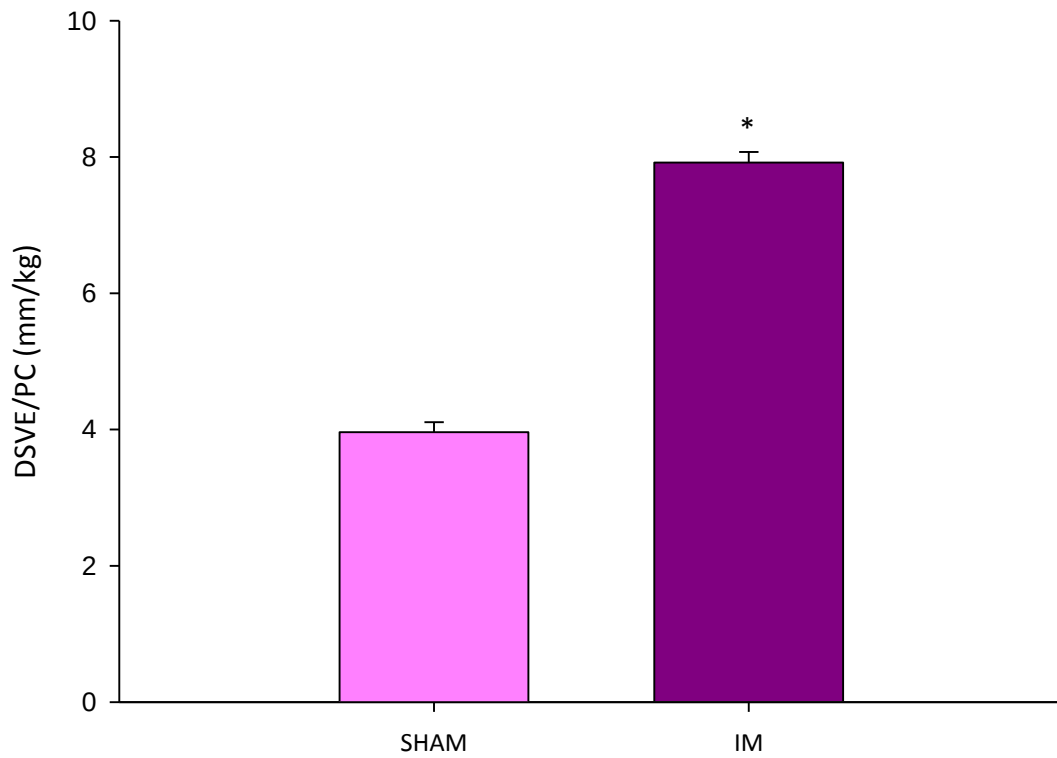
Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. #foi realizado teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí; ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. FC: frequência cardíaca; % Enc. Endo.: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; FVA: fração de variação da área; Índice de Tei ou Índice de Performance Miocárdica (avalia conjuntamente a função sistólica e diastólica, calculado considerando o tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + tempo de relaxamento isovolumétrico); S lateral: onda sistólica do anel mitral lateral; S septal: onda sistólica do anel mitral septal; S média.

Tabela 5. Variáveis ecocardiográficas da função diastólica do VE.

Variável	SA0(n=14)	SA2(n=13)	SA5(n=14)	IA0(n=12)	IA2(n=12)	IA5(n=12)	p(I)	p(A)	p(IxA)
#E mitral (cm/s)	78,6±1,76	79,2±1,97	79,6±1,42	96,7±5,66	78,5±6,73	87,7±7,49	0,03¹	0,917	0,151
#A mitral (cm/s)	50,9±2,94	50,1±2,79	45,6±2,73	41,0±6,14	45,8±5,68	46,6±7,19	0,303	0,364	0,791
#E/A	1,61±0,09	1,63±0,08	1,82±0,10	3,47±0,75	2,49±0,65	2,79±0,79	0,173	0,209	0,336
#TDE (ms)	46,8±1,71	48,1±1,69	50,5±1,37	44,1±3,66	49,3±4,43	47,0±3,56	0,501	0,261	0,625
#TRIV/R-R	57,1±1,95	56,4±1,46	55,5±1,37	57,5±2,66	68,8±4,24	62,2±3,76	0,926	0,769	0,099
#E' lateral (cm/s)	3,77±0,17	4,17±0,22	4,14±0,14	3,95±0,23	3,42±0,40	3,50±0,31	0,544	0,296	0,471
*A' lateral (cm/s)	3,78±0,21	3,48±0,26	3,49±0,22	3,00±0,28	3,08±0,29	3,40±0,33	0,026¹	0,809	0,437
E' septal (cm/s)	4,01±0,21	4,10±0,21	4,14±0,20	3,86±0,23	3,82±0,21	3,72±0,15	0,093	0,990	0,800
#A' septal (cm/s)	3,55±0,25	3,48±0,28	3,10±0,20	2,69±0,21	2,61±0,31	3,66±0,42	0,085	0,468	0,093
E' média (cm/s)	3,89±0,16	4,14±0,19	4,14±0,12	3,91±0,17	3,62±0,21	3,61±0,10	0,012¹	0,988	0,176
*A' média (cm/s)	3,66±0,20	3,48±0,22	3,3±0,17	2,85±0,23	2,85±0,28	3,53±0,36	0,013¹	0,583	0,100
#E/E' média	20,5±0,70	19,6±0,99	19,4±0,63	24,3±1,75	21,9±2,13	21,8±2,60	0,075	0,521	0,654
E'/A' média	1,10±0,07	1,22±0,07	1,30±0,06	1,45±0,12	1,38±0,16	1,16±0,14	0,156	0,781	0,075

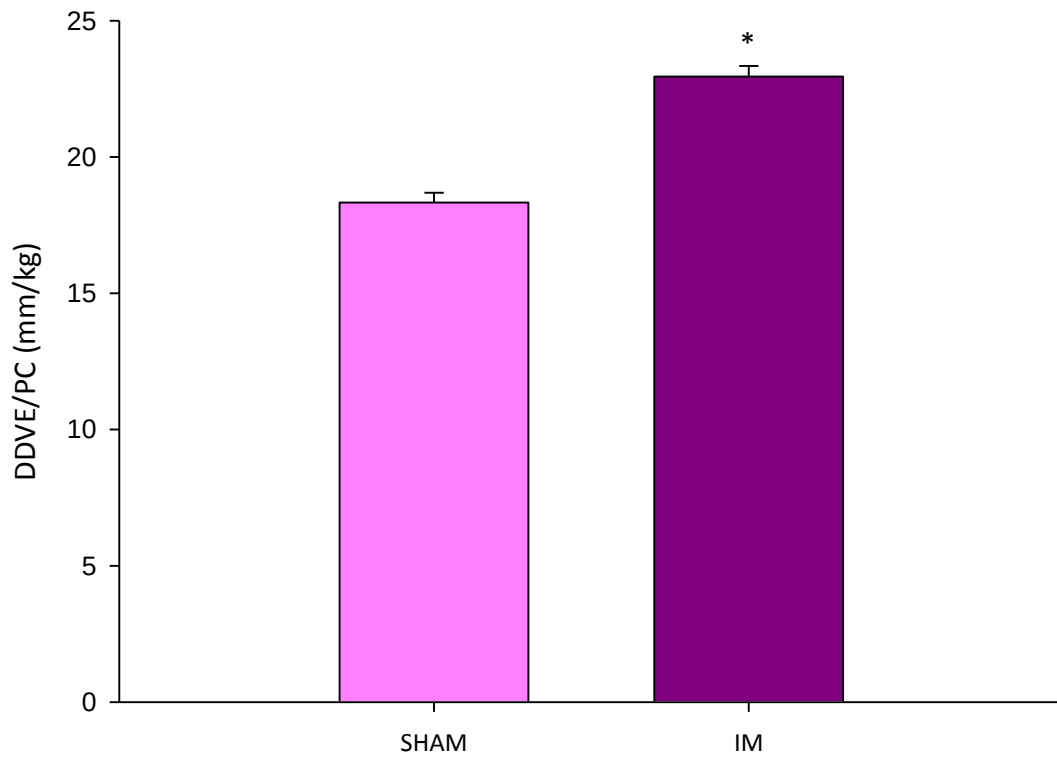
Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. #foi realizado teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí; ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; R-R: distância de um batimento a outro (para cálculo do TRIV/R-R); TRIV/R-R: TRIV normalizado para a frequência cardíaca (TRIV dividido pela raiz quadrada do R-R); E' lateral: onda diastólica inicial do anel mitral lateral; A' lateral: onda diastólica tardia do anel mitral lateral; E' septal: onda diastólica inicial do anel mitral septal; A' septal: onda diastólica tardia do anel mitral septal; E' média; A' média; E/E' média, E'/A' média.

Figura 4. Diâmetro sistólico do VE corrigido pelo peso corporal.



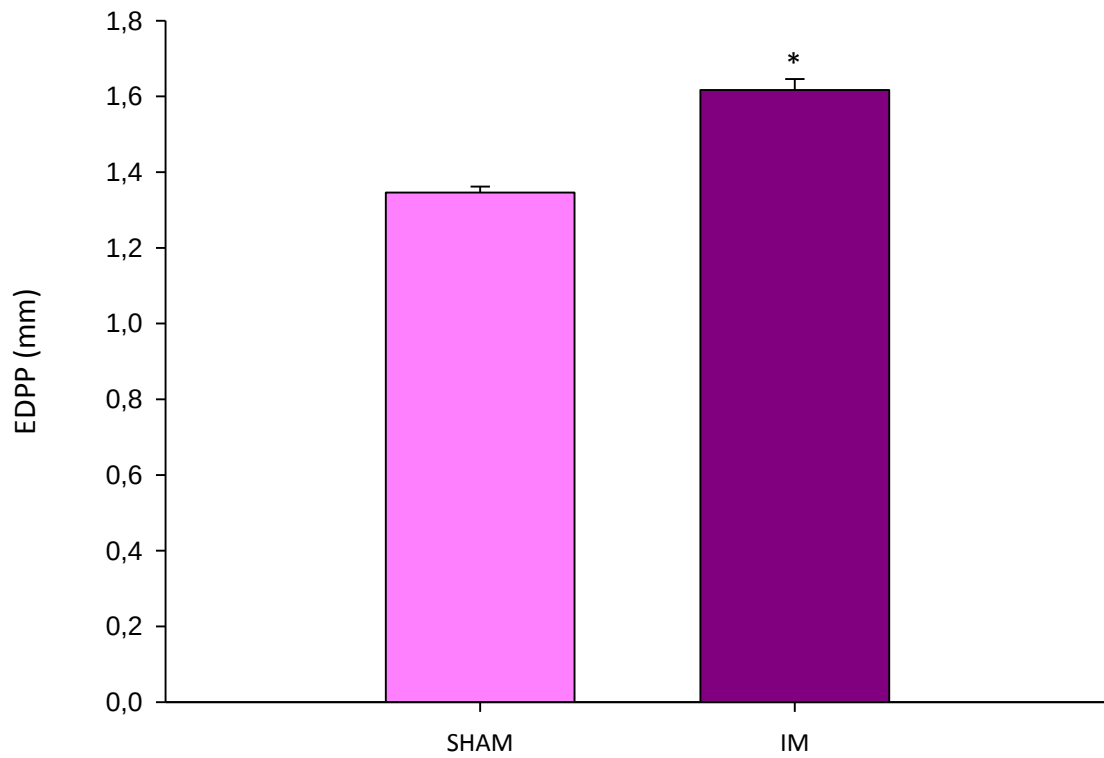
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE: Ventrículo esquerdo; DSVE: Diâmetro sistólico do VE; IM: infarto. $*=p<0,001$.

Figura 5. Diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal.



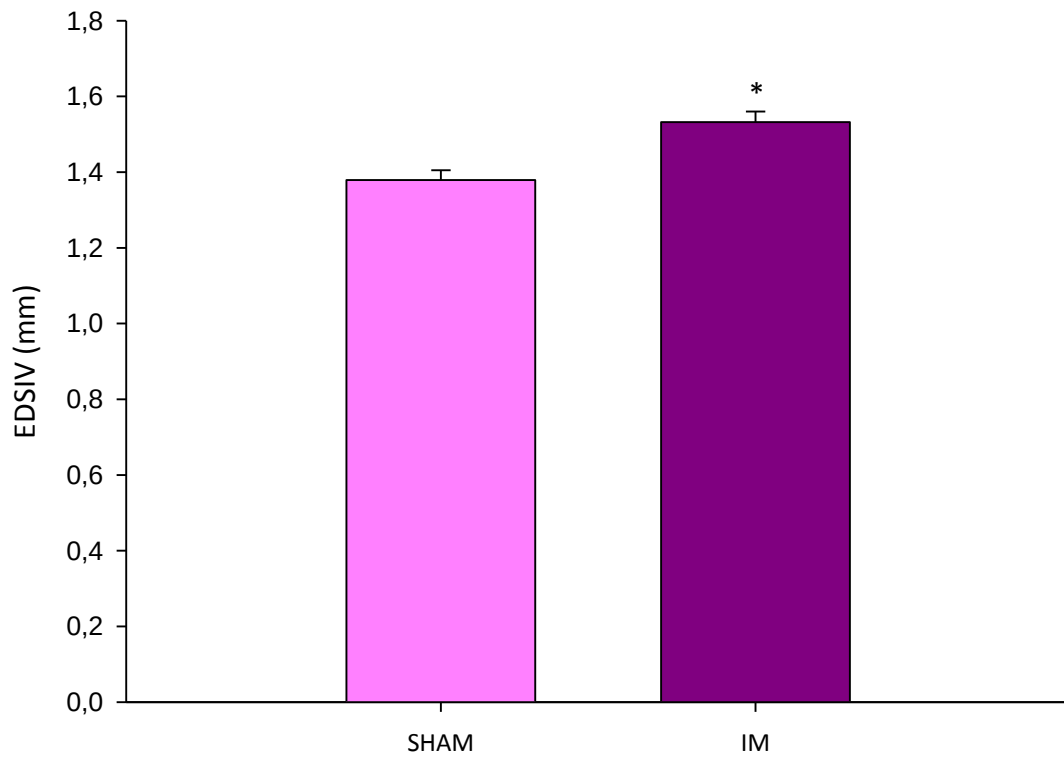
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE: Ventrículo esquerdo; DDVE/PC: Diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal; IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 6. Espessura diastólica da parede posterior do VE.



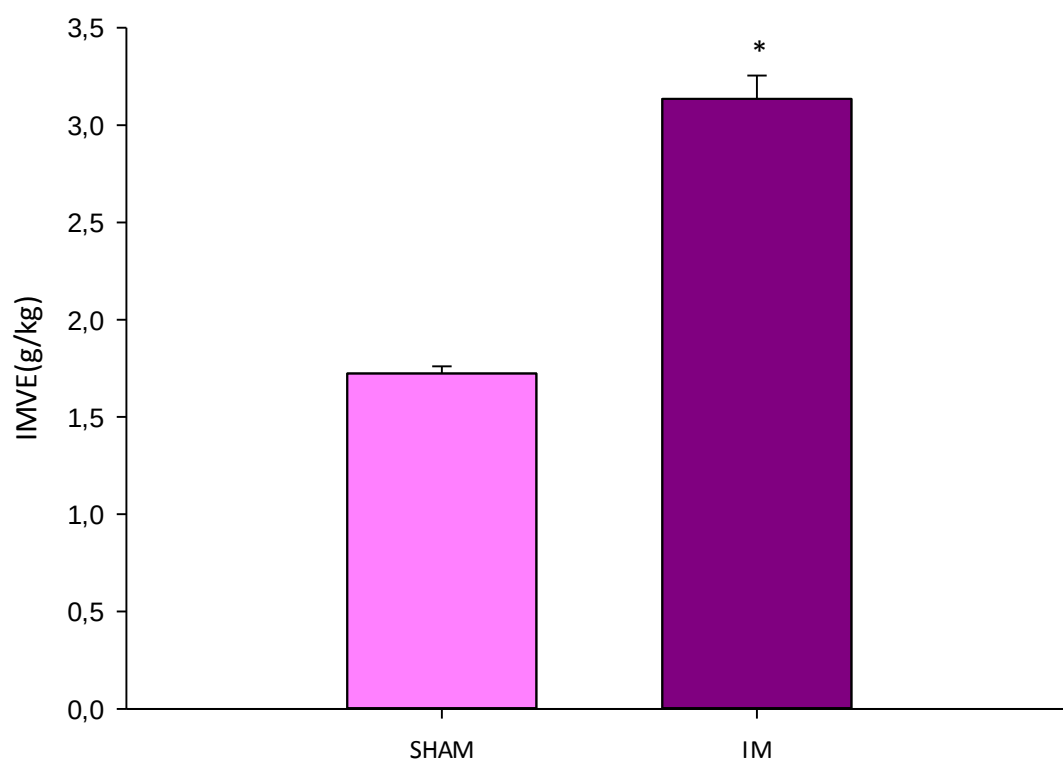
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE: Ventrículo esquerdo; EDPP: Espessura diastólica da parede posterior do VE; IM: infarto. $*=p<0,005$.

Figura 7. Espessura diastólica do septo interventricular.



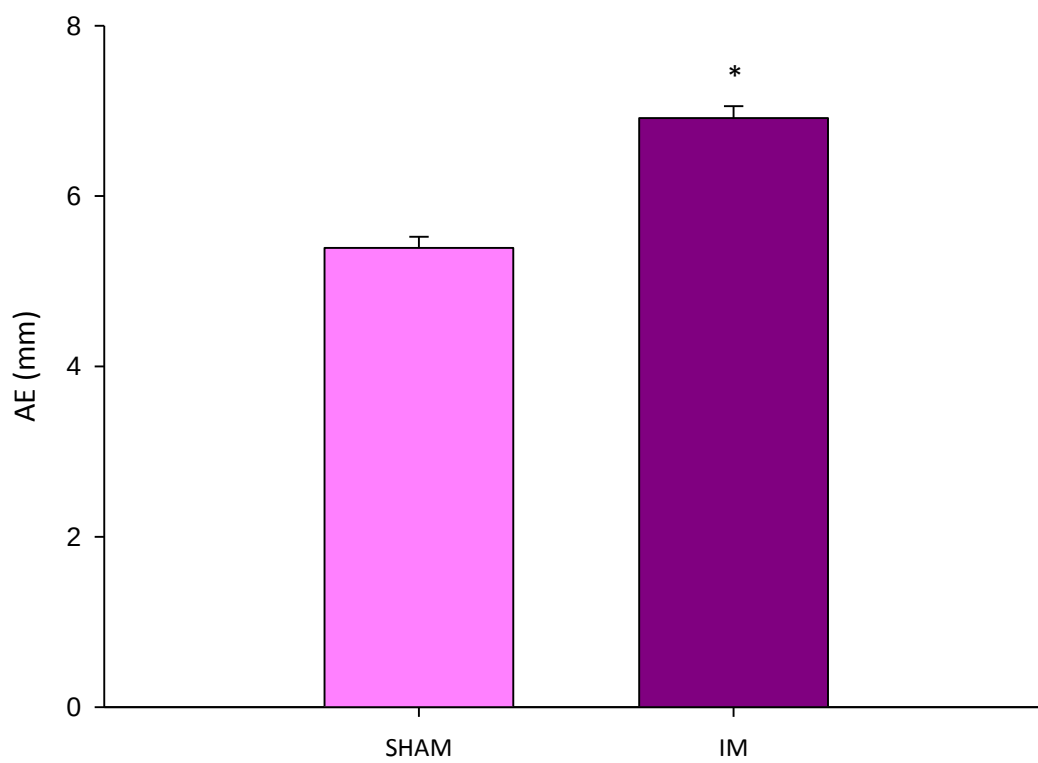
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE: Ventrículo esquerdo; EDSIV: Espessura diastólica do septo interventricular; IM: infarto. $*=p<0,005$.

Figura 8. Índice de massa do VE.



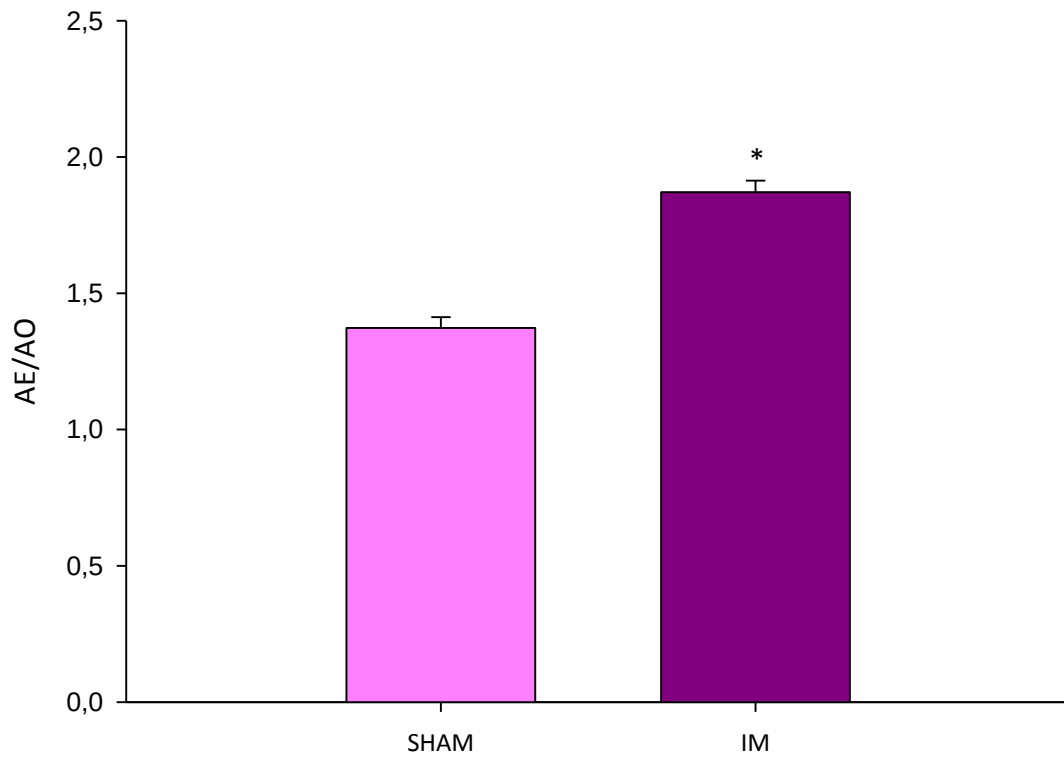
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 9. Diâmetro do átrio esquerdo.



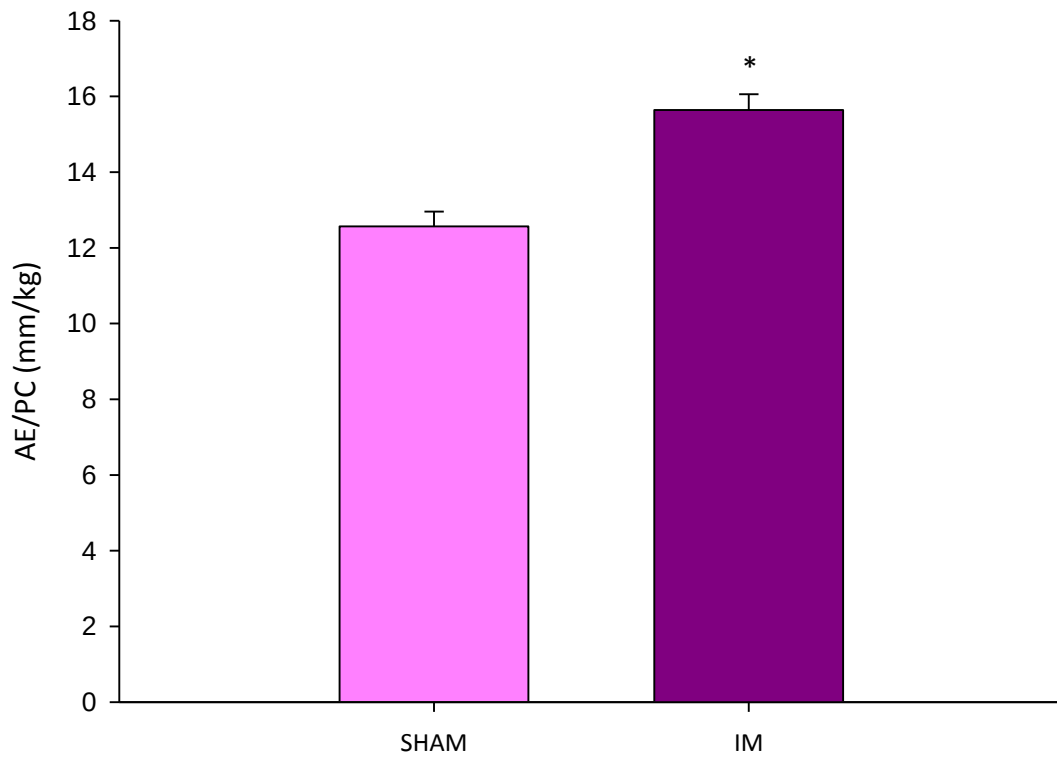
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. AO: Diâmetro do átrio esquerdo; IM: infarto. *=p<0,005.

Figura 10. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta.



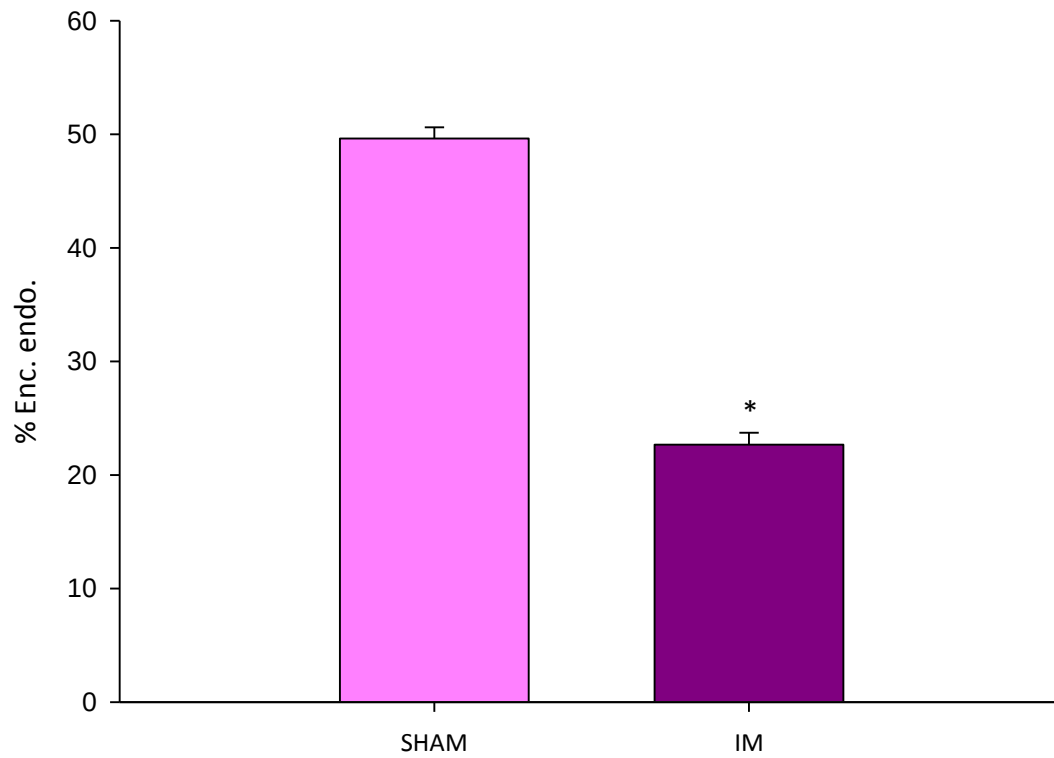
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. AE/AO: Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta; IM: infarto. *= $p < 0,005$.

Figura 11. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal.



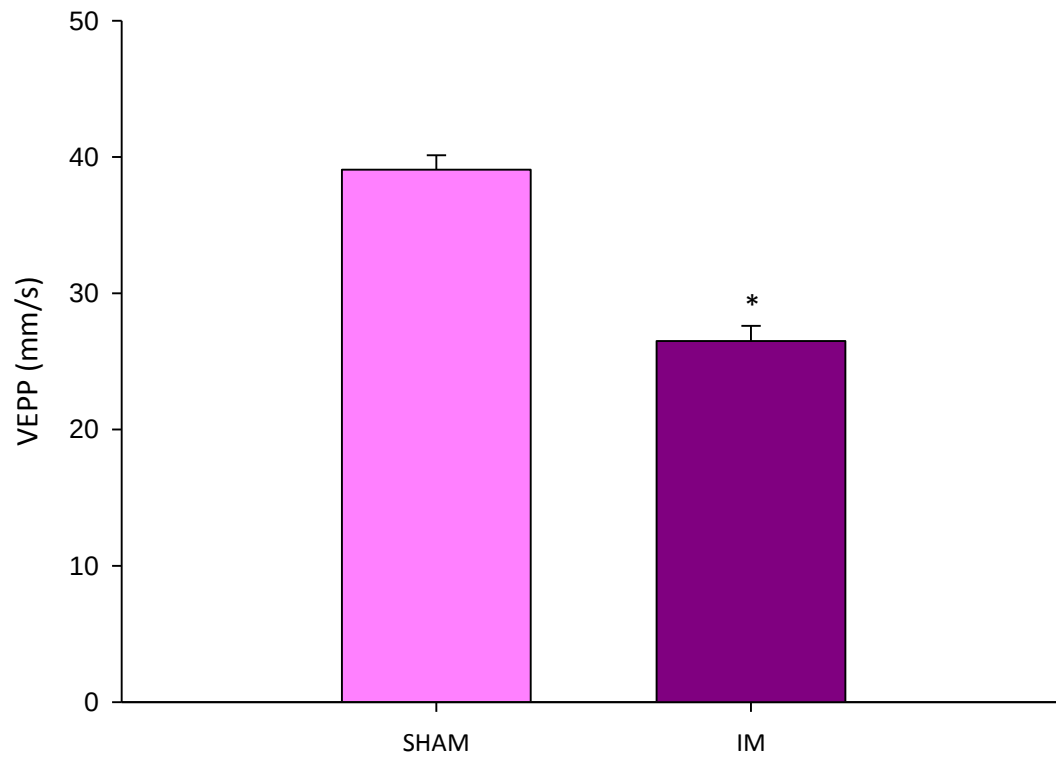
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. AE/PC: Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; IM: infarto. * $p=0,005$.

Figura 12. Porcentagem de encurtamento endocárdico.



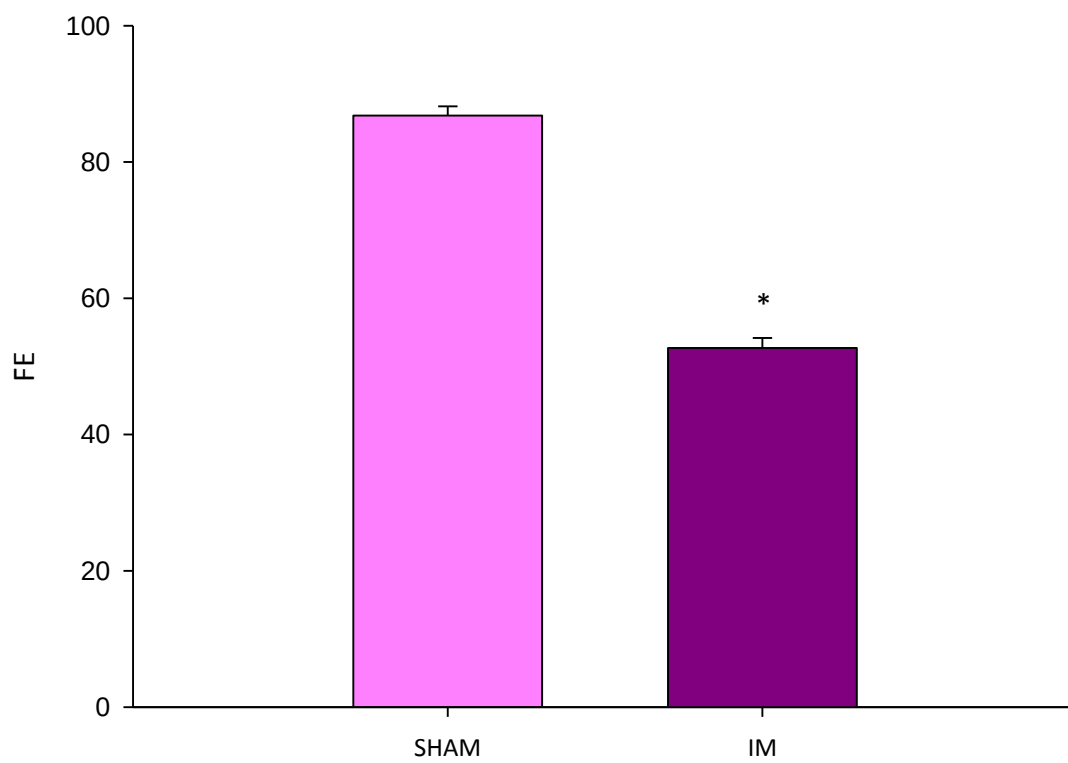
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. % Enc. endo: Porcentagem de encurtamento endocárdico; IM: infarto. $*=p<0,001$.

Figura 13. Velocidade de encurtamento da parede posterior do VE.



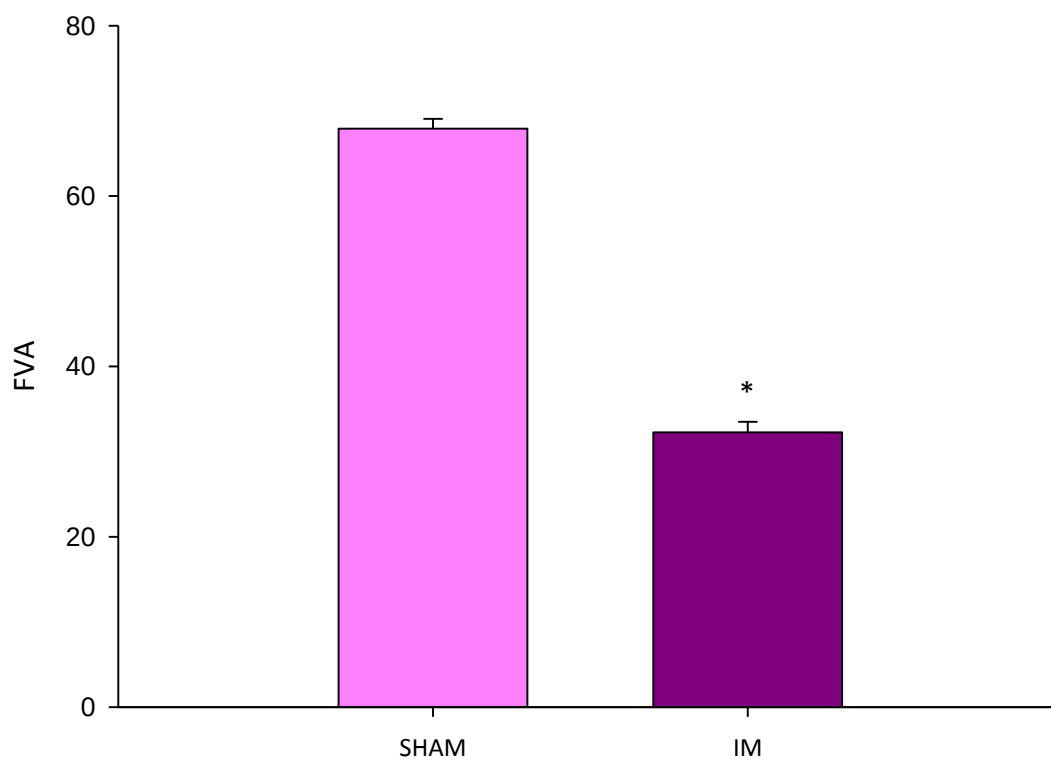
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE: Ventrículo esquerdo; VEPP: Velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; IM: infarto. $*=p<0,001$.

Figura 14. Fração de ejeção do VE.



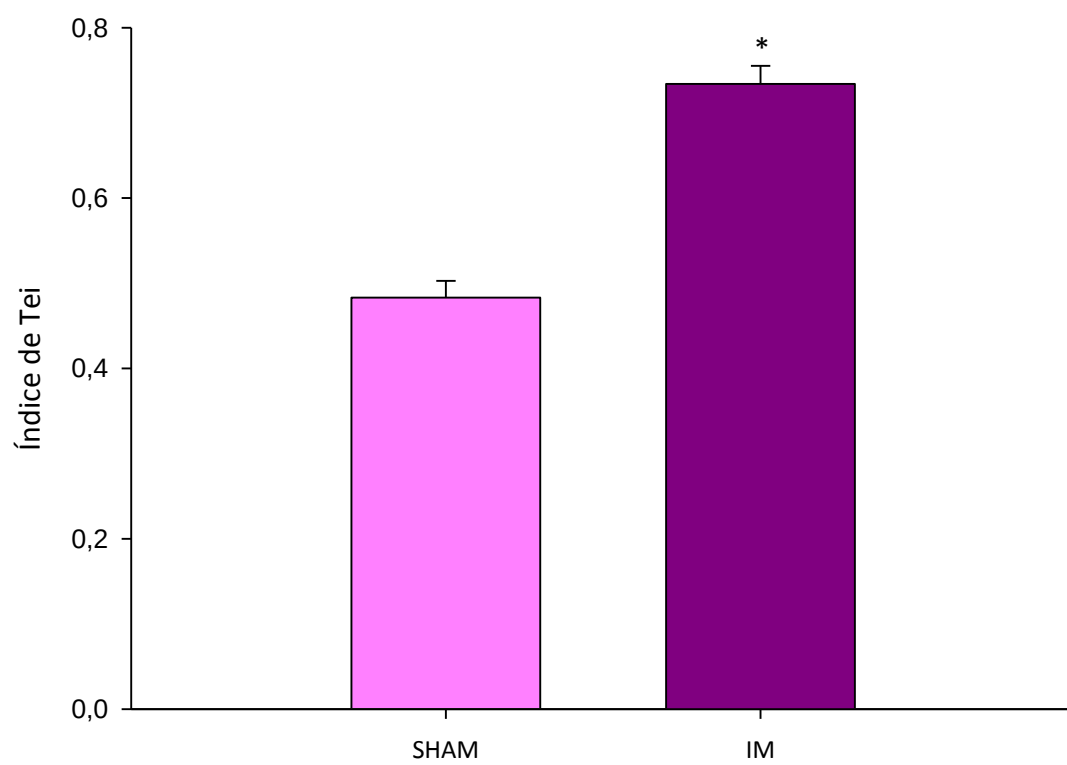
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. FE: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 15. Fração de variação da área do VE.



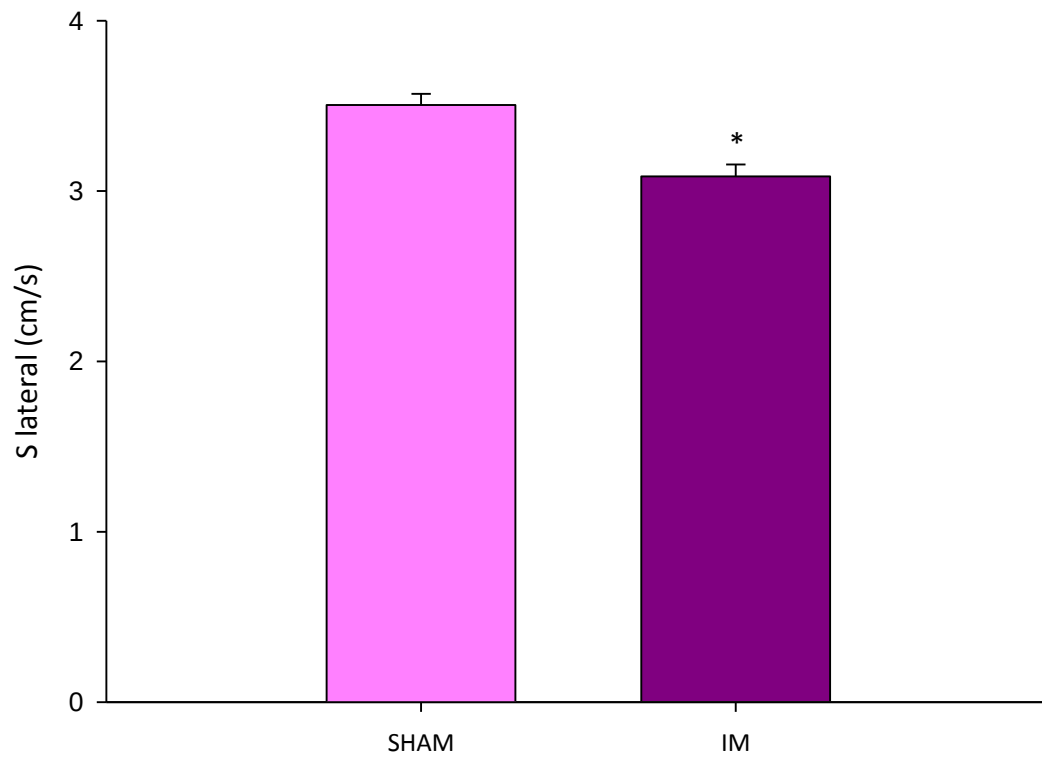
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE: Ventrículo esquerdo; FAV: Fração de variação da área do VE; IM: infarto. $*=p<0,005$.

Figura 16. Índice de Tei ou índice de performance miocárdica.



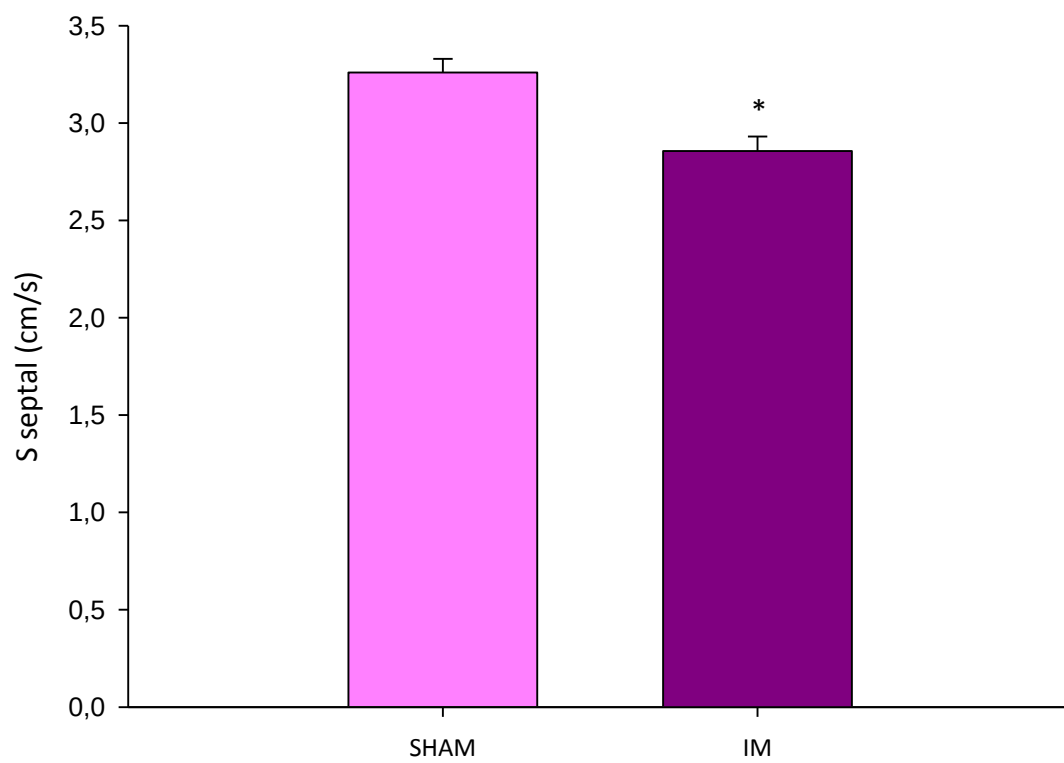
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 17. Onda sistólica do anel mitral lateral.



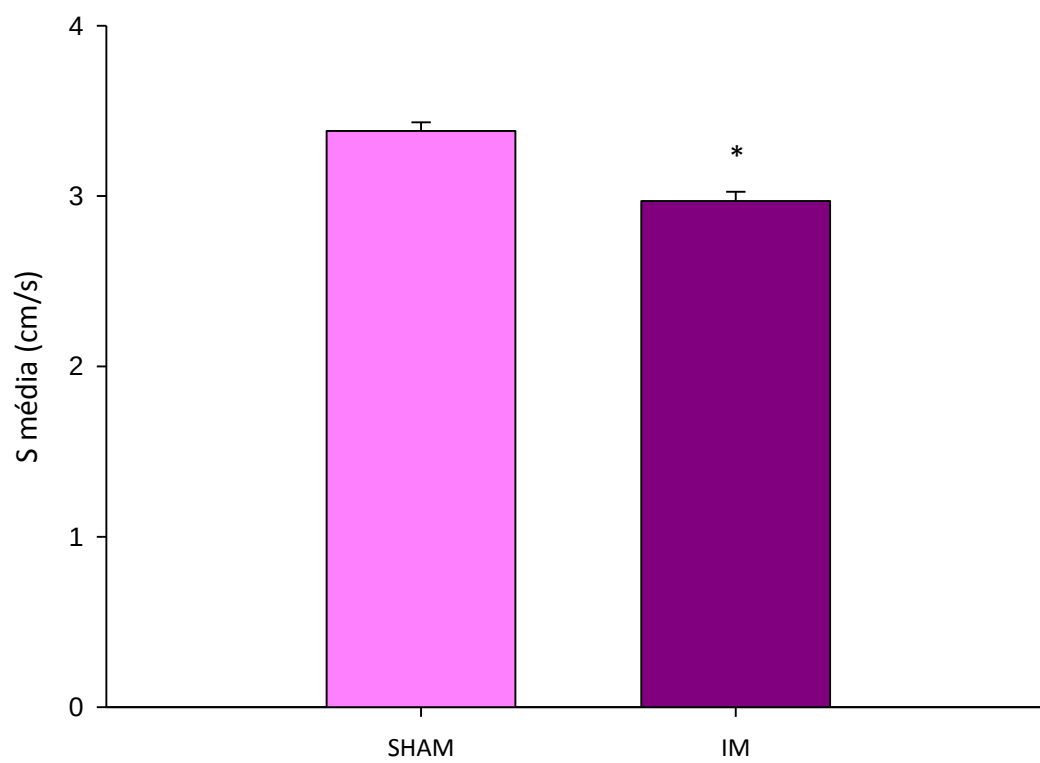
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. S lateral: Onda sistólica do anel mitral lateral; IM: infarto. *p=0,045.

Figura 18. Onda sistólica do anel mitral septal.



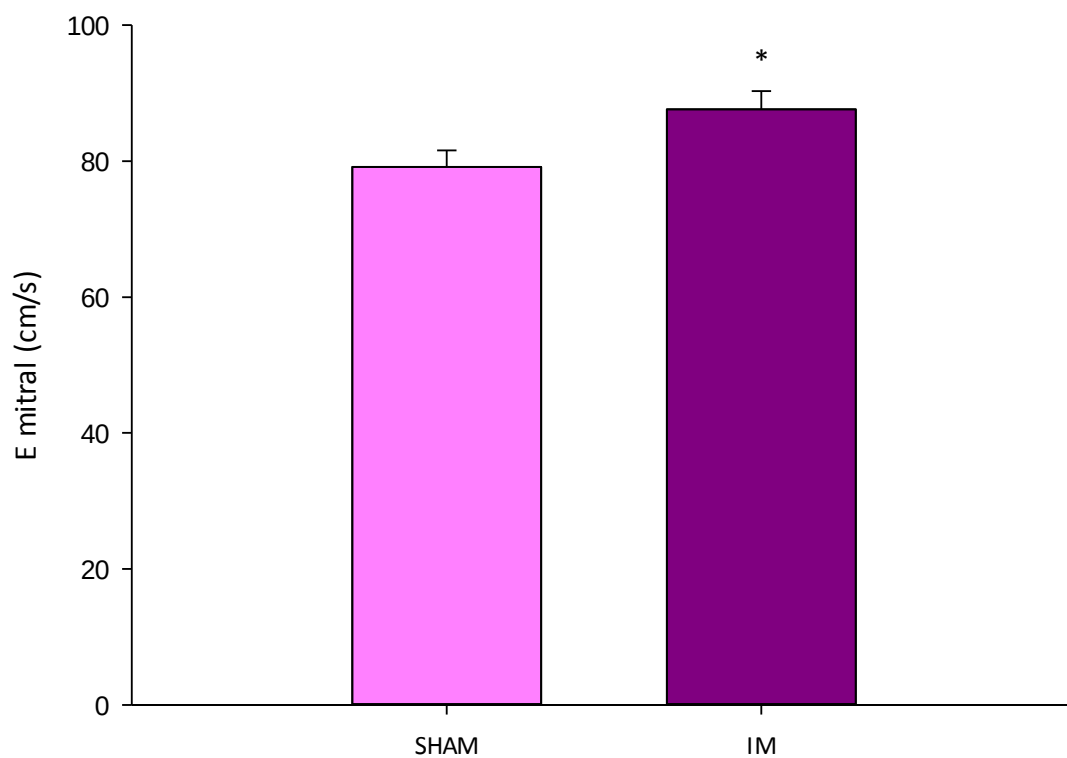
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. S septal: Onda sistólica do anel mitral septal; IM: infarto. *=p<0,001.

Figura 19. Média da onda sistólica do anel mitral lateral e septal.



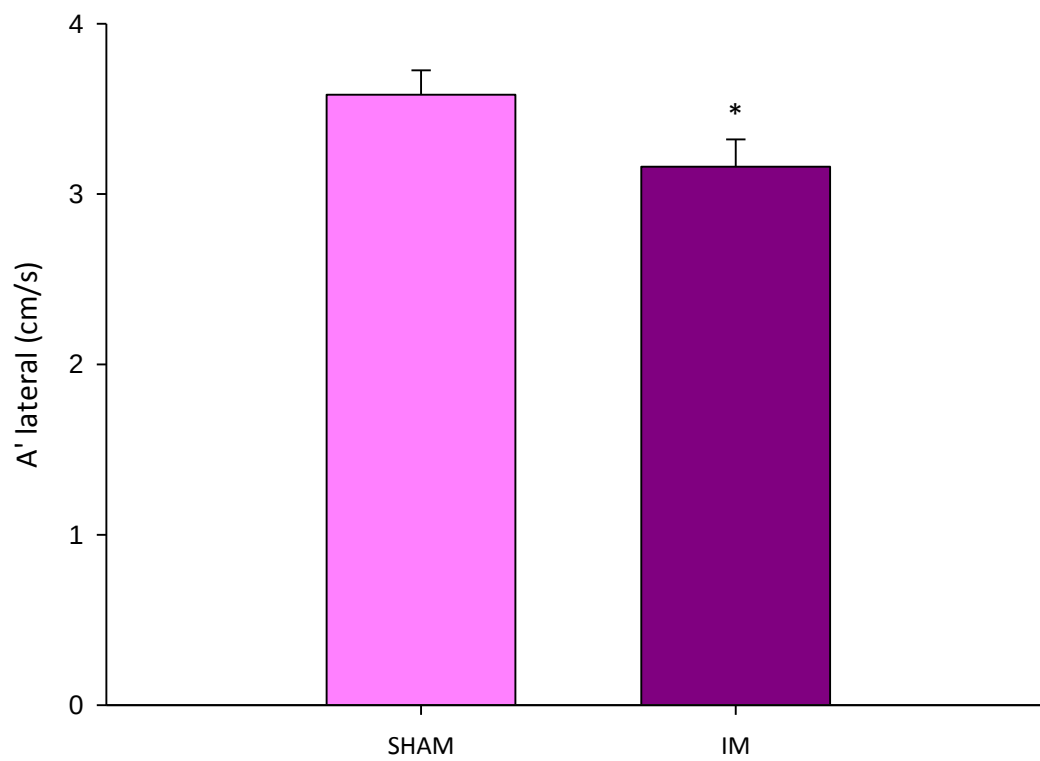
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 20. Onda E do fluxo transmitral.



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. E mitral: Onda E do fluxo transmitral; IM: infarto. *p=0,03.

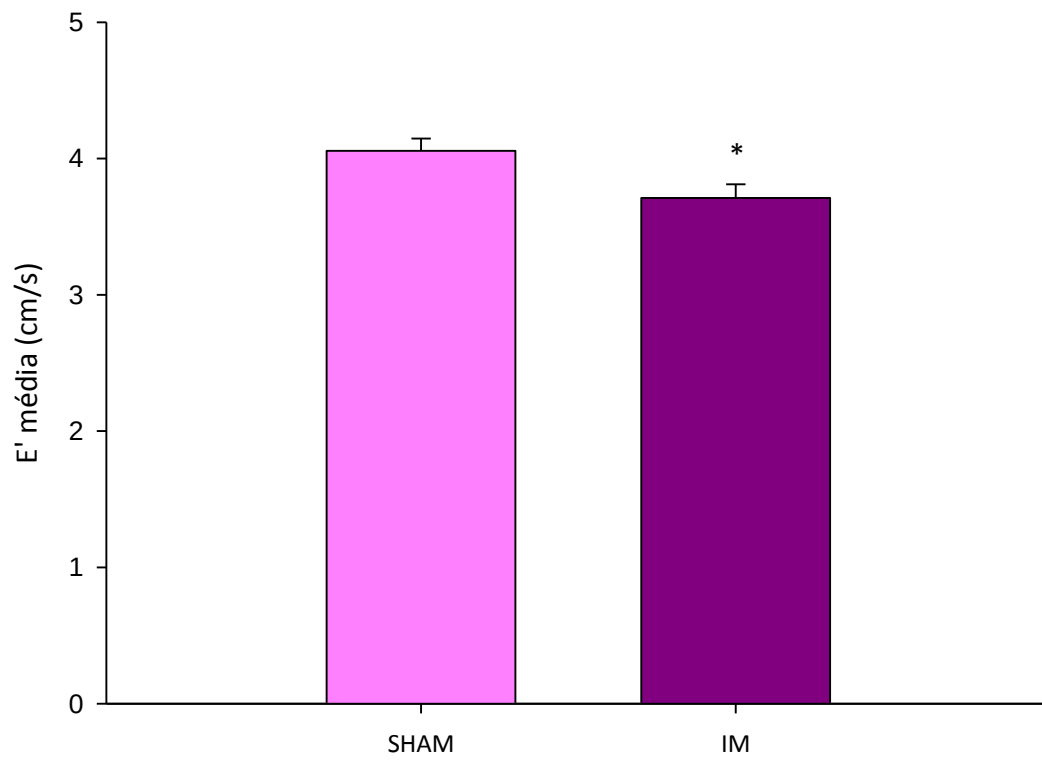
Figura 21. Onda diastólica tardia do anel mitral lateral.



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. A' lateral: Onda diastólica tardia do anel mitral lateral; IM: infarto.

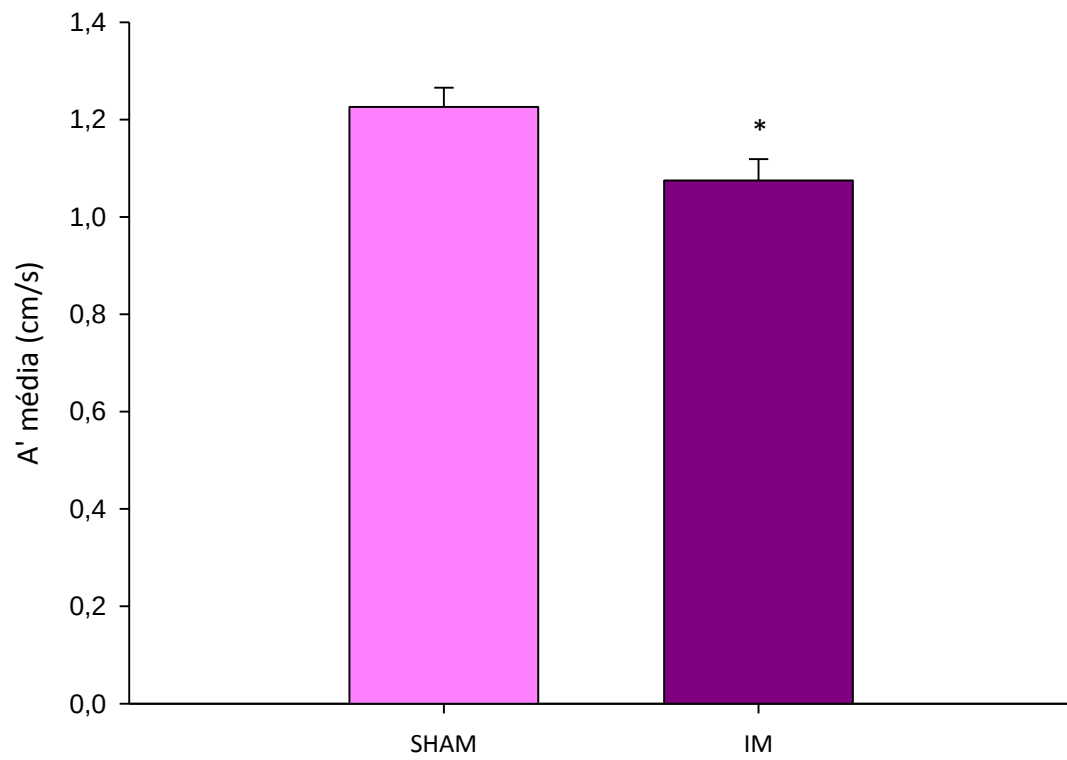
*p=0,026.

Figura 22. Média da onda diastólica inicial do anel mitral lateral e septal (função diastólica realizada por meio do ecocardiograma).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *p=0,012.

Figura 23. Média da onda diastólica tardia do anel mitral lateral e septal (função diastólica realizada por meio do ecocardiograma).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *p=0,013.

Estudo morfométrico do ventrículo direito e esquerdo, átrio direito e esquerdo

Os resultados obtidos no estudo morfométrico estão representados na Tabela 6.

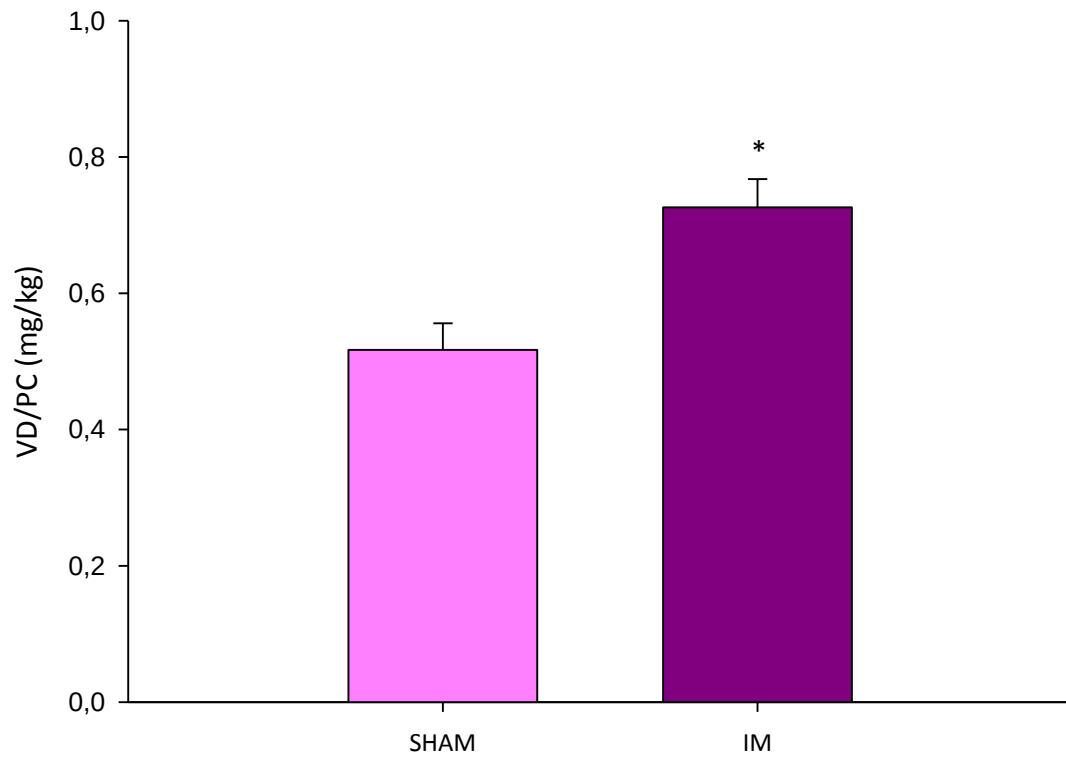
O infarto apresentou maior peso do VD e VE corrigidos pelo peso corporal (Figuras 24 e 25). Não observamos influência da suplementação de polpa de açaí no estudo morfológico no coração sem agressão. Assim como não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí. Em relação à influência da suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, não apresentaram diferenças nas variáveis morfométricas no coração infartado.

Tabela 6. Estudo morfométrico dos tecidos.

Variável	SA0(n=13)	SA2(n=13)	SA5(n=14)	IA0(n=11)	IA2(n=12)	IA5(n=12)	p(I)	p(A)	p(IxA)
*VD/PC (mg/kg)	0,48±0,03	0,55±0,07	0,52±0,03	0,73±0,10	0,75±0,11	0,70±0,05	<0,001¹	0,436	0,803
*VE/PC (mg/kg)	1,81±0,04	1,83±0,09	1,73±0,08	2,02±0,05	1,96±0,09	1,83±0,12	0,012¹	0,287	0,757
#A/PC (mg/kg)	0,12±0,01	0,17±0,03	0,13±0,01	0,53±0,27	0,19±0,03	0,22±0,03	0,150	0,453	0,522

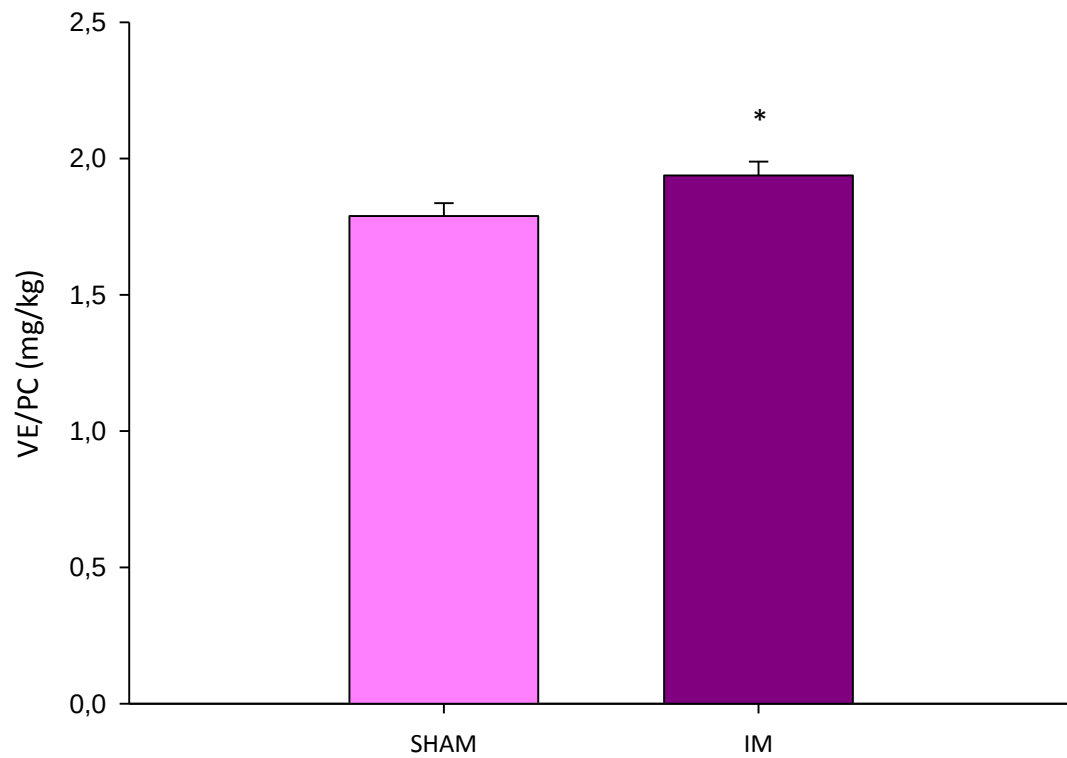
Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. #foi realizado teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. VD: ventrículo direito; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo. O peso do tecido (mg) foi normalizado pelo peso corporal (kg).

Figura 24. Ventrículo direito normalizado pelo peso corporal em kg (estudo morfométrico).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VD/PC: ventrículo direito normalizado pelo peso corporal; IM: infarto. $*=p<0,001$.

Figura 25. Ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal em kg (estudo morfométrico).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. VE/PC: ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal; IM: infarto. * $p=0,012$.

Análise histológica do miocárdio do ventrículo esquerdo

O resultado obtido na análise histológica está representado na Tabela 7.

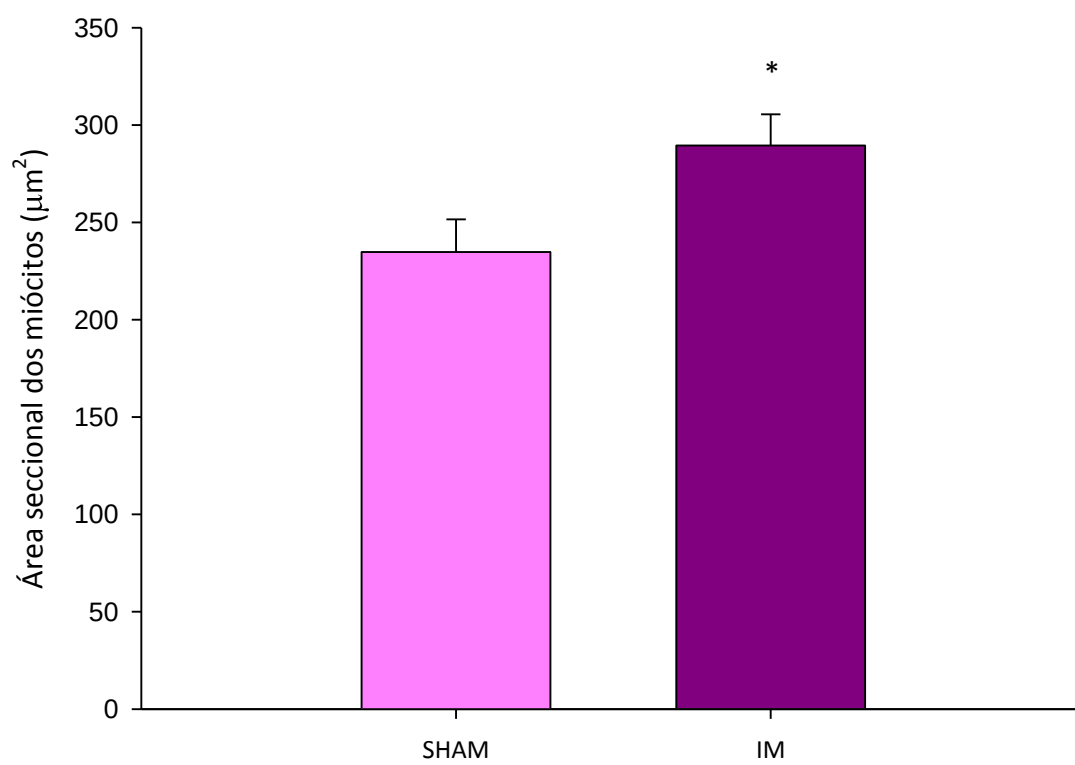
O infarto apresentou maior área seccional dos miócitos (Figura 26). Não observamos influência da suplementação de polpa de açaí no estudo morfológico no coração sem agressão. Assim como não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí. Em relação à influência da suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, não apresentaram diferenças na análise histológica no coração infartado.

Tabela 7. Análise histológica no miocárdio do VE.

Variável	SA0 (n=8)	SA2(n=8)	SA5(n=8)	IA0(n=8)	IA2(n=8)	IA5(n=7)	p(I)	p(A)	p(IxA)
Área seccional dos miócitos (μm^2)	207±34,4	252±26,7	245±25,3	304±27,8	275±30,0	289±27,6	0,027¹	0,923	0,422

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham.

Figura 26. Área seccional dos miócitos (análise histológica).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *p=0,027.

Avaliação do estresse oxidativo cardíaco no miocárdio do ventrículo esquerdo

Os resultados para a avaliação bioquímica do estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 8.

O infarto apresentou maior concentração de hidroperóxido de lipídeo e malondialdeído (Figuras 27 e 28), maior atividade de superóxido dismutase (Figura 29), além de menor atividade da glutathione peroxidase e de expressão de Nrf-2 (Figuras 30 e 31).

Não foi observado influência da suplementação de polpa de açaí no coração sem agressão em relação ao estresse oxidativo. Não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí.

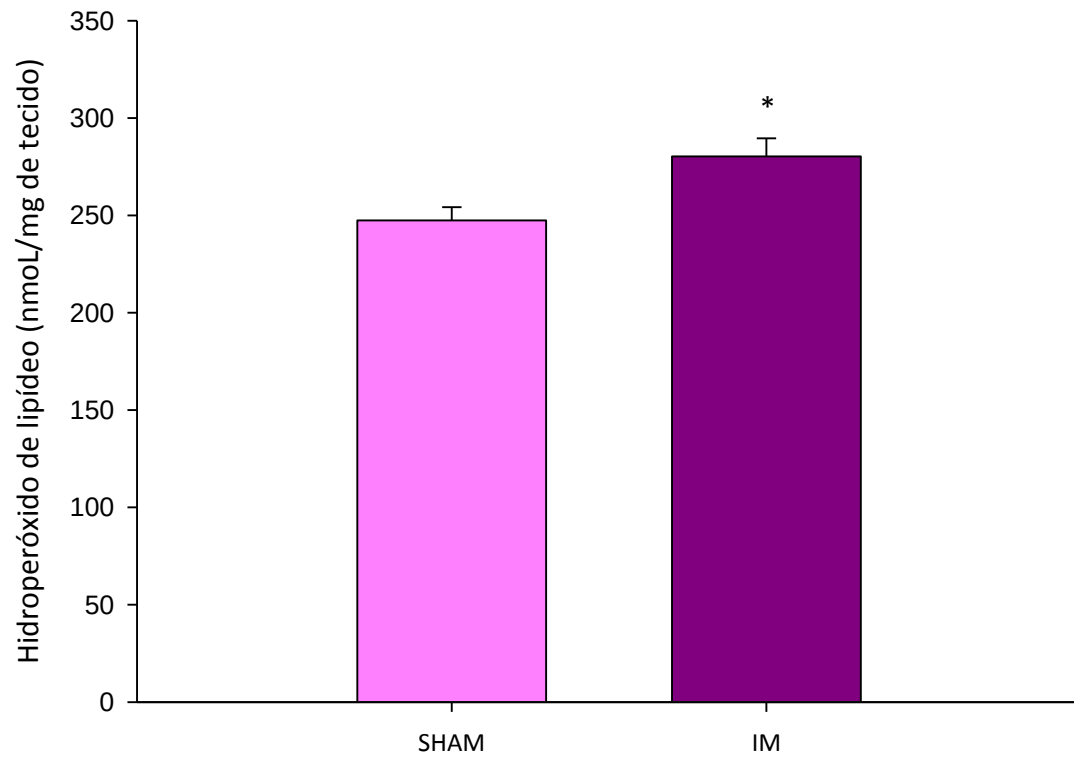
Em relação à suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, os grupos IA5 e IA2 apresentaram menor concentração de malondialdeído em comparação ao grupo IA0 (Figura 32). Também foi observado menor atividade de superóxido dismutase no grupo IA5 em comparação com o grupo IA2 e IA0 (Figura 33). Assim, a suplementação de polpa de açaí parece ter resposta dose dependente, sendo possível observar menor concentração de malondialdeído e atividade de superóxido dismutase com o aumento da suplementação.

Tabela 8. Lipoperoxidação e atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no miocárdio do VE.

Variável	SA0	SA2	SA5	IA0	IA2	IA5	p(I)	p(A)	p(IxA)
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)			
*Hidroperóxido de lipídeo (nmol/mg)	250±10,9	241±13,5	251±11,9	301±15,0	286±15,2	254±15,4	0,004¹	0,251	0,169
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)			
MDA tecido (µmol/g)	0,35±0,05 ^a	0,36±0,03 ^b	0,31±0,04	1,32±0,25 ^{a,A,C}	0,77±0,12 ^{b,A}	0,61±0,12 ^C	<0,001	0,013	0,023
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)			
MDA soro (µmol/L)	1,14±0,04	1,26±0,10	1,40±0,10	1,22±0,18	1,16±0,09	1,11±0,11	0,259	0,798	0,27
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)			
Catalase (µmol/mg)	64,5±4,23	59,1±5,11	56,6±4,04	47,8±3,17	61,0±3,62	60,5±7,0	0,351	0,709	0,065
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)			
SOD (nmol/mg)	7,06±0,36 ^a	7,34±0,36 ^b	7,59±0,31	8,95±0,38 ^{a,C}	8,74±0,54 ^{b,B}	6,90±0,41 ^{B,C}	0,011	0,095	0,006
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)			
GPx (nmol/mg)	45±3,1	43,9±1,87	45,6±1,82	34,6±1,44	39,9±2,31	43,6±2,92	0,006¹	0,133	0,179
(n)	(8)	(8)	(7)	(6)	(8)	(8)			
Nrf-2 (unidade arbitrária)	1,45±0,31	1,48±0,39	1,21±0,38	1,05±0,34	0,66±0,18	0,75±0,16	0,029¹	0,674	0,760

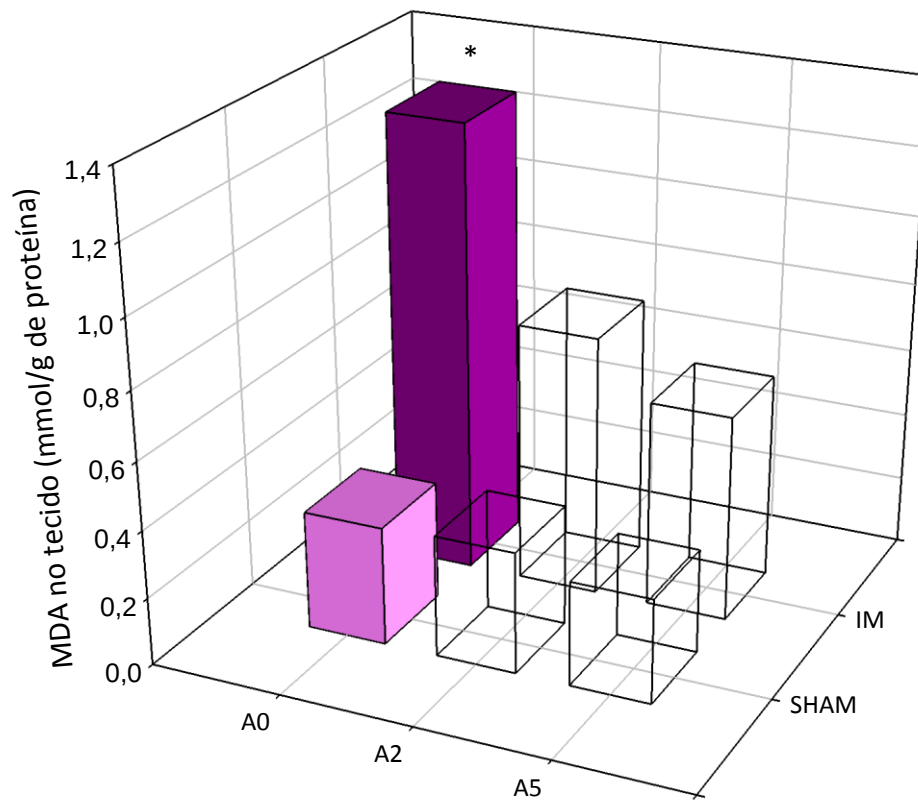
Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. MDA: malondialdeído; GPx: glutathione peroxidase; SOD: superóxido dismutase; Nrf-2: fator nuclear eritróide 2. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos = comparação para o fator Infarto: (a—Infarto ≠ Sham entre os grupos A0; b—Infarto ≠ Sham entre os grupos A2); comparações para o fator Açaí: (A—A0≠A2 entre os grupos infartados; B—A2≠A5 entre os grupos infartados; C—A0≠A5 entre os grupos infartados).

Figura 27. Hidroperóxido de lipídeo no miocárdio do VE (bioquímica).



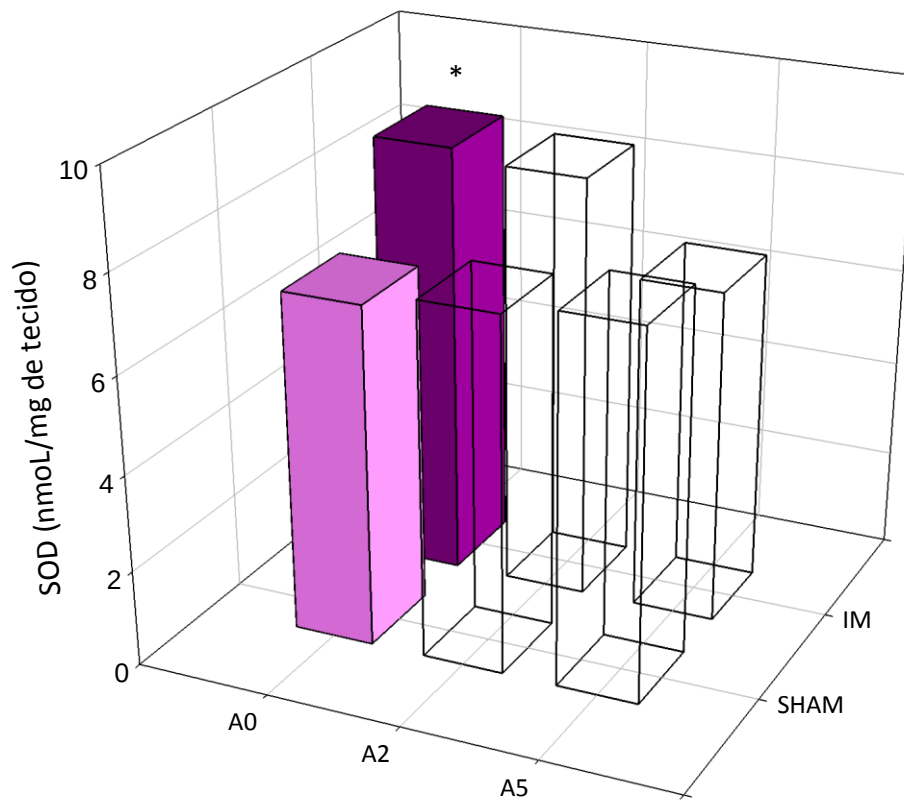
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. * $p=0,004$.

Figura 28. Atividade de malondialdeído no miocárdio do VE (HPLC).



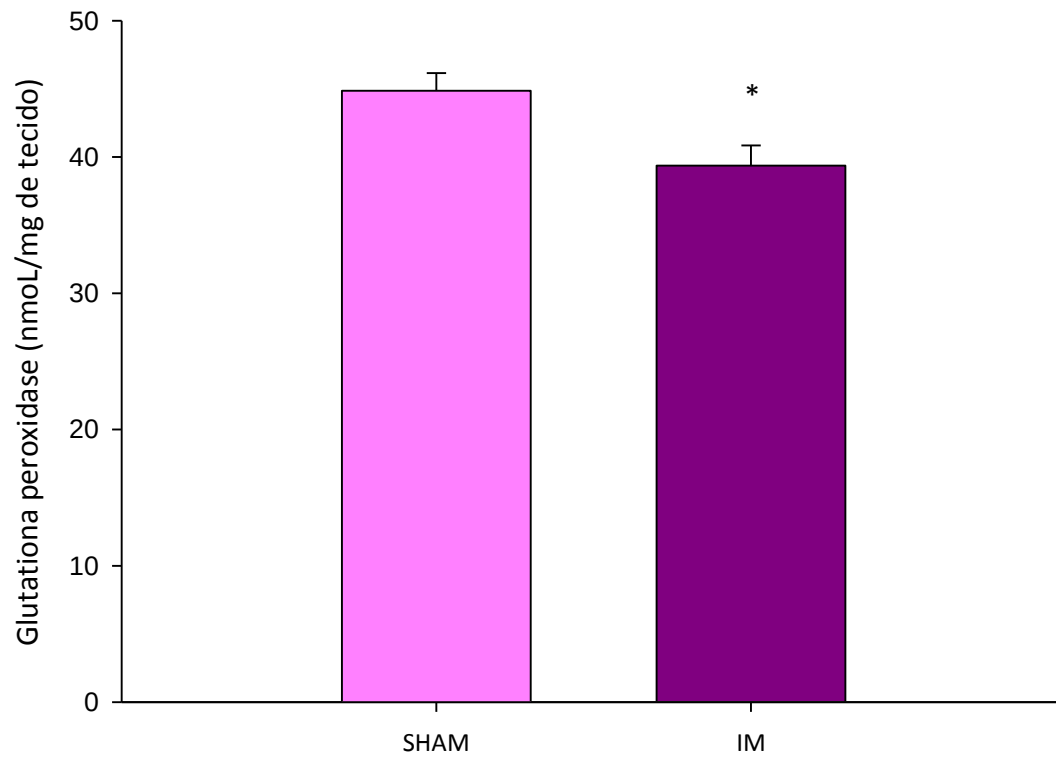
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. MDA: Malondialdeído; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,001$.

Figura 29. Atividade de superóxido dismutase no miocárdio do VE (bioquímica).



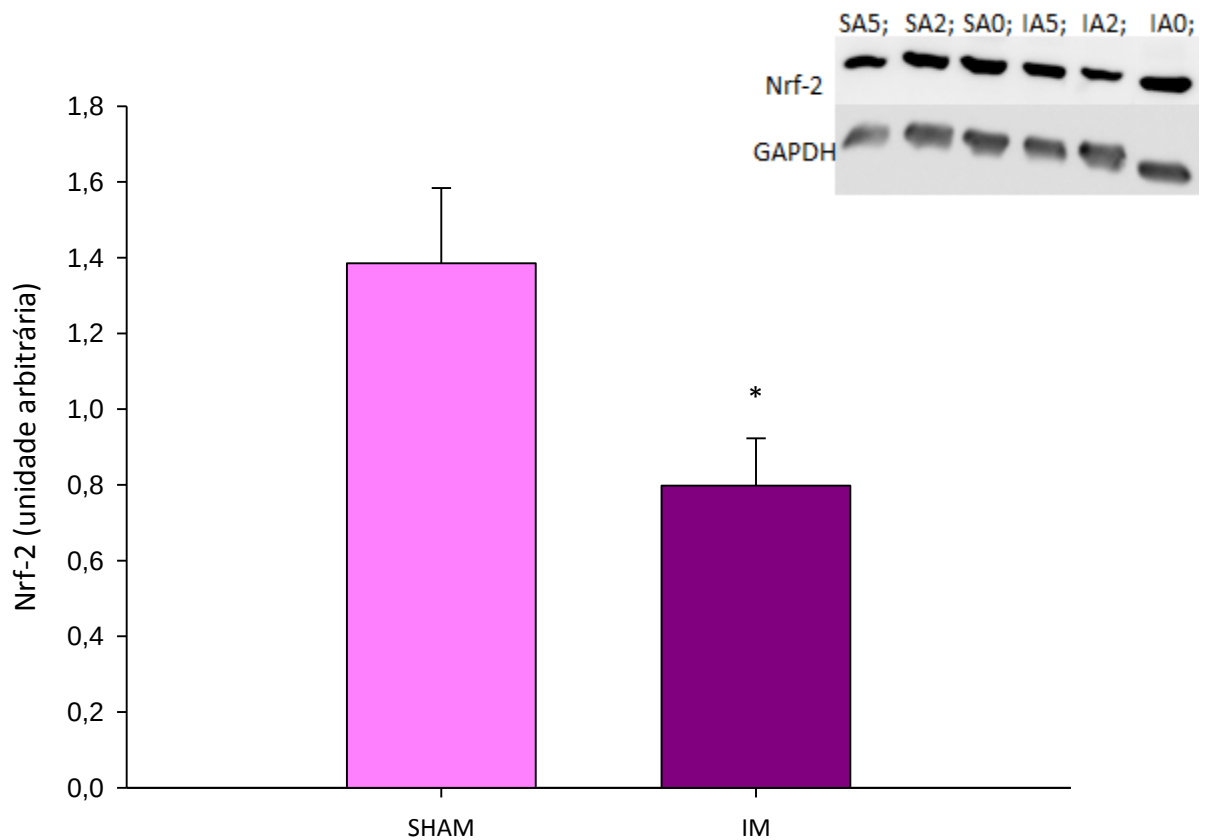
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SOD: Superóxido dismutase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. * $p=0,011$.

Figura 30. Atividade da glutathiona peroxidase no miocárdio do VE (bioquímica).



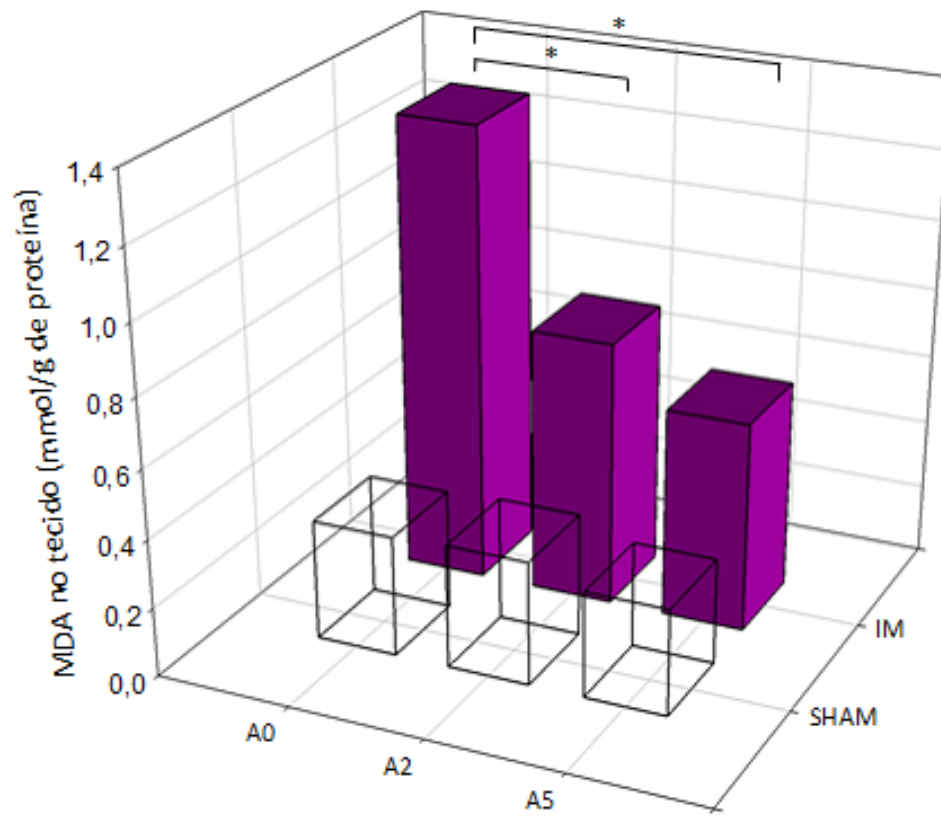
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *p=0,006.

Figura 31. Expressão proteica do fator nuclear eritróide 2 no miocárdio do VE (Western Blot).



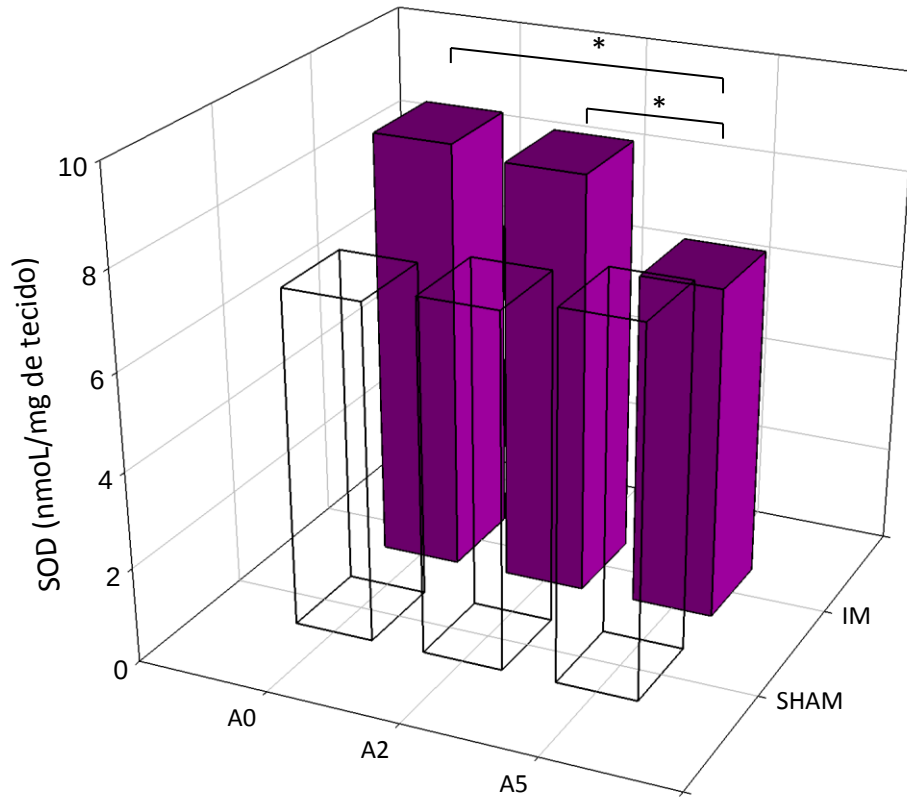
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí. Nrf-2: Fator nuclear eritróide 2; IM: infarto. * $p=0,029$. A figura no topo à direita representa as bandas do Nrf-2 57KDa sobre as bandas do GAPDH fotografadas.

Figura 32. Atividade de malondialdeído no miocárdio do VE (HPLC).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. MDA: Malondialdeído; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. * $p=0,023$.

Figura 33. Atividade de superóxido dismutase no miocárdio do VE (bioquímica).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SOD: Superóxido dismutase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. * $p=0,006$.

Avaliação do metabolismo energético cardíaco no miocárdio do ventrículo esquerdo

Os resultados da avaliação das enzimas do metabolismo energético cardíaco e dos complexos mitocondriais estão apresentados na Tabela 9.

O infarto apresentou menor atividade do complexo piruvato desidrogenase e da citrato sintase (Figuras 34 e 35), menor atividade do Complexo I e II da cadeia respiratória (Figuras 36 e 37). Também observamos menor atividade da ATP sintase e de β -OH-acil CoA-DH (Figuras 38 e 39) e maior atividade do LDH e (Figura 40).

Não observamos influência da suplementação de polpa de açaí no metabolismo energético no coração sem agressão. Nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados, os animais suplementados com 5% de polpa de açaí apresentaram menor atividade de ATP sintase e maior atividade de β -OH-acil CoA-DH em relação aos animais suplementados com 2% de polpa de açaí e os animais sem suplementação (Figuras 41 e 42). Também observamos que os animais suplementados com 2% e 5% de polpa de açaí apresentaram maior concentração de complexo piruvato desidrogenase e de citrato sintase e em relação aos animais sem suplementação (Figuras 43 e 44). Assim, a suplementação de polpa de açaí parece exercer papel dose dependente no metabolismo energético. Observamos maior atividade de β -OH-acil CoA-DH e menor a atividade de ATP sintase, maior citrato sintase e maior complexo piruvato desidrogenase, com o aumento da dose de suplementação de polpa de açaí.

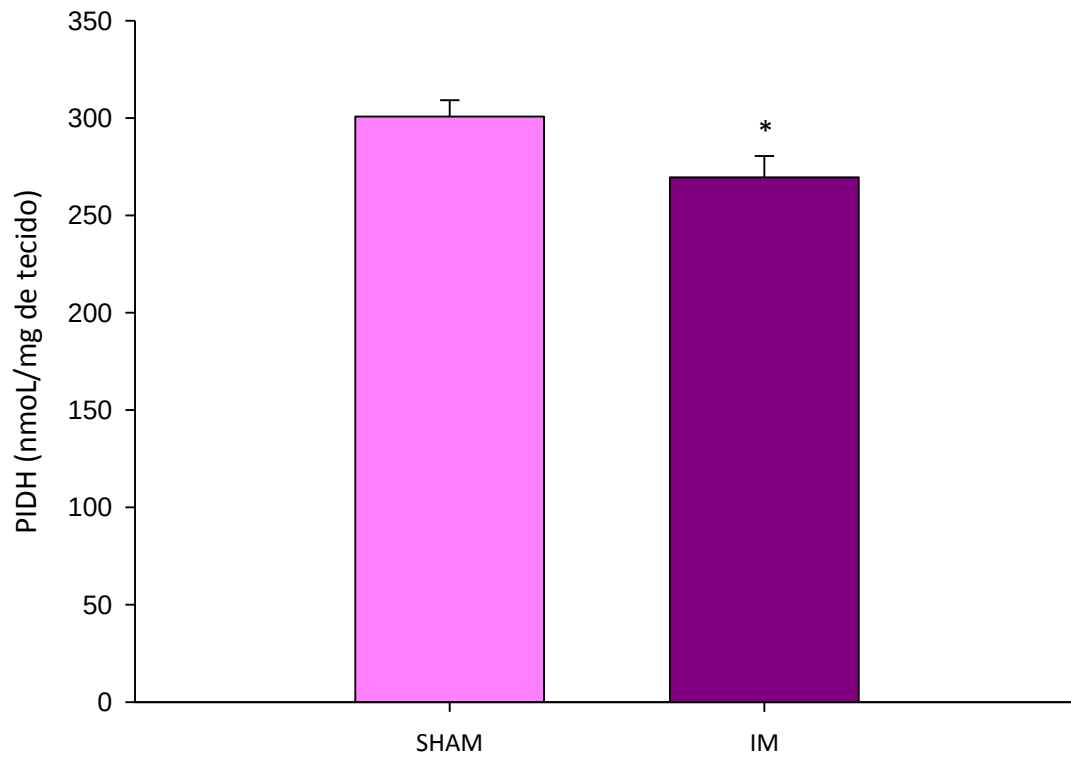
Em relação à suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, o grupo IA5 apresentou maior atividade do Complexo I da cadeia respiratória em comparação ao grupo IA2 e o grupo IA0 (Figura 45). Além disso, os grupos IA5 e IA2 apresentaram menor atividade do LDH em comparação ao grupo IA0 (Figura 46). Desta forma, a suplementação de polpa de açaí nos animais infartados parece exercer papel dose dependente, a maior atividade do Complexo I e menor atividade de LDH ocorrem quando aumenta a suplementação.

Tabela 9. Atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco e dos complexos mitocondriais.

Variável (nmol/g)	SA0(n=8)	SA2(n=8)	SA5(n=8)	IA0(n=8)	IA2(n=8)	IA5(n=8)	p(I)	p(A)	p(IxA)
#Fosfotruquinase	143±5,94	141±9,22	133±9,13	155±4,66	152±5,42	143±9,23	0,129	0,939	0,447
Complexo piruvato desidrogenase	286±12,1	300±15,5	317±15,5	218±15,4	293±15,6	298±11,4	0,011¹	<0,001²	0,085
*Citrate sintase	86,3±8,15	108±10,2	131±9,87	51,8±2,37	62,6±5,27	62,6±3,95	<0,001¹	0,002²	0,291
*Complexo I	5,19±0,07 ^a	4,99±0,14 ^b	5,11±0,10	3,39±0,29 ^{a,C}	3,37±0,35 ^{b,B}	4,78±0,22 ^{B,C}	<0,001	0,015	0,015
Complexo II	5,54±0,34	4,66±0,34	4,73±0,31	3,09±0,16	2,99±0,18	3,48±0,25	<0,001¹	0,208	0,094
ATP sintase	37,4±0,91	35,9±1,16	31,4±1,39	20,6±1,01	21,9±1,06	20,1±0,98	<0,001¹	0,007²	0,054
β-OH-acil CoA-DH	33,1±2,02	33,6±1,87	37,2±1,54	20,2±1,45	19±1,6	24,6±1,41	<0,001¹	0,014²	0,823
#Lactato desidrogenase	70,3±2,66 ^a	81,1±7,27	65,6±6,42	139±6,39 ^{a,A,C}	70,1±1,77 ^A	65,4±2,16 ^C	<0,005	0,88	<0,005

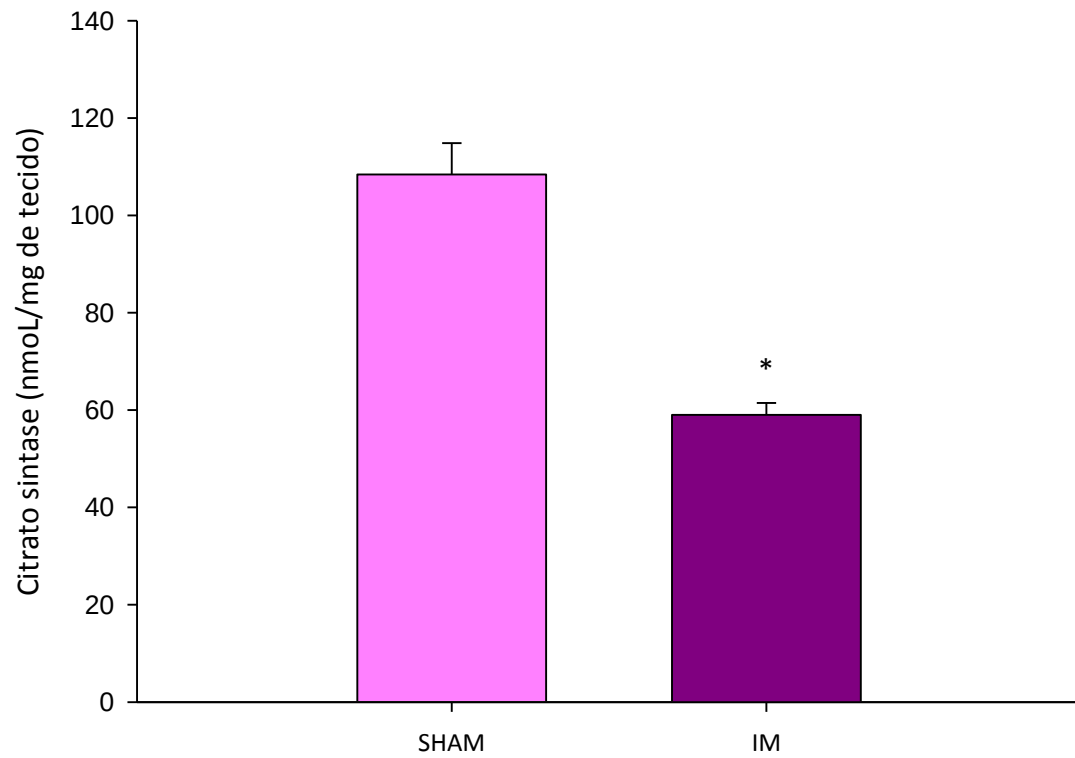
Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. #foi realizado teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. ²Comparações para o fator Açaí: ATP sintase e β-OH-acil CoA-DH: A0=A2, A2≠A5, A0≠A5; Complexo piruvato desidrogenase e Citrato sintase: A0≠A2, A2=A5, A0≠A5. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos; comparações para o fator Infarto: (a—Infarto ≠ Sham entre os tratamentos A0; b—Infarto ≠ Sham entre os tratamentos A2); comparações para o fator Infarto x Açaí: (A—A0≠A2 entre os animais infartados; B—A2≠A5 entre os animais infartados; C—A0≠A5 entre os animais infartados).

Figura 34. Atividade da piruvato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



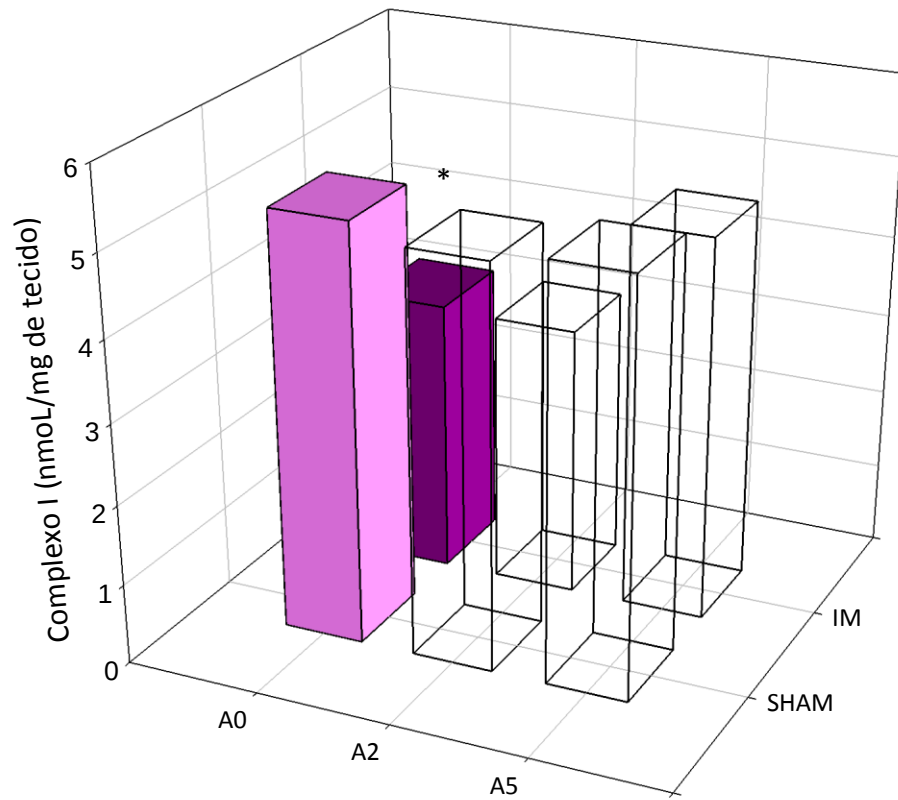
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. PIDH: Piruvato desidrogenase; IM: infarto. * $p=0,011$.

Figura 35. Atividade da citrato sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



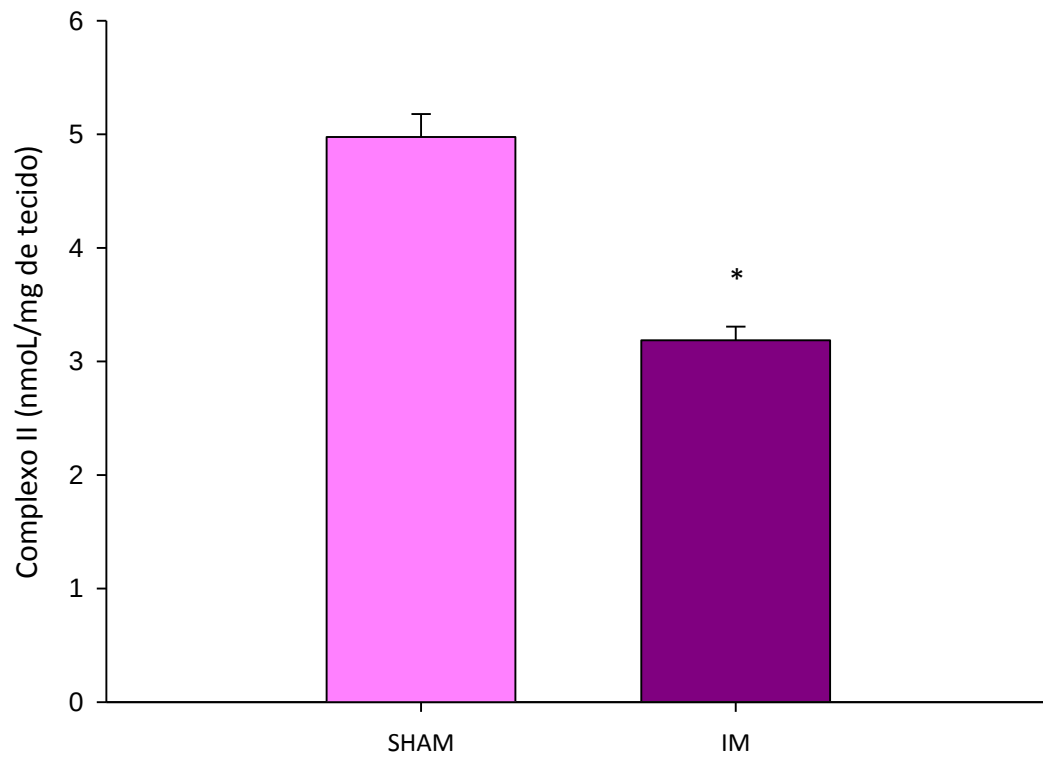
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 36. Atividade do Complexo I da cadeia respiratória no miocárdio do VE (bioquímica).



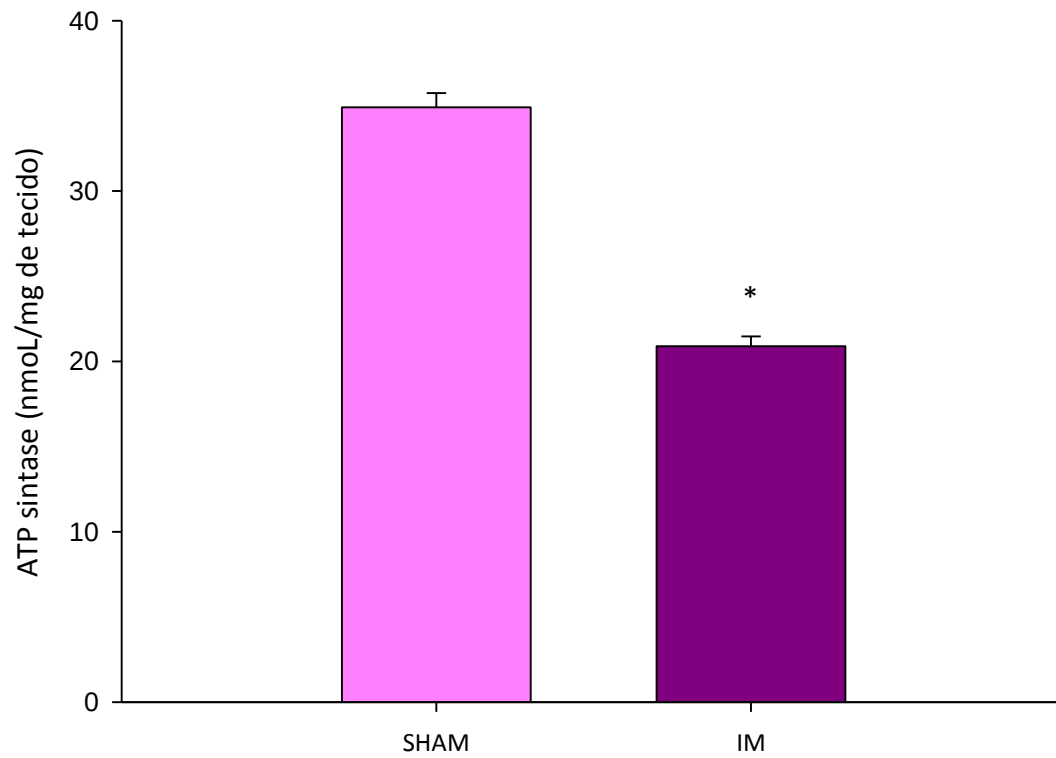
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,001$.

Figura 37. Atividade do Complexo II da cadeia respiratória no miocárdio do VE (bioquímica).



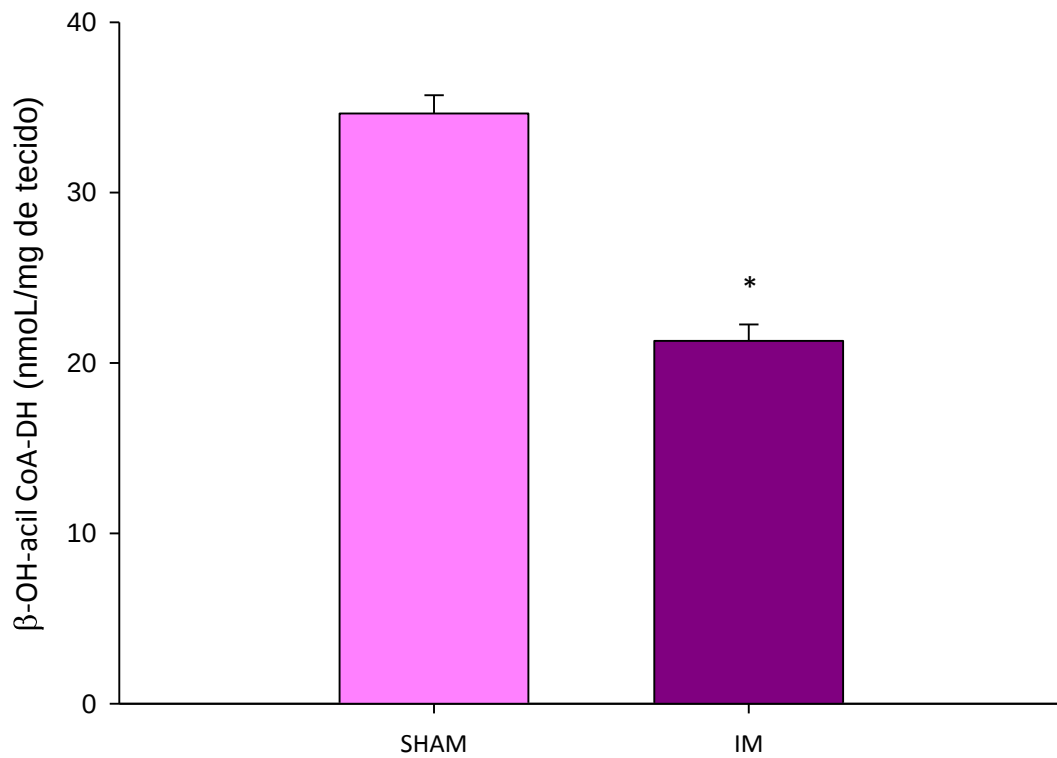
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. $*=p<0,001$.

Figura 38. Atividade da ATP sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



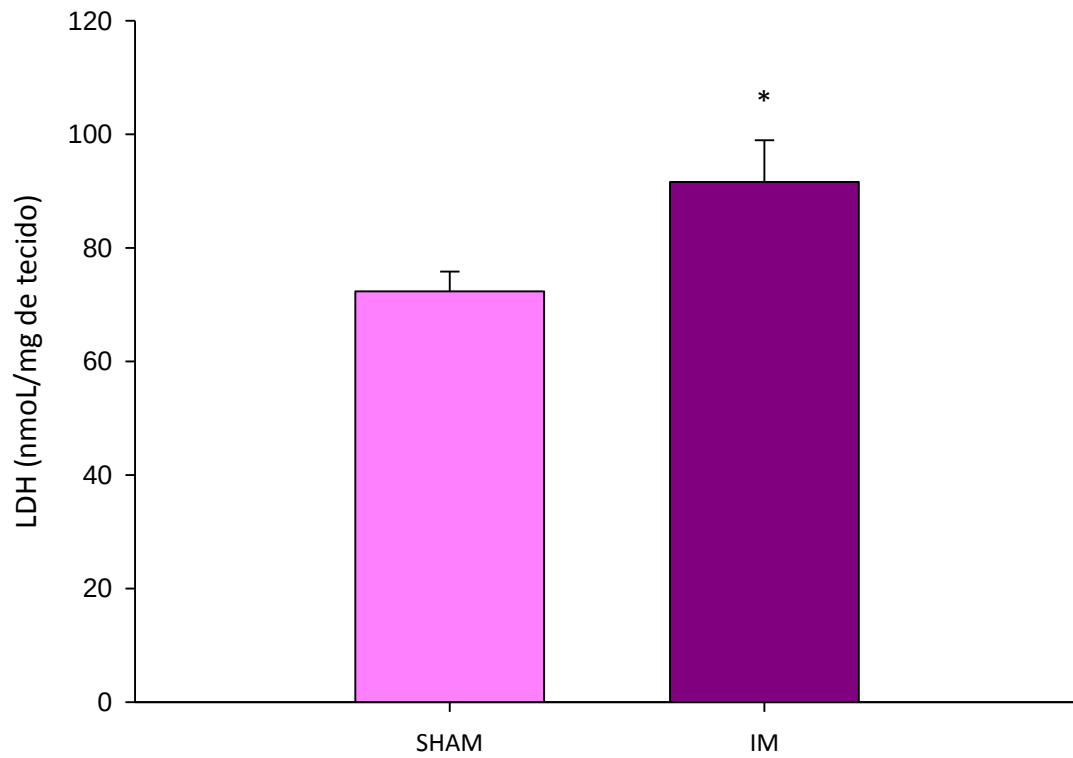
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto. *=p<0,001.

Figura 39. Atividade da β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



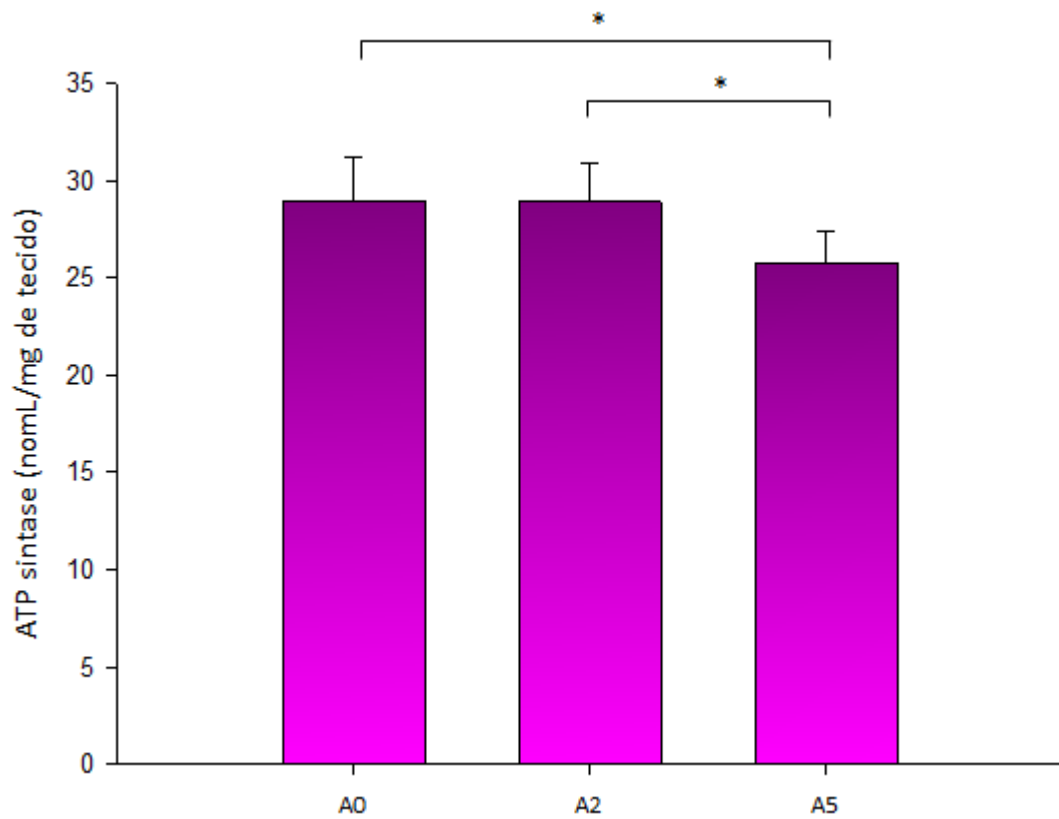
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. β -OH-acil CoA-DH: β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase. IM: infarto. *= $p < 0,001$.

Figura 40. Atividade da lactato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



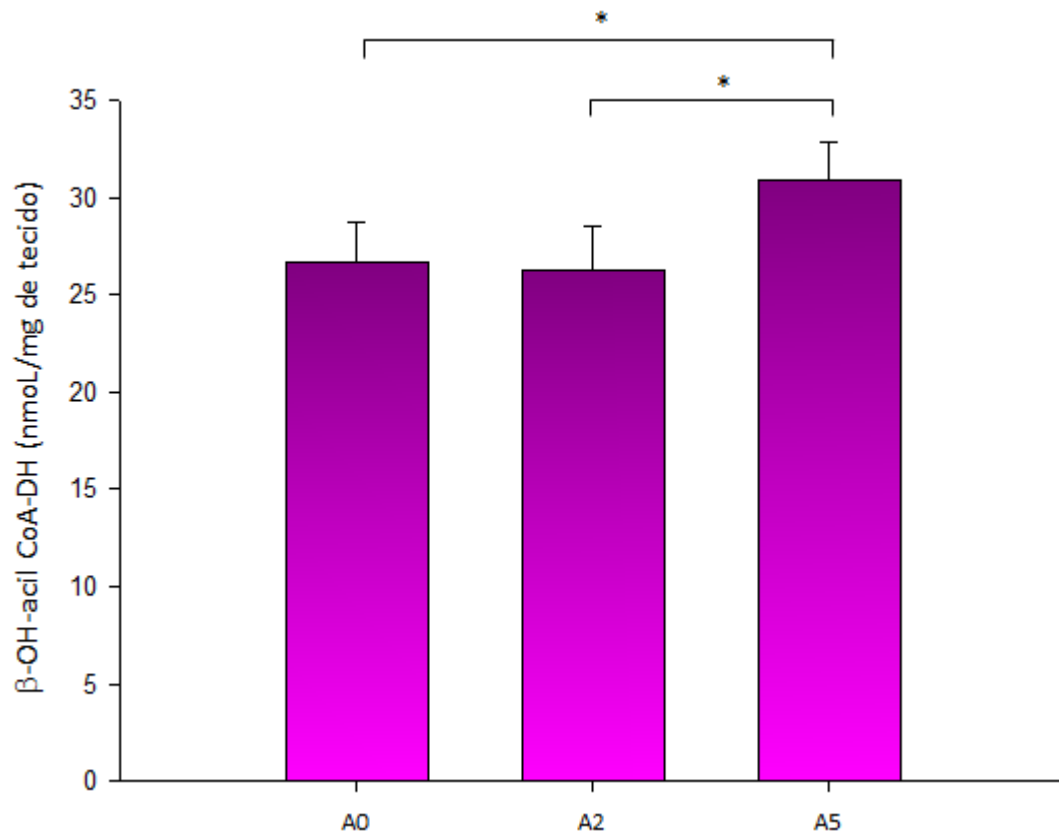
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. LDH: Lactato desidrogenase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,005$.

Figura 41. Atividade da ATP sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



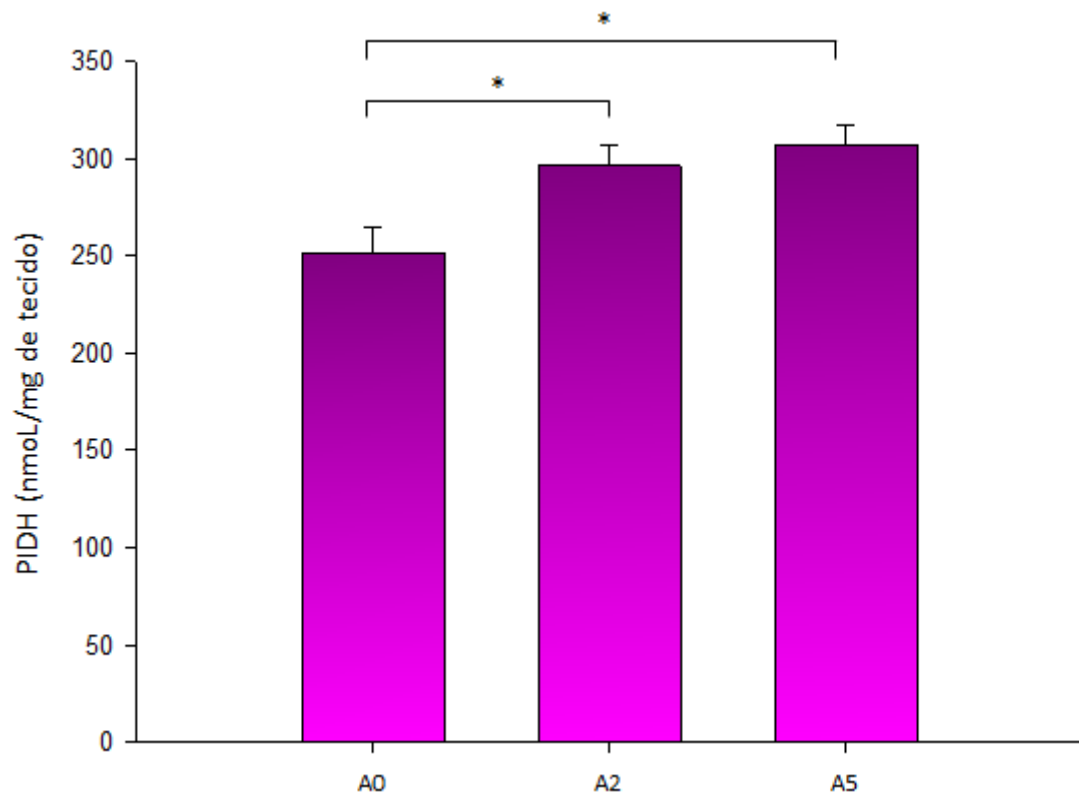
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açai; A5: Suplementação de 5% de açai. * $p=0,007$.

Figura 42. Atividade da β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



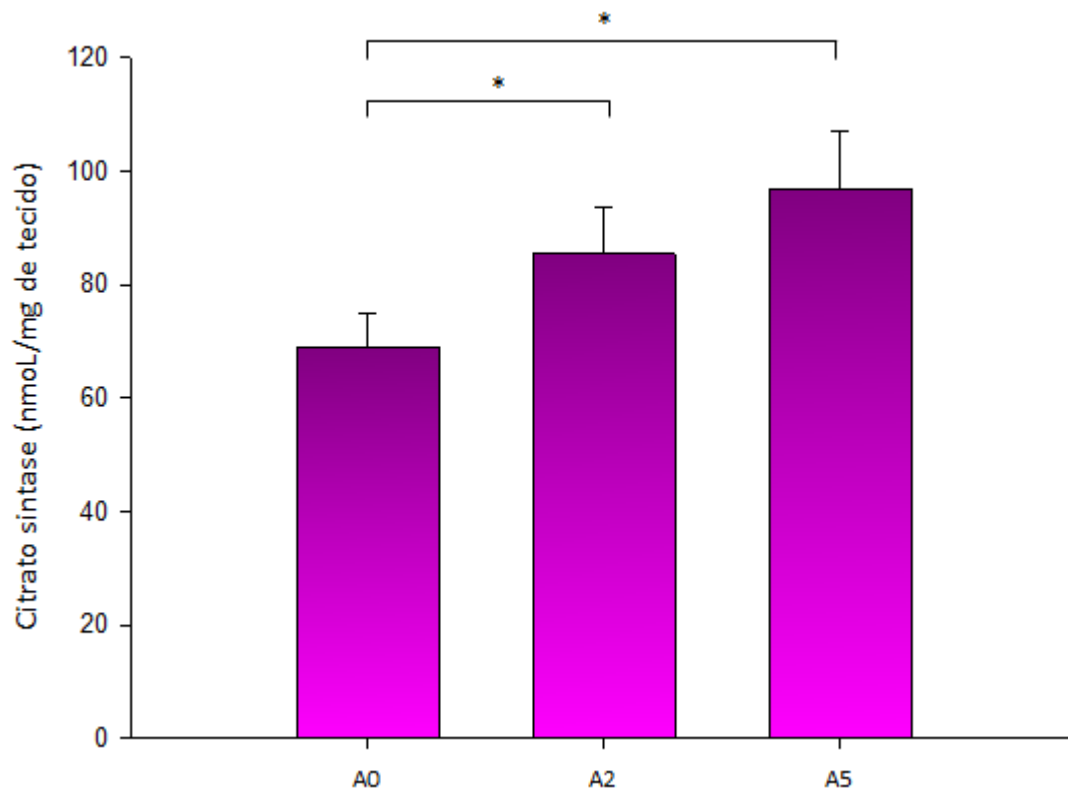
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. β -OH-acil CoA-DH: β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase. A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. * $p=0,014$.

Figura 43. Atividade da piruvato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



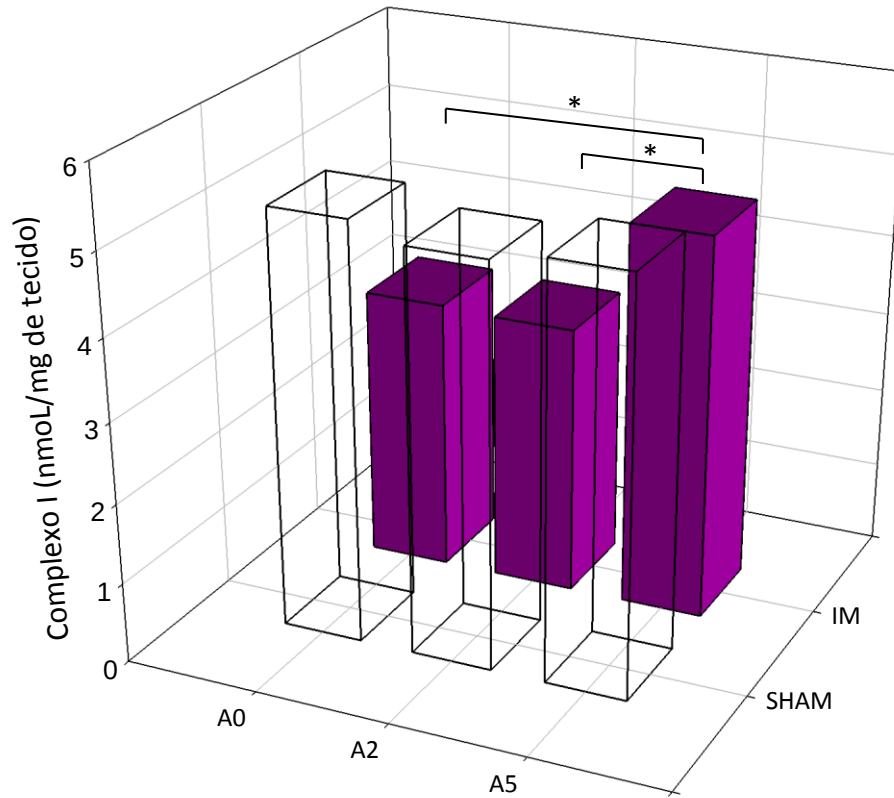
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. PIDH: Piruvato desidrogenase; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,001$.

Figura 44. Atividade da citrato sintase no miocárdio do VE (bioquímica).



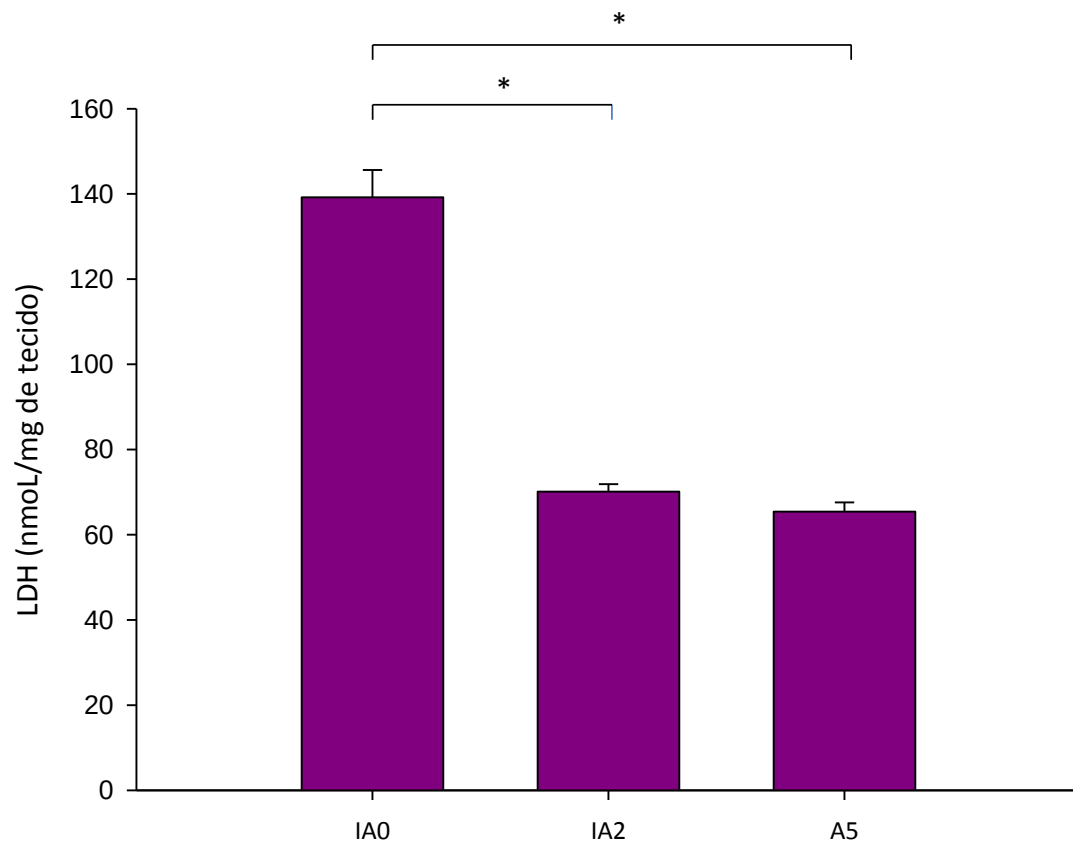
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açai; A5: Suplementação de 5% de açai. * $p=0,002$.

Figura 45. Atividade do Complexo I da cadeia respiratória no miocárdio do VE (bioquímica).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. * $p=0,015$.

Figura 46. Atividade da lactato desidrogenase no miocárdio do VE (bioquímica).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. LDH: Lactato desidrogenase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,005$.

Avaliação da produção de citocinas no miocárdio do ventrículo esquerdo

Os resultados da avaliação da produção de citocinas no miocárdio do VE estão apresentados na Tabela 10.

O infarto apresentou maior concentração de IL-10 e menor concentração de INF- γ como representado nas Figuras 47 e 48.

Observamos que à influência da suplementação de polpa de açaí no coração sem agressão, em relação a IL-10, o grupo SA5 apresentou maior concentração em comparação ao grupo SA2 e o grupo SA0 (Figura 49). Desta forma, a maior concentração de IL-10 parece ter resposta dose dependente. Não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí.

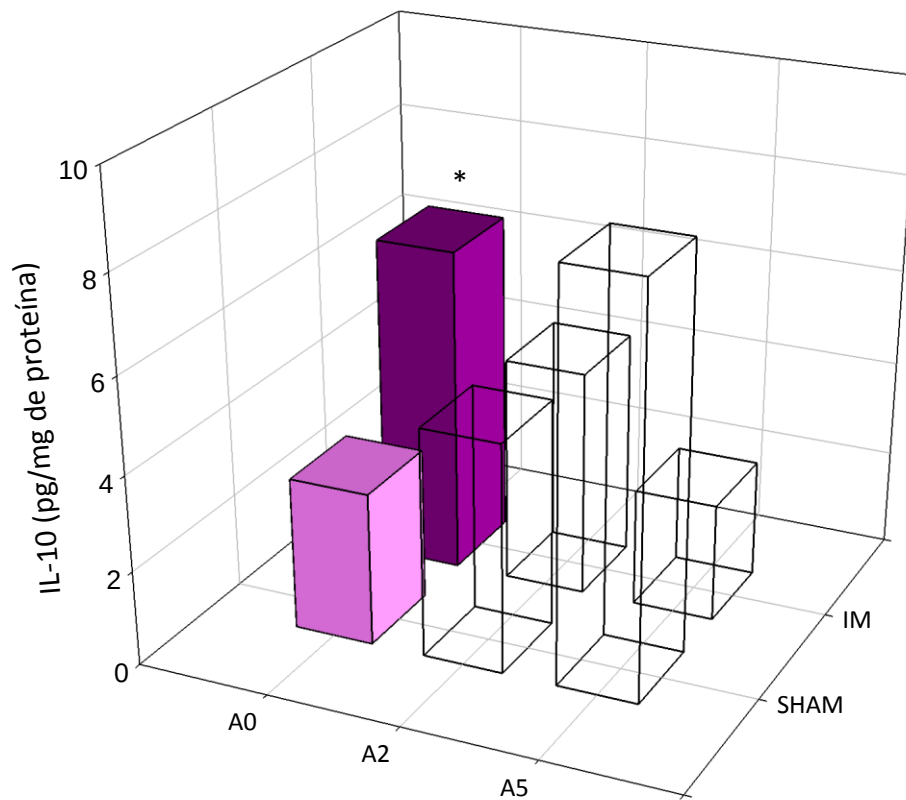
Em relação à suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, o grupo IA5 apresentou menor concentração de IL-10 em comparação com o grupo IA2, e este apresentou menor concentração quando comparado com o grupo IA0 (Figura 50). Assim, a menor concentração de IL-10 parece ter resposta dose dependente.

Tabela 10. Produção de citocinas inflamatórias no miocárdio do VE.

Variável	SA0	SA2	SA5	IA0	IA2	IA5	p(I)	p(A)	p(IxA)
(n)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)			
IL-10 (pg/mg)	3,21±0,47 ^{a,f}	4,81±0,71 ^e	8,49±1,0 ^{c,e,f}	6,83±0,44 ^{a,A,C}	4,75±0,62 ^{A,B}	2,48±0,27 ^{c,B,C}	0,123	0,529	<0,001
(n)	(6)	(5)	(5)	(6)	(6)	(4)			
INF-γ (pg/mg)	0,48±0,19	1,05±0,32	1,33±0,22	0,48±0,18	0,62±0,27	0,13±0,08	0,008¹	0,276	0,054
(n)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)			
#TNF α (pg/mg)	0,1±0,1	0,02±0,02	0,78±0,47	0,24±0,16	0,92±0,49	0,53± 0,33	0,699	0,250	0,427
(n)	(6)	(8)	(8)	(7)	(8)	(7)			
TNFα (unidade arbitrária)	4,17±1,12	2,74±0,46	4,58±1,08	2,34±0,77	3,12±0,91	4,22±0,79	0,405	0,212	0,458
(n)	(8)	(8)	(6)	(6)	(6)	(7)			
NF-κB fosforilado (unidade arbitrária)	0,85±0,10	1,24±0,14	1,08±0,21	1,25±0,21	1,03±0,27	1,06±0,16	0,696	0,872	0,222
(n)	(8)	(8)	(6)	(6)	(6)	(7)			
NF-κB total (unidade arbitrária)	0,94±0,16	1,16±0,12	1,09±0,25	1,20±0,17	0,96±0,20	1,03±0,17	0,990	0,997	0,415
(n)	(8)	(8)	(6)	(6)	(6)	(7)			
*pNF-κB / NF-κB (unidade arbitrária)	1,0±0,1	1,05±0,05	0,97±0,13	1,02±0,07	0,86±0,06	0,91±0,11	0,191	0,663	0,377

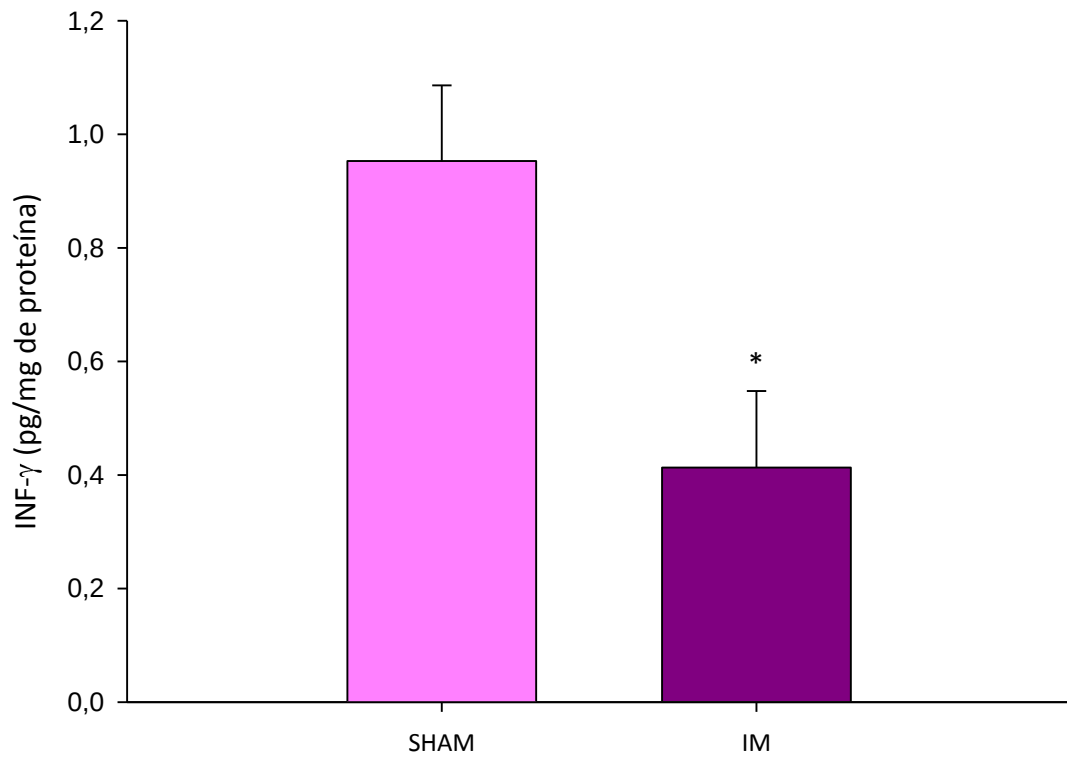
Dados expressos em média ± erro padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. #foi realizado teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos; comparações para o fator Infarto: (a—Infarto ≠ Sham entre os tratamentos A0; c—Infarto ≠ Sham entre os tratamentos A5); comparações para o fator Açaí: (e—A2≠A5 entre os animais Sham; f—A0≠A5 entre os animais Sham); comparações para o fator Infarto x Açaí: (A—A0≠A2 entre os animais infartados; B—A2≠A5 entre os animais infartados; C—A0≠A5 entre os animais infartados).

Figura 47. Interleucina-10 no miocárdio do VE (ELISA).



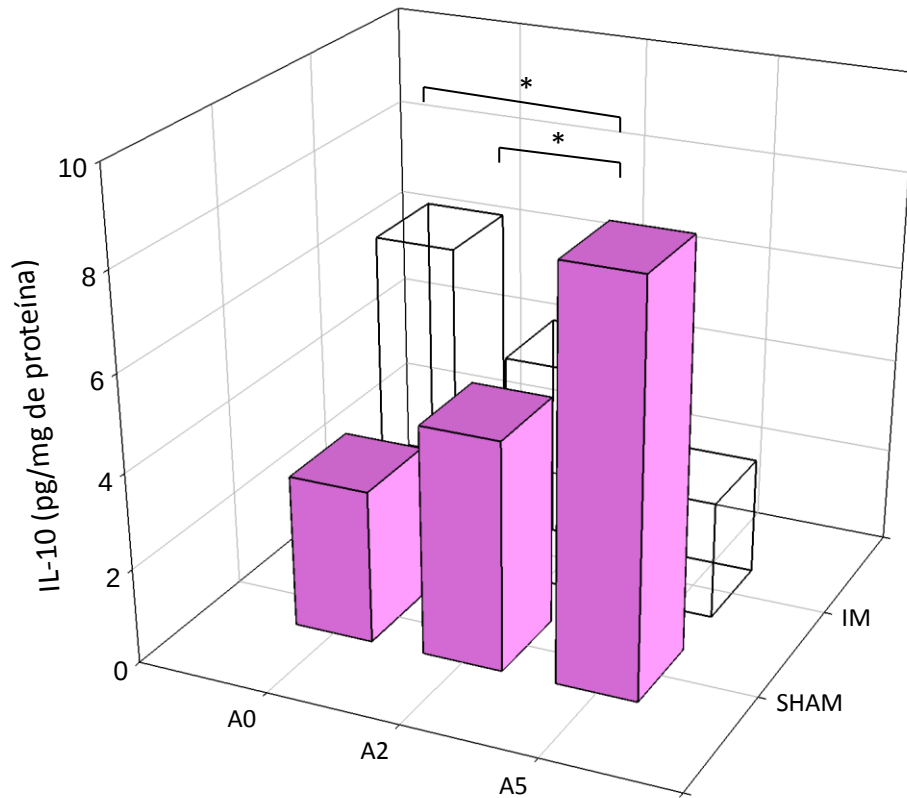
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IL-10: Interleucina-10; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,001$.

Figura 48. Interferon gama no miocárdio do VE (ELISA).



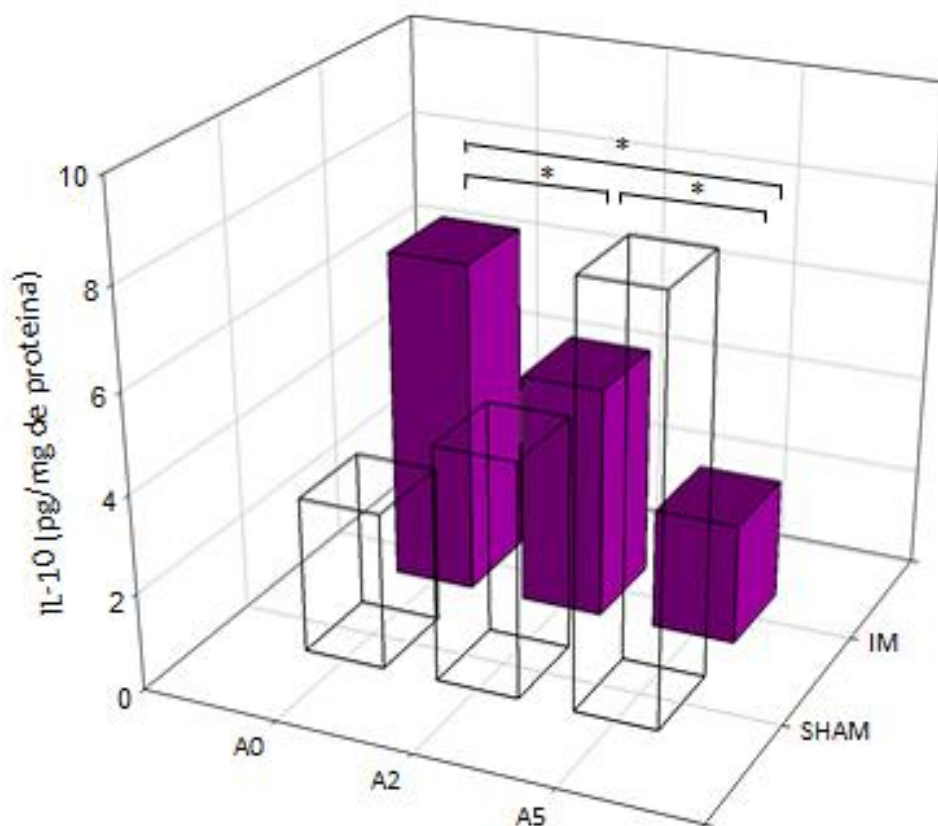
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. INF-γ: Interferon gama; IM: infarto. *p=0,008.

Figura 49. Interleucina-10 no miocárdio do VE (ELISA).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IL-10: Interleucina-10; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açai; A5: Suplementação de 5% de açai. $*=p<0,001$.

Figura 50. Interleucina-10 no miocárdio do VE (ELISA).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. IL-10: Interleucina-10; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açaí; A5: Suplementação de 5% de açaí. $*=p<0,001$.

Determinação de inibidor tecidual de metaloproteinase-1, colágeno I e III, caspase-3 no miocárdio do ventrículo esquerdo

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 11. O infarto apresentou maior concentração de TIMP-1 (Figura 51) e maior expressão de colágeno I (Figura 52).

Não observamos influência da suplementação de polpa de açaí no coração sem agressão. Assim como não houve diferença nas comparações entre todos os animais sem suplementação e todos os animais suplementados com ambas as doses de polpa de açaí.

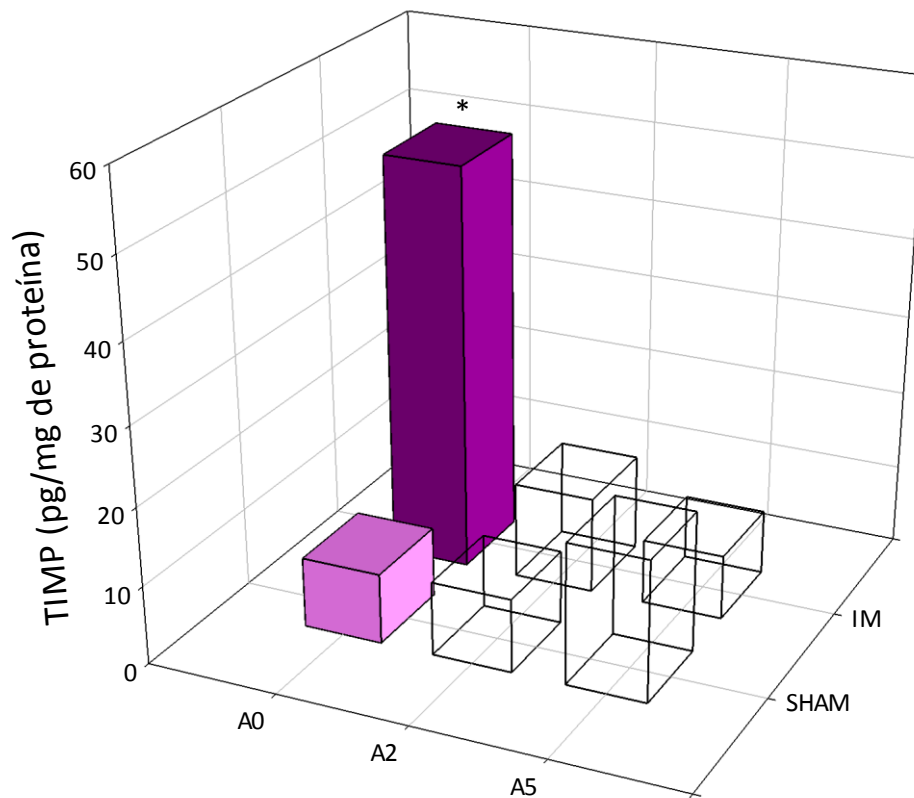
Em relação à suplementação de polpa de açaí nos animais infartados, observou-se que os grupos IA5 e IA2 apresentaram menor concentração de TIMP-1 em comparação com o grupo IA0 (Figura 53). Desta forma, a suplementação de polpa de açaí nos animais infartados parece exercer papel dose dependente, ou seja, menor concentração de TIMP-1 ocorre quando aumenta a suplementação.

Tabela 11. Determinação de inibidor tecidual de metaloproteinase-1, colágeno I e III, caspase-3 no miocárdio do VE.

Variável	SA0	SA2	SA5	IA0	IA2	IA5	p(I)	p(A)	p(IxA)
(n)	(6)	(4)	(2)	(4)	(4)	(4)			
*TIMP-1 (pg/mg)	8,94±2,48 ^a	9,42±0,90	18,1±8,85	51,4±13,5 ^{a,A,C}	12,3±1,62 ^A	8,25±1,95 ^C	0,05	0,049	<0,001
(n)	(8)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)			
Colágeno I (unidade arbitrária)	0,73±0,13	0,87±0,17	0,73±0,16	1,22±0,21	1,18±0,29	0,85±0,14	0,050¹	0,439	0,603
(n)	(7)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)			
Colágeno III (unidade arbitrária)	0,84±0,09	1,04±0,14	1,26±0,24	1,14±0,17	1,00±0,07	1,25±0,14	0,503	0,164	0,464
(n)	(8)	(7)	(8)	(7)	(8)	(7)			
Caspase-3 (unidade arbitrária)	1,88±0,58	2,81±0,73	3,21±0,65	1,58±0,42	2,63±0,68	2,36±0,65	0,397	0,182	0,853

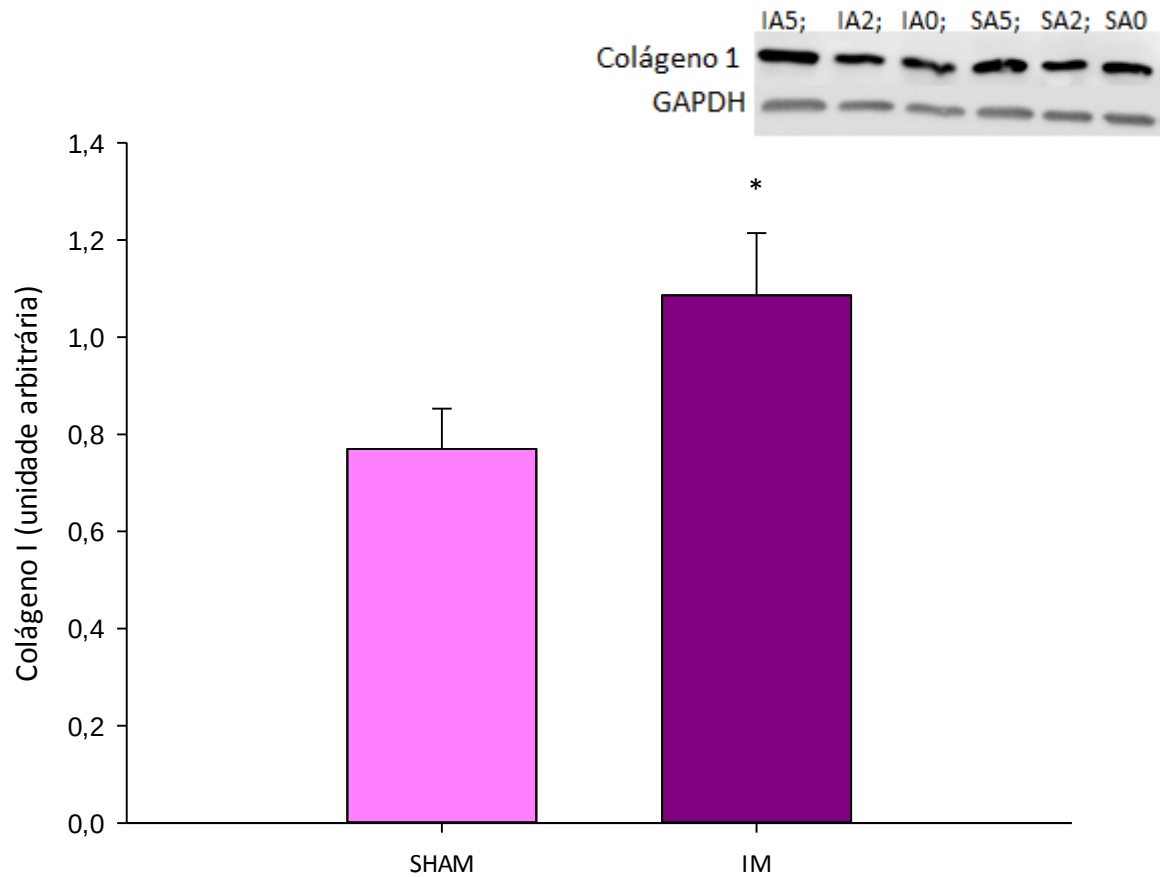
Dados expressos em média ± erro padrão. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; SA2: animais Sham que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; SA5: animais Sham que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí; I: fator infarto; A: fator açaí; IxA: interação entre os fatores infarto e açaí. ¹Comparação para o fator Infarto: animais infartados diferentes dos animais Sham. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos; comparações para o fator Infarto: (a—Infarto ≠ Sham entre os tratamentos A0); comparações para o fator Infarto x Açaí: (A—A0≠A2 entre os animais infartados; C—A0≠A5 entre os animais infartados). As proteínas colágeno I, colágeno III e caspase-3 foram normalizadas pelo GAPDH.

Figura 51. Inibidor tecidual de metaloproteinase-1 no miocárdio do VE (ELISA).



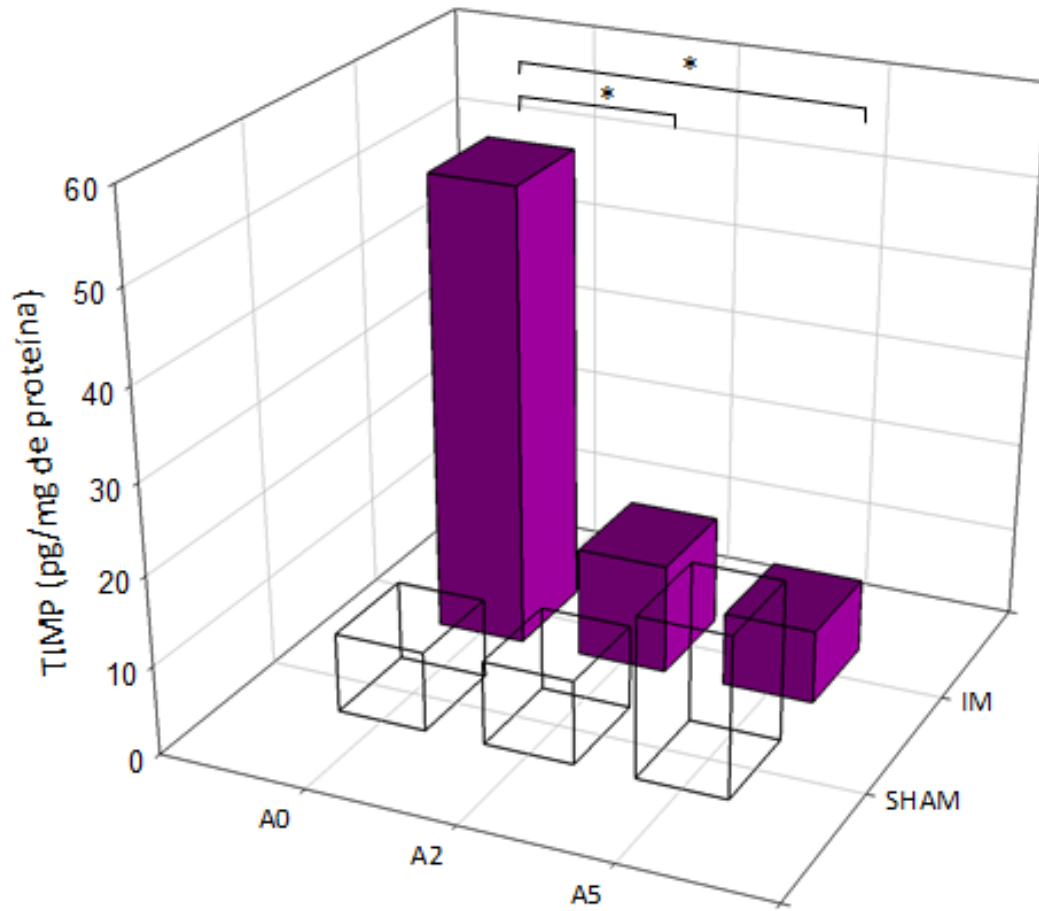
Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açai; A5: Suplementação de 5% de açai. $*=p<0,001$.

Figura 52. Expressão proteica do colágeno I no miocárdio do VE (Western Blot).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. SA0: animais Sham que receberam ração padrão; IA0: animais infartados que receberam ração padrão; IA2 animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de açaí; IA5: animais infartados que receberam ração com suplementação de 5% de açaí. IM: infarto. $*=p<0,05$. A figura no topo à direita representa as bandas do colágeno I sobre as bandas do GAPDH fotografadas.

Figura 53. Inibidor tecidual de metaloproteinase no miocárdio do VE (ELISA).



Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinase; IM: infarto; A0: Sem suplementação; A2: Suplementação de 2% de açai; A5: Suplementação de 5% de açai. $*=p<0,001$.

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de polpa de açaí na remodelação cardíaca após infarto do miocárdio. Nossos dados mostraram que o infarto induziu, como esperado, alterações cardíacas morfológicas e funcionais, no estresse oxidativo, no metabolismo energético, no processo inflamatório e no inibidor tecidual de metaloproteinase. Além disso, a suplementação de polpa de açaí, nos animais infartados, atenuou o estresse oxidativo, melhorou o metabolismo energético, modulou o processo inflamatório e diminuiu a concentração de inibidor tecidual de metaloproteinase, no coração. É interessante observarmos que a suplementação de polpa de açaí parece ter resposta dose dependente.

Alterações cardíacas após o infarto do miocárdio

No modelo de infarto é importante conhecer o tamanho da área infartada. Áreas de infarto menores do que 30% não apresentam alterações cardíacas importantes. Área infartada de 36%, 38% e 40%, apresentam alterações morfológicas, funcionais e anormalidades clínicas (51). Desta forma, utilizamos apenas os animais que apresentaram área de infarto avaliada pela análise histológica maiores que 30%. Além disso, não se podem comparar diferentes tamanhos de infarto. Por isso, a comparação dos grupos infartados no nosso estudo possui o mesmo tamanho de infarto ($IA0=42,8\pm1,9$; $IA2=39,7\pm2,7$; $IA5=42,1\pm1,8$; $p=0,556$).

O estudo morfológico, realizado por meio do ecocardiograma, mostrou que os animais submetidos ao infarto apresentaram maior diâmetros sistólicos e diastólicos do VE corrigidos pelo PC, acompanhado por maior espessura diastólica da parede posterior do VE e espessura diastólica do septo interventricular, além de maior diâmetro do átrio esquerdo. Em relação às alterações funcionais sistólicas, o IM apresentou menor porcentagem de encurtamento endocárdico, menor velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, menor fração de ejeção e fração de variação da área do VE. Provocou aumento do índice de performance miocárdica e diminuição da onda sistólica do anel mitral lateral e septal, e menor média da onda sistólica do anel mitral lateral e septal. Esses achados caracterizam que houve piora da função sistólica após o IM. Também foram observadas alterações funcionais diastólicas, como maior onda E do fluxo mitral, menor onda diastólica tardia do anel mitral lateral e septal, menor média da onda diastólica inicial do anel mitral lateral e

septal, menor média da onda diastólica tardia do anel mitral lateral e septal. De acordo com esses dados, foi possível observar que houve piora da função diastólica após o IM.

O infarto também apresentou maior massa do VE no estudo ecocardiográfico e maior peso do VE corrigido pelo PC, realizado por meio do estudo morfométrico. Estes dados associados com a área seccional dos miócitos mostraram que houve hipertrofia no coração infartado.

O encontro de alterações na massa e no volume cardíaco e de disfunção sistólica e diastólica no estudo ecocardiográfico confirmam a remodelação cardíaca (5-10). Entre as alterações celulares e moleculares foram encontradas o estresse oxidativo, a inflamação, e alterações no metabolismo energético cardíaco que ocorrem no processo de remodelação cardíaca (5-7).

Entre as alterações do estresse oxidativo, que ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de EROs e as reservas antioxidantes do miocárdio (12). Neste trabalho, o infarto apresentou maior concentração de hidroperóxido de lipídeo. Este dado sugere maior estresse oxidativo após o IM, já que este é considerado marcador de estresse oxidativo. Este trabalho foi o primeiro, dentre os realizados em nosso grupo de pesquisa, que realizou a determinação de MDA. Por meio desta, observamos sua maior concentração no tecido cardíaco. Dentre os danos causados pelo estresse oxidativo, destaca-se a peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e permeabilidade celular. O MDA é proveniente da peroxidação lipídica e importante biomarcador para avaliar o grau do dano oxidativo, portanto, encontra-se em concentrações elevadas em patologias associadas ao estresse oxidativo (15, 16, 71).

A SOD é responsável pela dismutação do radical superóxido para hidroperóxido de hidrogênio, e este, posteriormente, é convertido em água pela catalase e glutational peroxidase (72). Além disso, a SOD é considerada a primeira linha de defesa para proteger a mitocôndria contra os efeitos deletérios dos radicais superóxido em condições fisiopatológicas e patológicas (73). Desta forma, a maior atividade de SOD nos animais infartados poderia ser explicada pela maior produção de radical superóxido na cadeia respiratória, evidenciado pela menor atividade do Complexo I e II mitocondrial. De fato, está documentado maior produção de superóxido e outras espécies reativas na remodelação

cardíaca e na insuficiência cardíaca (74). Esses dados também foram encontrados em trabalhos prévios realizados com animais infartados em nosso laboratório (31, 32). A glutathiona peroxidase é uma enzima antioxidante e não só catalisa hidroperóxido de hidrogênio, mas também previne a formação de outros radicais tóxicos (75, 76). Assim, a menor atividade de glutathiona peroxidase nos animais infartados pode estar relacionada com piora do estresse oxidativo.

É importante ressaltarmos que o Nrf-2 é um fator de transcrição que se liga à região promotora de vários genes da resposta antioxidante, como enzimas antioxidantes e enzimas de fase II. Em condições normais, o Nrf-2 é retido no citoplasma pelo Kelch-like ECH-associated Protein 1 (Keap-1) e, assim, inativa. O homodímero de Keap-1 serve de intermediário à ligase E3 ubiquitina (Cul3-Rbx1), que marca por ubiquitinação a proteína Nrf-2 para degradação proteossomal. Posto isto, a proteína Nrf-2 ubiquitinada apresenta concentração basal baixa, resultante do balanço entre a síntese e a degradação proteossomal (77). Quando a célula se encontra sob estresse oxidativo, o sistema Keap 1/Nrf-2 é ativado e o Nrf-2 se desliga do Keap-1 e migra para o núcleo, onde se liga a regiões específicas do DNA (elementos de resposta antioxidante – ARE), regulando a expressão de enzimas antioxidantes (78, 79). Estudos têm mostrado que dependendo do agente indutor do estresse oxidativo, da intensidade, duração, do tipo de célula e seu estado fisiológico, diferentes vias de sinalização antioxidante são ativadas (80). Assim, na fase inicial da patologia, existe translocação do Nrf-2 para o núcleo e consequente ativação do ARE para defender o coração do estresse oxidativo. Entretanto, na fase crônica, a via do Nrf-2 pode estar exaurida ou suprimida pela expressão genética anormal do Nrf-2, causando a falha da manutenção da homeostase redox, por meio das enzimas mediadas pelo ARE. Há relatos que o Nrf-2 está envolvido na proteção do coração contra hipertrofia cardíaca e IC, isso se deve a supressão do estresse oxidativo (81). Neste trabalho o infarto apresentou menor expressão de Nrf-2, assim, este achado sugere participação desta via no processo de remodelação cardíaca após o IM (82).

A regulação do metabolismo energético é essencial no coração. Nossos dados mostraram que o infarto apresentou menor atividade de citrato sintase, Complexo I e II da cadeia respiratória, ATP sintase e β -OH-acil CoA-DH. Também observamos maior atividade

do LDH e menor atividade do complexo piruvato desidrogenase. Isso ocorre devido à remodelação cardíaca após a isquemia, com isso o coração passa a produzir muito lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidratos e atividade de LDH (83, 84).

A inflamação constitui processo vital em resposta a dano celular e é acompanhada por sequência de eventos para responder à cicatrização. Nossos dados mostraram que nesta fase pós-infarto observamos alteração do processo inflamatório, por meio da menor concentração de INF- γ e maior concentração de IL-10. Em outros trabalhos realizados em nosso laboratório, também observamos que o infarto reduziu a concentração de IFN- γ (31, 32). Outra citocina importante é a IL-10, há relatos de que a IL-10 aumenta sua concentração após o IM e pode suprimir a expressão das citocinas pró-inflamatórias no miocárdio infartado (85, 86). O maior valor de IL-10 no IM pode significar a maior controle do processo de inflamação nesta fase (86). Este controle da inflamação pode ser observada pelos valores normais de TNF- α como os valores de NF- κ B (fosforilado, total e sua relação).

A participação da matriz extracelular e seus elementos estruturais, como colágeno e outras proteínas, também tem importância no processo de remodelação após o IM. A estrutura e função da matriz extracelular são mantidas pelas MMPs, enquanto que sua atividade no coração é regulada pelas TIMPs, destacando-se o TIMP-1. Desta forma, o aumento da produção de TIMP está associado com menor degradação de colágeno e subsequente fibrose (87). Por outro lado, a degradação excessiva da matriz extracelular pode levar a expansão do VE e está associada à IC (88). No nosso estudo o aumento de TIMP nos animais infartados era esperado, como consequência ao aumento das MMPs (87). Por não termos a avaliação das MMPs fica difícil de dizer se estamos presente a uma situação de síntese de colágeno (predominância da TIMP) ou de degradação (predominância das MMPs) (87).

A predominância das MMPs faz com que o colágeno III (normal) seja substituído pelo colágeno tipo I (anormal) (87, 89). O encontro de maior expressão do colágeno tipo I no nosso estudo pode estar mostrando a predominância das MMPs sobre o TIMP (87). O acúmulo do colágeno tipo I pode explicar parte da disfunção diastólica encontrada no nosso experimento (11).

Outro mecanismo descrito como possível responsável pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca em corações remodelados é a apoptose ou morte celular programada (90). A apoptose permite ao organismo remover as células indesejadas durante seu desenvolvimento, durante a homeostase normal e processos patológicos (91, 92). Para ocorrer apoptose é necessário a interação de fatores pró e anti-apoptóticos (93). Dentre os fatores pró-apoptóticos, destacam-se as proteínas caspases, que são proteases sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases), que são ativados quando a célula recebe algum sinal de morte (94). Elas estimulam uma cascata de sinalização, por meio da clivagem de vários substratos, que vão desencadear alterações morfológicas e bioquímicas na célula, as quais irão resultar em morte celular (94, 95). Entretanto, semelhante a estudo anterior realizado em nosso laboratório (5, 31), nosso trabalho não mostrou alteração da expressão da caspase-3, na forma ativa, três meses após o IM. Contudo, existem mediadores apoptóticos independentes da caspase, como o fator de indução de apoptose (AIF) e a endonuclease G (Endo G) (96). Estas proteínas estão presentes no espaço intramembranoso da mitocôndria e induzem apoptose por meio de sua migração do citosol para o núcleo, assim, participam da condensação da cromatina e fragmentação do DNA, independente da ativação das caspases (97, 98). Desta forma, a não alteração da expressão da caspase-3 não significa que não há apoptose, já que esta pode ocorrer independente da ativação das caspases.

Desta forma, o infarto induziu alterações morfológicas, disfunção sistólica e diastólica, além de maior estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético e no processo inflamatório e maior concentração de inibidor tecidual de metaloproteinase, no coração. Portanto, com base nas alterações encontradas, pode-se inferir que o nosso protocolo foi eficiente para a indução de alterações morfofuncionais no coração após o infarto experimental e essas alterações também foram semelhantes aos achados de estudos anteriores (8, 9, 11-13, 31, 32).

Influência da suplementação de polpa de açaí no coração “normal”

A suplementação com açaí promoveu alterações apenas nos marcadores de inflamação e do metabolismo energético no coração chamado de “normal”. A concentração de IL-10 estava maior nos grupos Sham que receberam açaí (grupo SA5 apresentou maior

Quanto ao metabolismo energético, observamos que a suplementação de açaí parece melhorá-lo. Esta melhora do metabolismo energético pelo açaí também foi verificada em modelo de lesão renal por isquemia e reperfusão em ratos (101). Desta forma, a suplementação de açaí parece melhorar a eficiência do metabolismo energético, uma vez que aumentou a oxidação de ácidos graxos, do ciclo do citrato e a glicólise. Além da maior oxidação de ácidos graxos como substrato energético, que é característica de corações sem agressão, também observamos menor atividade de LDH, que sugere menor utilização da glicose oxidada como substrato (23). O uso de alimentos com propriedade antioxidante, como o alecrim, no modelo de infarto experimental, também melhoraram as variáveis do metabolismo energético (31), mostrando a importância da atenuação do estresse oxidativo na melhora do metabolismo energético.

Como foi mencionado acima, o açaí modificou a resposta anti-inflamatória do infarto. Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, encontramos menores concentrações nos grupos suplementados com polpa de açaí. Este achado pode estar mostrando que o processo inflamatório já está equilibrado e que não há necessidade de maior produção de citocinas anti-inflamatórias. Assim, a IL-10 pode ser marcador de melhora do estresse oxidativo e do metabolismo energético do coração. Este dado pode ser devido a elevada quantidade de polifenóis presentes no fruto (39, 41, 100).

A menor concentração de TIMP nos grupos suplementados com polpa de açaí pode ser marcador de menor remodelação cardíaca. Esse dado sugere que neste período de 3 meses após o IM, está ocorrendo menor degradação da matriz extracelular e, desta forma, não há necessidade de inibir esta degradação e ocorreria a menor síntese de TIMP (87).

Equivalência da suplementação de polpa de açaí de ratos para seres humanos

É importante destacar a relevância clínica dos resultados descritos no presente estudo. Apesar dos avanços na pesquisa cardiovascular, o infarto do miocárdio ainda é uma das principais causas de morbimortalidade no Brasil e no mundo, podendo levar a disfunção ventricular e IC. Neste sentido, a suplementação com polpa de açaí poderia ser medida coadjuvante no tratamento de pacientes com IM após a segurança e eficácia de seu uso ser testada em estudos de intervenção.

Para se ter uma ideia da quantidade de açaí a ser usada em estudos em humanos pode ser calculada a partir dos dados do nosso estudo utilizando a equação de equivalência de dose proposta por Reagan-Shaw e colaboradores (102). Ao considerar que um rato consome em média 25 gramas de ração por dia. Concentrações de 2% e 5%, equivalem a 0,5 e 1,25 gramas de polpa de açaí adicionadas na ração por dia, respectivamente. Para calcular a dose equivalente em humanos, 0,5 gramas de polpa de açaí no rato equivalem a 15,6 gramas em humanos, enquanto 1,25 gramas de polpa de açaí no rato equivalem a 39 gramas em humanos. A quantidade de 15 gramas de polpa de açaí pode ser convertida em uma colher de sopa, enquanto que 39 gramas equivalem a aproximadamente 2,5 colheres de sopa diárias. Desta maneira, a quantidade não é muito grande e o açaí é um produto que pode ser encontrado com facilidade o ano inteiro no Brasil, além do preço ser acessível.

Limitações do estudo

Nosso estudo sugere que a suplementação com polpa de açaí atenuou a remodelação cardíaca, porém não influenciou nas alterações morfológicas e funcionais observadas por meio do estudo ecocardiográfico. Esse dado sugere que com a maior duração do experimento, seria possível observar essas alterações. Levando em conta que com a suplementação realizada no período de 3 meses e foi possível observar melhora do estresse oxidativo, do metabolismo energético e do processo inflamatório no coração após o IM. O presente estudo não foi delineado para determinar a melhor dose de ação do açaí. Entretanto, podemos afirmar que as respostas positivas obtidas com as concentrações de 2 e 5% foram dose dependentes.

Desta forma, é necessário mais estudos sejam realizados, que associem a suplementação de polpa de açaí com o infarto do miocárdio, com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos, quantidade necessárias para atenuar o processo de remodelação cardíaca.

Conclusão

Conclui-se que a suplementação da ração com polpa de açaí nos animais infartados atenuou o estresse oxidativo, melhorou o metabolismo energético e modulou o processo inflamatório no coração, mostrando atenuação da remodelação cardíaca. A influência da suplementação de polpa de açaí foi dose dependente.

Referências

1. Saúde Md. Datasus. Departamento de Informática do SUS2012; Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.
2. Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Zornoff LA. [Association between sphericity, ventricular function and size of the infarction in rats]. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(5):645-50.
3. Organization. WH. Cardiovascular disease. 2013; Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
4. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(4):434-40, 26-32.
5. Goncalves AF, Santos PP, Rafacho BP, Batista DF, Azevedo PS, Minicucci MF, et al. Vitamin D supplementation intensifies cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2014;176(3):1225-6.
6. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367(9507):356-67.
7. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews*. 2005;85(3):1093-129.
8. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(3):569-82.
9. Zornoff LAM CA, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Revista Sociedade Cardiologia Estado de São Paulo*. 2002;12(3):371-8.
10. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews*. 1999;79(1):215-62.
11. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2009;92(2):150-64.
12. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovascular research*. 2009;81(3):482-90.
13. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circulation research*. 1985;57(1):84-95.
14. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2008;19(8):491-504.
15. Steghens JP, van Kappel AL, Denis I, Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(2):242-9.
16. Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, et al. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology international*. 2005;25(3):188-90.
17. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & therapeutics*. 2012;133(2):230-55.
18. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(4):443-53.
19. Evora PR, Nather J, Tubino PV, Albuquerque AA, Celotto AC, Rodrigues AJ. Curbing inflammation in the ischemic heart disease. *International journal of inflammation*. 2013;2013:183061.
20. Jourdan-Lesaux C, Zhang J, Lindsey ML. Extracellular matrix roles during cardiac repair. *Life sciences*. 2010;87(13-14):391-400.

21. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2009;81(3):457-64.
22. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1994;26(3):279-92.
23. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiology in review*. 2013;21(3):135-40.
24. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(1):207-58.
25. Witteles RM, Fowler MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(2):93-102.
26. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;127(3):295-314.
27. da Silva SH MR. Cardiac biomarkers for assessment of acute coronary syndrome. *Scientia Medica*. 2011;21(3):132-42.
28. Zhang Y, Zhao J, Lau WB, Jiao LY, Liu B, Yuan Y, et al. Tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- α mediate myocardial ischemic injury via TNF receptor 1, but are cardioprotective when activating TNF receptor 2. *PloS one*. 2013;8(5):e60227.
29. Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and α -tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life sciences*. 2010;86(5-6):178-84.
30. Buttros JB, Bergamaschi CT, Ribeiro DA, Fracalossi AC, Campos RR. Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Pharmacology*. 2009;84(1):29-37.
31. Rafacho BPM. Influência da suplementação de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na ração sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos ao infarto do miocárdio: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2015.
32. Pereira BLB. Influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2015.
33. Zhu YZ, Huang SH, Tan BK, Sun J, Whiteman M, Zhu YC. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Natural product reports*. 2004;21(4):478-89.
34. Pompeu DR, Silva EM, Rogez H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource technology*. 2009;100(23):6076-82.
35. Santos GM, Maia GA, Sousa PH, Costa JM, Figueiredo RW, Prado GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Arch Latinoam Nutr*. 2008;58(2):187-92.
36. da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2012;385(12):1199-209.
37. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010;26(7-8):804-10.
38. Guerra JF, Magalhaes CL, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;49(3):188-94.

39. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(3-4):262-9.
40. Feio CA, Izar MC, Ihara SS, Kasma SH, Martins CM, Feio MN, et al. Euterpe oleracea (acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2012;19(3):237-45.
41. Dias MM, Martino HS, Noratto G, Roque-Andrade A, Stringheta PC, Talcott S, et al. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from acai (Euterpe oleracea Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. *Food & function*. 2015;6(10):3249-56.
42. Kang J, Li ZM, Wu T, Jensen GS, Schauss AG, Wu XL. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (Euterpe oleracea Mart.). *Food Chem*. 2010;122(3):610-7.
43. Cardoso LM LJ, Peluzio MCG. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Rev Colomb Cienc Quím Farm*. 2011;40(1):116-38.
44. Gale AM, Kaur R, Baker WL. Hemodynamic and electrocardiographic effects of acai berry in healthy volunteers: a randomized controlled trial. *International journal of cardiology*. 2014;174(2):421-3.
45. Matheus ME, de Oliveira Fernandes SB, Silveira CS, Rodrigues VP, de Sousa Menezes F, Fernandes PD. Inhibitory effects of Euterpe oleracea Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;107(2):291-6.
46. Shimizu MM, Melo GA, Brombini Dos Santos A, Bottcher A, Cesarino I, Araujo P, et al. Enzyme characterisation, isolation and cDNA cloning of polyphenol oxidase in the hearts of palm of three commercially important species. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*. 2011;49(9):970-7.
47. Cervellin G, Lippi G. [A journey with Euterpe. Sinfonia concertante for music, heart and brain]. *Recenti progressi in medicina*. 2011;102(9):352-8. Epub 2011/09/29. In viaggio con Euterpe. Sinfonia concertante per musica, cuore e cervello.
48. Zapata-Sudo G, da Silva JS, Pereira SL, Souza PJ, de Moura RS, Sudo RT. Oral treatment with Euterpe oleracea Mart. (acai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014;14:227.
49. Heimbürger R. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946;52:677-89.
50. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Cloner R, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-12.
51. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment. *Clinical cardiology*. 2011;34(7):410-4.
52. de Souza MO, Souza ESL, de Brito Magalhaes CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, et al. The hypocholesterolemic activity of acai (Euterpe oleracea Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res*. 2012;32(12):976-84.
53. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Acai (Euterpe oleracea Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2013;58:68-76.
54. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58(6):1072-83.
55. De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *European journal of heart failure*. 2006;8(8):784-9.

56. Zornoff LAM PSd, Tornero MTT, Carvalho MSS, Tucci PJF. Influência do acréscimo de manitol à solução nutriente no desempenho mecânico e no grau de edema miocárdico de corações isolados de ratos. *Arq Bras Cardiol.* 1995;64(3):225-9.
57. Castardeli E PS, 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.
58. Minicucci MF, Azevedo PS, Duarte DR, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, et al. Comparison of different methods to measure experimental chronic infarction size in the rat model. *Arquivos brasileiros de cardiologia.* 2007;89(2):83-7, 93-8.
59. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996;328(2):309-16.
60. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical biochemistry.* 1995;232(2):243-8.
61. Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 1974;358:251-61.
62. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis.* 2 ed. New York: Verlag chemie Weinheim; 1974.
63. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991;26(10):853-6.
64. Wilkinson JH, Withycombe WA. Organ specificity and lactate-dehydrogenase activity. Some properties of human spermatozoal lactate dehydrogenase. *Biochem J.* 1965;97(3):663-8.
65. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969;10(2):198-206.
66. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of biochemical analysis.* 1974;22:123-75.
67. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985;153(1):23-36.
68. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys.* 1996;333(1):145-51.
69. 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;72:248-54.
70. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical chemistry.* 1997;43(7):1209-14.
71. Pirinccioglu AG, Gokalp D, Pirinccioglu M, Kizil G, Kizil M. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clinical biochemistry.* 2010;43(15):1220-4.
72. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF. Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation.* 2002;105(2):140-2.
73. Das KC, Muniyappa H. Age-dependent mitochondrial energy dynamics in the mice heart: role of superoxide dismutase-2. *Experimental gerontology.* 2013;48(9):947-59.
74. Liu T, Chen L, Kim E, Tran D, Phinney BS, Knowlton AA. Mitochondrial proteome remodeling in ischemic heart failure. *Life sciences.* 2014;101(1-2):27-36.
75. Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction. *Heart, lung & circulation.* 2004;13(2):132-8.
76. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2011;301(6):H2181-90.

77. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(16):7130-9.
78. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta medica*. 2008;74(13):1526-39.
79. Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry Biokhimiia*. 2011;76(4):407-22.
80. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2011;153(2):175-90.
81. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal research reviews*. 2012;32(4):687-726.
82. Li J, Ichikawa T, Villacorta L, Janicki JS, Brower GL, Yamamoto M, et al. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(11):1843-50.
83. Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FL, Donnelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation*. 1993;87(3):881-92.
84. Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology*. 1974;36:413-59.
85. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *The American journal of pathology*. 2004;164(2):665-77.
86. Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circulation research*. 2009;104(2):e9-18.
87. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiological reviews*. 2007;87(4):1285-342.
88. Liu Y, Liu K. Effects of spironolactone and losartan on the early neovascularization of acute myocardial infarction. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;8(3):978-82.
89. Whittaker P. Unravelling the mysteries of collagen and cicatrix after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 1995;29(6):758-62.
90. Haendchen RV. [Myocardial apoptosis. A new mechanism of cellular death]. *Arq Bras Cardiol*. 1998;70(1):65-8. Apoptose miocardica. Um novo mecanismo de morte celular.
91. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-62.
92. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997;88(3):347-54.
93. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*. 2000;45(3):528-37.
94. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(8):299-306.
95. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(6):725-31.
96. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95-9.
97. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 24):4727-34.

98. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2785-96.
99. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & allergy drug targets*. 2009;8(3):229-35.
100. Carey AN, Miller MG, Fisher DR, Bielinski DF, Gilman CK, Poulouse SM, et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich acai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. *Nutritional neuroscience*. 2015.
101. El Morsy EM, Ahmed MA, Ahmed AA. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by acai extract preconditioning in a rat model. *Life sciences*. 2015;123:35-42.
102. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J*. 2008;22(3):659-61.