

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

Barbara Catalano Damasceno

**Influência da suplementação de acerola
(*Malpighia emarginata*) sobre a remodelação
cardíaca em ratos submetidos a infarto do
miocárdio**

Orientadora: Dra. Priscila Portugal dos Santos

Coorientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Botucatu

2021

Barbara Catalano Damasceno

Influência da suplementação de acerola (Malpighia emarginata) sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos a infarto do miocárdio

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

Orientador (a): Prof(a).Dr(a).: Priscila Portugal dos Santos
Coorientador(a):Prof. Dr.: Sergio Alberto Rupp de Paiva

Botucatu
2021

Damasceno, Barbara Catalano.

Influência da suplementação de acerola (*Malpighia emarginata*) sobre a remodelação cardíaca em ratos submetidos a infarto do miocárdio / Barbara Catalano Damasceno. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Priscila Portugal dos Santos

Coorientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva

Capes: 40101002

1. Acerola. 2. Infarto do miocárdio. 3. Remodelação ventricular. 4. Vitamina C.

Palavras-chave: Acerola; Infarto do miocárdio; Remodelação cardíaca; Vitamina C.

2

Agradecimentos

À Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos pela orientação, paciência e todos os ensinamentos que compartilhou comigo durante o mestrado.

Aos professores Sergio Alberto Rupp de Paiva, Bertha Furlan Polegato, Leonardo Antonio Mamede Zornoff, Marcos Ferreira Minicucci pelas contribuições e ajuda que me deram durante todo o projeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Remodelação Cardíaca e Nutrição (RECAN) por sempre se disponibilizarem a me ajudar com os experimentos, por todas as conversas e auxílio.

À minha mãe, por ter me possibilitado concluir mais essa etapa na minha vida. Por seu esforço durante esses anos.

Ao meu "paidrasto" Kim, pelos conselhos e auxílio durante todo esse processo. À Maria, minha segunda mãe, por ter me ensinado desde criança a me dedicar aos estudos e à crescer como pessoa.

À minha avó Claudinei, por ter acreditado em mim e ter me estimulado a estudar desde cedo.

Ao Felipe, meu melhor amigo, por ter sempre me apoiado em todas as decisões que tomei na minha vida e por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos. À professora Fernanda, por ter me ensinado muito do que sei hoje sobre pesquisa e por ter sido uma grande amiga durante os 7 anos que estive em Botucatu. Aos meus amigos Aline, Gabriel e Ricardo, por estarem presentes quando eu precisei e por me ouvirem reclamar da pós-graduação.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são importante problema de saúde em nossa sociedade, sendo o infarto do miocárdio (IM) a primeira causa de morte no Brasil. Após IM mudanças complexas ocorrem no ventrículo esquerdo (VE), que são definidas como remodelação cardíaca (RC). Vários fatores podem participar nas adaptações da RC após o IM, como estresse oxidativo, inflamação, apoptose, além de fibrose, que ocorre por alterações da matriz extracelular (ME). Sendo assim, estratégias para atenuar a RC após o IM podem diminuir ainda mais a mortalidade pós-IM e limitar a morbidade. Neste contexto, compostos bioativos (CBAs) de produtos naturais, com propriedades cardioprotetoras como flavonoides podem ser um importante adjuvante na terapia do IM. A vitamina C é um CBA importante para a saúde humana, pois é fundamental para diversas atividades fisiológicas como síntese de colágeno, além de atuar como poderoso antioxidante. Estudos experimentais e clínicos realizados com infarto e suplementação de VC mostraram que a suplementação de VC diminui a hipertrofia e melhora a função cardíaca pós-IM, e exerce papel antioxidante e antiinflamatório. Adicionalmente, estudo com deficiência de VC mostrou risco aumentado de IM e piora da função sistólica e diastólica, sendo de extrema importância para sobrevivência pós-IM. A acerola, é uma fruta com altíssimos teores de vitamina C e outros compostos bioativos com potencial antioxidante que mostram-se eficazes no tratamento adjuvante do IM. Sendo assim, a vitamina C e os CBAs podem ter importante papel no tratamento do infarto do miocárdio, atenuando a remodelação cardíaca pós-infarto. Além disso, a interação entre vitamina C e os CBAs da acerola podem exercer ação sinérgica,

potencializando os efeitos benéficos, comparado à suplementação isolada de cada composto separadamente. Sendo assim, o objetivo do estudo foi verificar a influência da suplementação de vitamina C e da acerola sobre a remodelação cardíaca após infarto do miocárdio em ratos. Para este estudo foram utilizados ratos machos da raça Wistar, divididos em 3 grupos: 1) grupo infarto (I), animais submetidos ao infarto experimental e alimentados com dieta padrão; grupo infarto e vitamina C (IVC), animais submetidos ao infarto experimental e alimentados com ração suplementada com vitamina C (150mg/kg); grupo infarto e acerola (IA), animais submetidos ao infarto experimental e alimentados com ração suplementada com acerola (15g/kg). A quantidade de acerola suplementada forneceu a mesma quantidade de vitamina C que receberam os grupos suplementados apenas com esta vitamina hidrossolúvel. Após três meses, esses animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e posteriormente à eutanásia, onde foi realizada a coleta de material biológico para realização das análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Pela análise histológica foram excluídos os infartos inferiores a 30%, restando 15 animais

4

no grupo I, 15 animais no grupo IVC e 16 animais no grupo IA. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de 1 via (dados apresentados em média $\pm$ DP) ou Kruskal Wallis (dados apresentados em mediana e percentil 25 e 75), de acordo com a normalidade dos dados, e o valor de p foi de 5%. Não houve diferença entre os grupos para o peso corporal, final e para a ingestão de ração. Com relação às alterações estruturais podemos observar diminuição do AE e do DSVE nos animais IVC e IA comparados ao I. O AE/AO foi menor e a ESSV foi maior apenas no IA comparado ao I. Com relação às variáveis de função sistólica, houve aumento da FE e da % de encurtamento endocárdico em IVC e IA comparados ao I, e maior VEPP e menor IPM no IA comparado ao I. Para a análise de função diastólica podemos observar maiores valores de E'médio no IA comparado ao I, e maiores valores da relação E'/A' também no grupo IA, quando comparado ao I e ao IVC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para nenhuma variável morfométrica analisada, nem para as análises histológicas de área do infarto e porcentagem de colágeno total. Para os parâmetros de estresse oxidativo, DHE e expressão das proteínas antioxidantes GPx e HO-1, também não foram observadas diferenças. Para os mediadores inflamatórios, houve maiores valores de IL-10 no grupo IA quando comparado ao grupo I. Com relação aos componentes de matriz extracelular, houve diminuição do colágeno III e do TIMP-2 em ambos os grupos suplementados; diminuição do colágeno I apenas no grupo IVC; e diminuição do TIMP-4 apenas no grupo IA. Podemos concluir que a suplementação de vitamina C e acerola atenuam remodelação cardíaca pós IM, com melhora da função sistólica e diastólica. Os mecanismos envolvidos podem ser decorrentes da

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are an important health problem in our society, with myocardial infarction (MI) being the leading cause of death in Brazil. After MI complex changes occur in the left ventricle (LV), which are defined as cardiac remodeling (CR). Several factors can participate in CR adaptations after MI, such as oxidative stress, inflammation, apoptosis, in addition to fibrosis, which occurs due to changes in the extracellular matrix (EM). Thus, strategies to attenuate CR after MI can further reduce post-MI mortality and limit morbidity. In this context, bioactive compounds (BCAs) from natural products with cardioprotective properties such as flavonoids can be an important adjuvant in MI therapy. Vitamin C is an important BCA for human health, as it is essential for various physiological activities such as collagen synthesis, in addition to acting as a powerful antioxidant. Experimental and clinical studies performed with infarction and VC supplementation showed that VC supplementation decreases hypertrophy and improves post-MI cardiac function, and plays an antioxidant and anti-inflammatory role. Additionally, a study with VC deficiency showed an increased risk of MI and worsening of systolic and diastolic function, being extremely important for post-IM survival. Acerola is a fruit with very high levels of vitamin C and other bioactive compounds with antioxidant potential which are effective in the adjuvant treatment of MI. Thus, vitamin C and CBAs may play an important role in the treatment of myocardial infarction, attenuating post infarction cardiac remodeling. Furthermore, the interaction between vitamin C and acerola CBAs can exert synergistic action, enhancing the beneficial effects, compared to

the isolated supplementation of each compound separately. Thus, the study aimed to verify the influence of vitamin C and acerola supplementation on cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. For this study, male Wistar rats were used, divided into 3 groups: 1) infarction group (I), animals submitted to experimental infarction and fed a standard diet; infarction and vitamin C group (IVC), animals submitted to experimental infarction and fed with a diet supplemented with vitamin C (150mg/kg); infarction and acerola group (AI), animals submitted to experimental infarction and fed with a diet supplemented with acerola (15g/kg). The amount of acerola supplemented provided the same amount of vitamin C that the groups supplemented with only this water-soluble vitamin received. After three months, these animals were submitted to echocardiographic evaluation and later to euthanasia, where biological material was collected for performing histological, biochemical, and molecular analyses. By histological analysis, infarcts below 30% were excluded, leaving 15 animals in group I, 15 animals in group IVC, and 16 animals in group IA. For statistical analysis, 1-way ANOVA (data presented in mean $\pm$

6

SD) or Kruskal Wallis (data presented in median and 25th and 75th percentile) was used, according to the normality of the data, and the p-value was 5%. There was no difference between groups for body weight, final, and feed intake. Regarding structural changes, we can observe a decrease in LA and LVSD in IVC and IA compared to I. The LA/AO was smaller and the ESSV was higher only in the IA compared to the I. Regarding the systolic function variables, there was an increase of EF and % of endocardial shortening in CVI and IA compared to I, and higher VEPP and lower MPI in IA compared to I. For the analysis of diastolic function, we can observe higher E'mean values in IA compared to I, and higher values of the E'/A' ratio also in the IA group, when compared to the I and the IVC. There was no statistically significant difference between groups for any morphometric variable analyzed, nor for the histological analysis of infarct area and percentage of total collagen. For the parameters of oxidative stress, DHE, and expression of antioxidant proteins GPx and HO-1, no differences were observed either. For inflammatory mediators, there were higher values of IL-10 in group IA when compared to group I. Regarding extracellular matrix components, there was a decrease in collagen III and TIMP-2 in both supplemented groups; decreased collagen I only in the IVC group, and decreased TIMP-4 only in the IA group. We can conclude that vitamin C and acerola supplementation attenuate post-MI cardiac remodeling, with improvement in systolic and diastolic function. The mechanisms involved may result from the remodeling of the extracellular matrix and the increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Sumário

1.Introdução	8
2.Objetivos	12
3.Materiais e Métodos	13
3.1. Delineamento Experimental.....	13
3.2. Preparo das rações.....	14
3.3. Infarto experimental.....	14
3.4. Estudo ecocardiográfico.....	14
3.5. Coleta do material biológico.....	16
3.6. Estudo morfométrico.....	16
3.7. Determinação do estresse oxidativo.....	17
3.8. Determinação dos mediadores inflamatórios.....	17
3.9. Zimografia para atividade da metaloproteinase 2.....	18
3.10. Determinação da expressão protéica por Western blot.....	18
3.11. Análise estatística.....	20
4.Resultados	21
4.1. Estudo ecocardiográfico inicial.....	21
4.2. Fluxograma do número de animais, mortalidade e tamanho do infarto por histologia.....	21
4.3. Peso corporal final dos animais e ingestão de ração.....	24
4.4. Estudo ecocardiográfico final.....	24
4.5. Estudo morfométrico.....	32
4.6. Análise histológica.....	32
4.7. Mediadores inflamatórios.....	33
4.8. Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2).....	34
4.9. Avaliação da expressão proteica por Western blot.....	34
5.Discussão	40
6.Conclusão	48
7.Referencias	48

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são importante problema de saúde em nossa sociedade, principalmente nos países desenvolvidos, onde essas doenças constituem uma das principais causas de morte. A Sociedade Brasileira de Cardiologia relatou que em 2019 (1) foram estimadas 433.411 mortes por DCV e até agosto de 2020 foram 439.659 mortes (2). Além disso, as doenças cardíacas podem causar maior incapacidade e perdas do que qualquer outro grupo de doenças (3).

Dentre as doenças cardiovasculares, as doenças isquêmicas do coração, como por exemplo, o infarto do miocárdio (IM), são as mais notáveis. As doenças isquêmicas são a causa principal de insuficiência cardíaca e morte mundialmente. A falta de oxigênio e fornecimento de nutrientes para os cardiomiócitos, devido a uma perfusão insuficiente da coronária (isquemia), seguida da sua reposição (reperusão), causa sérios danos ao tecido cardíaco e pode comprometer a sobrevivência (4). Segundo o DATASUS, em 2019 IM foi uma das maiores causas de morte no Brasil, com 95,6 mil óbitos (5).

No IM a baixa perfusão do tecido resulta em foco de necrose e consequente morte celular cardíaca (6). Após o IM, mudanças complexas ocorrem no ventrículo esquerdo (VE) envolvendo tanto a região infartada quanto a não infartada. Essas mudanças são definidas como remodelação cardíaca (RC) e podem ser observadas

pelas alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, particularmente no aumento da cavidade do VE (7). As adaptações da RC podem levar a insuficiência cardíaca, a qual é responsável pelo aumento da mortalidade após o IM (8). Estudos mostram que vários fatores podem participar nas adaptações da RC pós IM, como estresse oxidativo, inflamação, fibrose e apoptose (6, 9).

Com o intuito de atenuar a RC após o IM, estratégias terapêuticas já foram extensivamente estudadas (10, 11). Alguns tratamentos estão bem consolidados, como: betabloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina, anticoagulantes, entre outros; enquanto outros ainda são promissores (12). Neste contexto, compostos bioativos (CBAs) de produtos naturais, com propriedades cardioprotetoras podem ser importantes adjuvantes na terapia do IM.

Vitamina C, nome comum dado às formas ativas do ácido ascórbico ou ascorbato, é um importante CBA, fundamental em diversas atividades fisiológicas, atuando, por exemplo, como cofator enzimático. A vitamina C participa da síntese de colágeno, por estar envolvida na hidroxilação de lisina e prolina; tem papel no metabolismo energético, participando da biossíntese da carnitina; está envolvida na síntese de catecolaminas

9

como norepinefrina (13); e participa da absorção de ferro e da síntese de alguns hormônios (14).

Adicionalmente, essa vitamina é importante para a saúde humana, pois é poderoso antioxidante. As moléculas do ácido ascórbico são as primeiras moléculas a sofrerem oxidação, protegendo assim várias moléculas e estruturas da lesão por espécies reativas (ERs) (15).

Antioxidantes são capazes de atenuar o estresse oxidativo ao neutralizar espécies reativas (que podem gerar lesão celular e de DNA), sendo assim faz-se muito importante a inclusão de antioxidantes dietéticos na rotina alimentar, seja por alimentos ou por suplementos, pois o mesmo é benéfico tanto na prevenção de algumas doenças quanto no tratamento de outras (16, 17). Assim é de grande interesse que a população consuma tipo de composto.

Estudos têm mostrado que a deficiência de vitamina C é ruim para a saúde cardiovascular. Baixas concentrações plasmáticas de vitamina C estão associadas ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares e doença isquêmica do coração (18, 19), inclusive IM (20, 21). Adicionalmente, estudo experimental mostrou que a deficiência da vitamina C está associada à piora da função sistólica e diastólica após o IM, sendo de extrema importância para sobrevivência nesta patologia (22).

Por outro lado, a vitamina C tem se mostrado promissora no tratamento adjuvante no IM. Estudo clínico realizado por Ramos e colaboradores em 2017 mostrou que altas doses de ácido ascórbico antes da reperfusão, seguido por baixas doses orais crônicas, melhora a função sistólica após 7 dias de tratamento e melhora a capacidade antioxidante (23). Em adição, estudos experimentais, com ratos, camundongos e cultura de células, mostraram que a suplementação de vitamina C após o IM reduz pressão arterial, hipertrofia cardíaca, além de melhorar a função cardíaca e exerce papel antioxidante e antiinflamatório (24-29).

A acerola (*Malpighia emarginata*) é uma das frutas mais ricas em vitamina C. Ela é de origem controversa. Existem relatos sobre a presença da fruta em ilhas na costa do oeste do continente asiático, e também em locais como as Antilhas (30). No Brasil, sua cultura teve início somente por volta de 1950 pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Em 1980 começou a ser comercialmente utilizada, quando surgiu grande demanda pela fruta na Europa, Japão e Estados Unidos (31).

Segundo Furlaneto e Nasser 2015, (31) o processamento da fruta pelas indústrias nacionais gira em torno de 34,4 mil toneladas por ano, o que representa apenas 7,16% do total de frutas colhidas no país. A fruta possui acidez característica e segundo o SEBRAE (32) seu peso pode variar entre 3 a 16 g. No Brasil, atualmente, a acerola é

10

muito bem aceita e popular. A principal forma de consumo é por meio de polpas para produção de sucos (32).

A acerola contém valores estimados de vitamina C entre 1200 a 1900 mg/100g de polpa. A laranja e o limão, por exemplo, possuem quantidades menores de vitamina C. A laranja pera contém 53,7 mg de ácido ascórbico em 100 de suco e o limão galego 34,5 mg (33). Entretanto, não encontramos na literatura trabalhos relacionados à doenças iatrogênicas em que a acerola foi usada como tratamento ou como fonte de vitamina C.

Leffa e colaboradores em 2015 mostrou que tanto a suplementação de vitamina C individualmente, como a ingestão de suco de acerola em estágios diferentes de maturação (acerola verde, madura e suco industrial) diminuem o dano oxidativo de proteínas e lipídios no córtex do hipocampo, fígado, rim e coração, em camundongos alimentados com dieta de cafeteria. A diminuição mais pronunciada foi observada nos camundongos suplementados com suco de acerola verde (34). Os mesmos autores mostraram também que o suco de acerola também diminuiu dano ao DNA nos camundongos alimentados com dieta de cafeteria (35). Batista e colaboradores em 2018 mostrou que a suplementação da dieta com subprodutos do processamento

industrial de acerola, em ratas Wistar com dislipidemia induzida por dieta, melhora a saúde intestinal e o metabolismo lipídico (36).

Além da vitamina C, a acerola possui outros importantes compostos bioativos (CBA) como, por exemplo, catequina, quercetina, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido siríngico e ácido ferrúlico (37, 38). Estes fitoquímicos apresentam ações protetoras contra neoplasias e doenças cardiovasculares. Por exemplo, estudo mostrou que o consumo de chá-verde (*Camellia sinensis*), que contém o fito-químico epigallocatequina 3-galato, reduziu a pressão arterial na população chinesa e norueguesa (39). Em modelos experimentais, a suplementação de chá-verde reduziu a hipertrofia cardíaca, em animais com hipertensão crônica devido à doença renal (39) e também atenuou a remodelação cardíaca em ratos infartados (40). Mistura em pó formulada com acerola e chá-verde foi utilizada para avaliar as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias em modelo de inflamação in vitro, utilizando linhagem celular de macrófagos estimulada por LPS. O cotratamento foi capaz de modular os parâmetros redox nas células, além de modular a resposta inflamatória por meio da alteração da secreção de citocinas (41).

A quercetina também apresentou efeitos benéficos em modelos de agressão cardíaca. No modelo experimental de cardiomiopatia diabética, com ração rica em colesterol, o composto foi eficiente em proteger contra disfunção diastólica, além de auxiliar no controle lipídico plasmático (42). No IM, a suplementação de quercetina

11

reduziu os valores TNF- α , IL-1 β , malondialdeído, superóxido dismutase e catalase, mostrando ação anti-inflamatória e antioxidante (43).

Sendo assim, a vitamina C e os CBAs podem ter importante papel no tratamento do infarto do miocárdio, atenuando a remodelação cardíaca pós-infarto. O uso da acerola é alternativa atrativa, uma vez que possui altos teores de vitamina C e CBAs. Além disso, a interação entre vitamina C e os CBAs da acerola podem exercer ação sinérgica, potencializando os efeitos benéficos, comparado à suplementação isolada de cada composto separadamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Verificar a influência da suplementação de vitamina C e da acerola sobre a remodelação cardíaca após infarto do miocárdio em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a remodelação cardíaca por meio das seguintes análises no coração:

estrutura e função; estresse oxidativo; inflamação; e matriz extracelular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

O protocolo da pesquisa foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, em acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo 1287/2019).

Foram utilizados 136 ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, acondicionados no Biotério da Unidade de

Pesquisa Experimental (Unipex) da Faculdade de Medicina-UNESP-Botucatu. Quando os animais atingiram o peso entre 200-250 g foram submetidos ao infarto experimental de acordo com método descrito inicialmente por Heimbürger e modificado por Pfeffer e colaboradores em 1985 (7).

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 a eficácia do procedimento cirúrgico e estimar o tamanho do infarto, para assim alocar os animais dos grupos infarto de maneira homogênea.

Após o estudo ecocardiográfico inicial os animais foram alocados em gaiolas individuais e foi realizado enriquecimento ambiental conforme descrito por (44) para garantia de seu bem-estar. Eles foram expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e alocados em três grupos: grupo infarto (I), animais submetidos ao infarto experimental e alimentados com dieta padrão; grupo infarto e vitamina C (IVC), animais submetidos ao infarto experimental e alimentados com ração suplementada com vitamina C (150mg/kg); grupo infarto e acerola (IA), animais submetidos ao infarto experimental e alimentados com ração suplementada com acerola (15g/kg).

A quantidade de acerola suplementada forneceu a mesma quantidade de vitamina C que receberam os grupos suplementados apenas com esta vitamina hidrossolúvel. A ração utilizada foi a Nuvilab (Nuvital®) moída e a ingestão de ração foi controlada diariamente. Os animais foram pesados semanalmente durante todo o período experimental.

No final de três meses de acompanhamento foi realizado o estudo ecocardiográfico final. Posteriormente para as análises, os animais foram incluídos nas avaliações de acordo com o tamanho do infarto avaliado pela histologia, como proposto por Minicucci e colaboradores em 2011 (45). Os animais foram submetidos à avaliação

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

3.2 Preparo das rações

A ração utilizada para o grupo controle e para a fabricação das rações suplementadas com vitamina C e acerola foi a ração comercial para ratos a base de cereais da Nuvilab® CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brazil moída. A acerola foi processada (triturada) integralmente, sem adição de água e adicionada à ração. A vitamina C utilizada foi da marca Sigma Alderich®, própria para consumo alimentar com 99% de

pureza. Ela também foi adicionada à ração moída. Após, a ração foi misturada, peletizada e colocada para secar a temperatura ambiente. Após processo de secagem foi armazenada em freezer (-14°C).

A quantidade de acerola suplementada forneceu a mesma quantidade de vitamina C (150mg/kg de peso corporal/dia) que receberam os grupos suplementados apenas com a vitamina C.

3.3 Infarto experimental

Para realização da cirurgia de infarto experimental os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (70mg/kg) e xilazina (5mg/kg), por via intraperitoneal e foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a descendente anterior ligada, a aproximadamente 2mm 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 com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado, com aspiração do pneumotórax.

Após a cirurgia para indução do infarto, os animais ficaram sob período de observação da recuperação e receberam a analgesia com Morfina 10mg/kg por via subcutânea a cada 4h (apenas 2 aplicações); Dipirona 500mg/kg via subcutânea a cada 12h (46).

3.4 Estudo ecocardiográfico

Nos dois momentos (ecocardiograma inicial: após a cirurgia e final: após os 3 meses de acompanhamento) o procedimento foi o mesmo. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo

15
para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento Vivid S6 da General Electric Medical Systems (Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 a 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* e já validadas no modelo de ratos infartados.

As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (EDPP) 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 VE (IMVE) foi calculado pela fórmula: $[(\text{DDVE} + 2 \times \text{EDPP})^3 - \text{DDVE}^3] \times 1,04/\text{PC}$.

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 (TRIV/RR0,5). O TRIV medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral.

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada calculando-se a fração de variação de área ($\text{FVA} = \text{AD} - \text{AS} / \text{AD} \times 100$) a velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e a porcentagem de encurtamento endocárdico $[(\text{DDVE} - \text{DSVE})/\text{DDVE}]$.

3.5 Coleta de material biológico

Após os três meses de suplementação e do estudo ecocardiográfico final, foi realizada a eutanásia dos animais com dose excessiva de tiopental sódico (180 mg/kg) por via intraperitoneal e posteriormente decapitação. O sangue foi coletado, em tubo de sangue com heparina e centrifugado a 3.000 rpm, por 20 minutos a 4° C, e o plasma foi coletado e armazenado a -80° C.

O coração, pulmão e fígado dos animais foram retirados. O coração foi dissecado

em átrios (A), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Todos os órgãos e fragmentos de órgãos foram pesados. Em seguida, os corações tiveram o VE seccionado em anéis. Um anel de aproximadamente 3 mm foi seccionado de 4 a 6 milímetros a partir do ápice, pelo fato deste corte refletir a média dos resultados dos tamanhos dos infartos de corte de todo o ventrículo, e colocado em formol 10% para posterior análise histológica. Os demais foram colocados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para posteriores análises.

3.6 Estudo morfométrico

O estudo morfométrico foi realizado para avaliação do tamanho do infarto, da área seccional do miócito (ASM) (para análise de hipertrofia cardíaca) e da porcentagem de colágeno (para análise de fibrose cardíaca intersticial). Para isso, os anéis de VE fixados em solução de formol a 10% por período de 24 horas foram incluídos em blocos de parafina. Cortes de 4 micrômetros foram realizados nos blocos de parafina e corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição do tamanho do infarto e da ASM.

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.

Para a análise da ASM foram mensuradas de 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram de corte transversal, que apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula e localização na camada subendocárdica da parede muscular do ventrículo esquerdo.

Para análise da porcentagem de colágeno cortes histológicos coronais de 6 micrômetros de espessura foram corados pela técnica de *Picro Sirius red*, específicos para visualização de colágeno. Foi analisado o interstício do VE, de 20 a 40 campos por VE, utilizando objetiva de 40x.

Para aquisição de todas as imagens foi utilizado microscópio LEICA DM LS acoplado à câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de

17

programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

3.7 Determinação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo cardíaco foi avaliado por meio da análise produção de espécies reativas de oxigênio por imunofluorescência com dihidroetídio (DHE; Sigma)

(47, 48). Cortes histológicos coronais de seis micrômetros das amostras de VE fixadas em formol 10% foram desparafinizadas em soluções de xilol e etanol e posteriormente coradas com DHE. Os cortes histológicos foram encubados em 10 mmol/l de DHE (diluído em 0,01% de dimetilsulfóxido; Sigma) por 30min a 37°C em câmara escura e úmida e então lavados três vezes em tampão salina fosfato (PBS, Sigma) pH 7,4. O ProLong gold antifade reagent foi adicionado diretamente sobre os cortes para fixação e montagem das lâminas. As lâminas foram fotografadas em micrscópio de fluorescência Leica HyD confocal microscope (Leica Microsystems CMS GmbH) com câmera acoplada (Leica TCS SP5), utilizando objetiva de 40x. Posteriormente foi analisada a intensidade de fluorescência de 10 campos por animal utilizando-se o Programa ImageJ (National Institutes of Health).

3.8 Determinação dos mediadores inflamatórios

A dosagem dos mediadores inflamatórios interferon- γ (INF- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10) foi realizada pelo método de ELISA sanduíche. Primeiramente foi feita a extração da proteína do tecido cardíaco adicionando-se 1,5ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5mM 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 então 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 (1976) (49), utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

Após a extração de proteína, foi adicionado à placa solução contendo anticorpo purificado de captura anti- INF- γ ou anti-IL-10 (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Foram realizadas sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) e posteriormente adicionar 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 vão ser

18
incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas padrões, sendo 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- INF- γ ou anti-IL-10 de rato biotinilados durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas irão ser 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. A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492 nm.

3.9 Zimografia para atividade da metaloproteinase 2

A atividade da metaloproteinase 2 foi avaliada por zimografia, conforme descrição abaixo. Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em 400µl de tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X e 10 mM CaCl₂. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA) e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford(49) e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 8% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini protean, a 80 V por 2 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado 2 vezes, por 30 minutos cada vez, em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 18 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de CaCl₂, em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação, o gel foi corado com Comassie blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Os géis foram fotografados no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA), e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gel-Pro Analyzer 3.1, que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel.

3.10 Determinação da expressão protéica por Western blot

Western blot foi realizado para determinação da expressão protéica de marcadores de estresse oxidativo: glutathione peroxidase-1 (GPx-1) e heme oxigenase-1 (HO-1); do marcador de inflamação (NF-κB) total e fosforilado; e dos componentes de matriz extracelular colágenos I e III e Inibidor tecidual de metaloproteinase 2 e 4 (TIMP 2 e TIMP-4).

a) Extração do lisado celular total

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, SigmaAldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington USA). A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenado 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 (49).

b) 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 30 μ g de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema MiniProtean 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 5% e a concentração do gel de resolução variou 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%).

c) 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

20

basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação.

d) 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 1,5 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimiluminescência 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). O programa utilizado para avaliar a densidade óptica das bandas foi o Gel Pro Analyzer 3.1.

3.11 Análise estatística

Os valores obtidos são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (para distribuição normal) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal). Os resultados de cada variável foram submetidos à verificação da normalidade e de igualdade de variância. Quando esses requisitos foram atendidos as comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) de uma via, complementadas com o teste de Holm-Sidak. Quando um dos requisitos não foi atendido, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado com o ☐ teste de Dunn.

Para avaliar a mortalidade entre os animais infartados, foi utilizado o teste χ^2 . O nível de significância adotado para todos os teste foi de 5%.

Para a análise dos dados e a construção dos gráficos, foi utilizado software Sigma Plot versão 12.0 da SPSS (San Jose, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Estudo ecocardiográfico inicial

Na tabela 1 estão apresentados o peso inicial dos animais e os dados referentes

ao estudo ecocardiográfico inicial. Como podemos observar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para nenhuma variável analisada. .

Tabela 1. Peso corporal inicial dos animais e estudo ecocardiográfico inicial. **Variável I**

(n=17) IVC (n=18) IA (n= 19) p	Peso corporal inicial (g)	217(205-248)	211(199-219)	220(212-256)	0,080	Área sistólica (mm ²)	40,2±8,95	38,4±9,80	40,9±9,72	0,720	Área diastólica (mm ²)	59,4±9,55	55,0±7,77	57,0±8,00	0,293
	Tamanho do infarto (%) inicial	47,5(42,5-50,6)	48,2(45,7-52,7)	48,5(45,8-52,0)	0,773										

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. p: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis.

4.2 Fluxograma do número de animais, mortalidade e tamanho do infarto por histologia

O fluxograma do número de animais, grupos experimentais e mortalidade estão representados na figura 1. Foram utilizados inicialmente 136 ratos machos os quais foram submetidos à cirurgia de infarto. Desses 136 animais, 55 sobreviveram, sendo a mortalidade durante a cirurgia de 59,6%. Durante o período experimental de 3 meses, a mortalidade dos grupos foi de: I= 0%, IVC= 5,6% (morreu um animal) e IA=10,5% (morreram dois animais). Não houve diferença estatisticamente significativa na mortalidade entre os grupos (p= 0,370). Realizou-se a eutanásia dos animais sobreviventes e, pela análise histológica foram excluídos os infartos inferiores a 30%, restando 15 animais no grupo I, 15 animais no grupo IVC e 16 animais no grupo IA.

Na figura 2 podemos observar o tamanho do infarto analisado por meio de cortes histológicos corados com HE. Não houve diferença para o tamanho do infarto entre os grupos I, IVC e IA (I= 33 (30-38); IVC= 36(34-40); IA= 32(30-40) %; p=0,142)

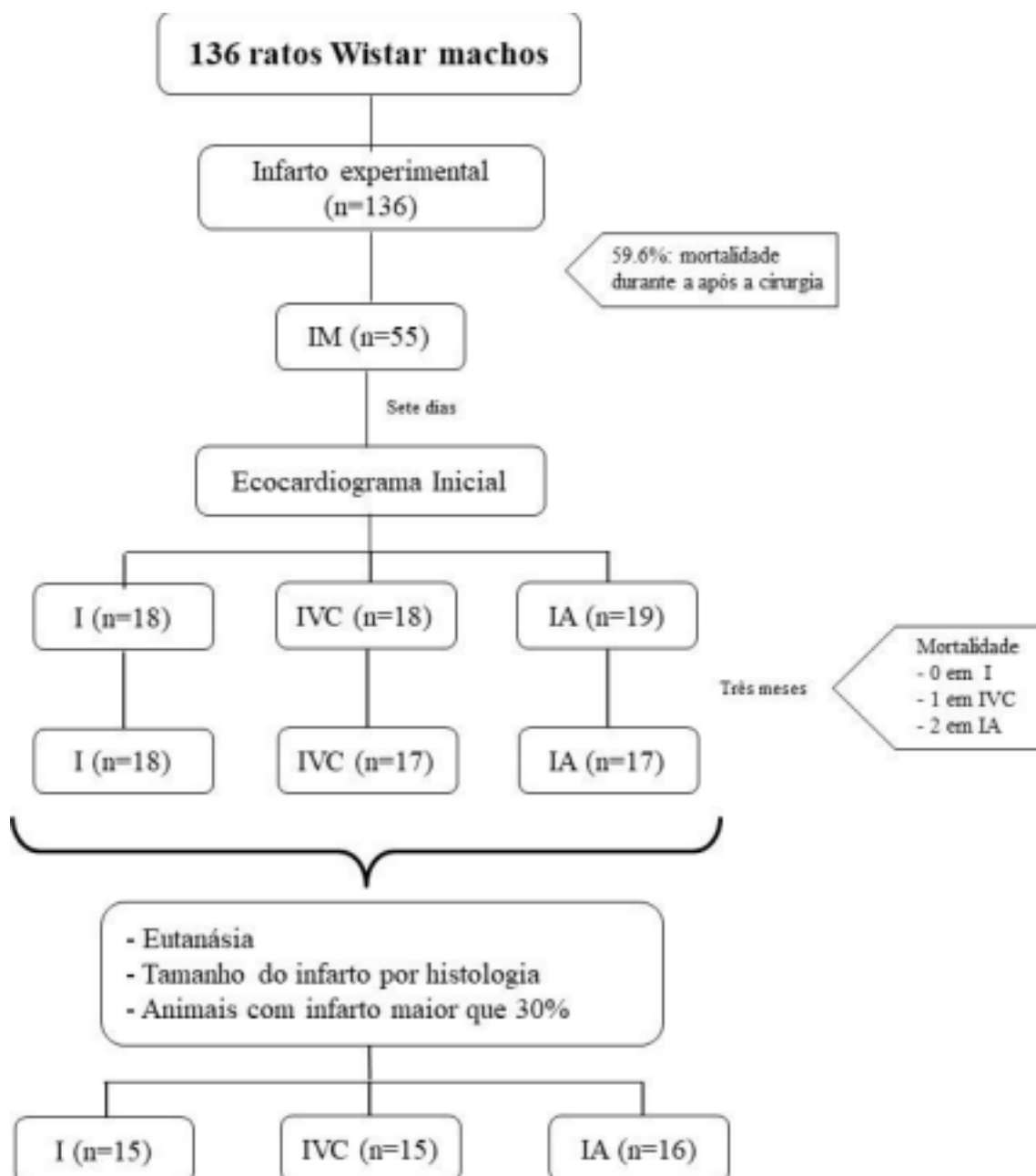


Figura 1. Delineamento, grupos experimentais, número de animais e mortalidade.

I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola.



Figura 2. Tamanho do infarto por histologia.

(A) Imagens microscópicas de cortes do ventrículo esquerdo corados com Hematoxilina e Eosina para aferição da área de infarto. (B) Tamanho do infarto (%). Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,142. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC

(n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola.

4.3 Peso corporal final dos animais e ingestão de ração

Os dados referentes ao peso final dos animais e à ingestão de ração estão apresentados na tabela 2. Não houve diferença entre os grupos para o peso corporal, final e para a ingestão de ração.

Tabela 2. Peso corporal final dos animais e ingestão de ração.

Variável	I (n=15)	IVC(n=15)	IA (n= 16)	p
Peso corporal final (g)	396(376-496)	388(375-426)	395(368-443)	0,461
Ingestão de ração(g/dia)	26,1(25,0-28,1)	25,5(25,0-27,1)	26,2(25,3-27,4)	0,713

Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. p: valor de p do teste de Kruskal Wallis.

4.4 Estudo ecocardiográfico final

Nas tabelas 3, 4 e 5 estão representadas as variáveis cardíacas de estrutura, função sistólica e função diastólica, analisadas pelo ecocardiograma. Com relação às alterações estruturais podemos observar diminuição do AE (figura 3), em valores absolutos, e do DSVE (figura 5) nos animais suplementados com VC e acerola, quando comparados aos animais infartados. Quando o AE foi normalizado pelo AO, este foi menor apenas no grupo suplementado com acerola comparado ao grupo I (figura 4). Da mesma forma, a ESSV foi maior apenas no grupo suplementado com acerola comparado ao grupo I (figura 6). Para as demais variáveis de estrutura cardíaca, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Com relação às variáveis de função sistólica, houve aumento da FE e da % de encurtamento endocárdico em ambos os grupos suplementados quando comparados ao grupo I (Figura 7 e 8). Por outro lado, a VEPP foi maior apenas no grupo IA comparado ao I (Figura 9). Além disso, houve redução do IPM no grupo IA em relação ao grupo I (Figura 10). As demais variáveis não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Para a análise de função diastólica podemos observar maiores valores de E'médio (figura 11) e da razão E'/A' (figura 12) no grupo suplementado com acerola comparado ao I. Não houve diferença estatisticamente significativa para as demais variáveis de função diastólica.

25

Tabela 3. Variáveis estruturais cardíacas

Variável	I(n=15)	IVC(n=15)	IA(n=16)	p
AE (mm)	5,36 (5,36-5,88)	4,85 (4,63-5,11)*	4,85 (4,6-5,24)*	0,004
AO (mm)	3,83 (3,58-4,03)	3,83 (3,58-3,83)	3,83 (3,58-4,09)	0,943
AE/AO	1,49 (1,37-1,53)	1,29 (1,25-1,41)	1,28 (1,19-1,36)*	0,008
AE/PC	21,2±2,88	20,0±2,37	12,7±2,30	0,488
DSVE (mm)	5,90±1,22	4,78±1,27*	4,71±1,42*	0,027
DDVE (mm)	8,77±0,97	8,22±1,22	8,14±0,76	0,178
DDVE/PC(mm/kg)	21,2±2,88	20,0±2,37	20,5±2,74	0,488
EDPP	1,53(1,50-1,65)	1,53(1,53-1,65)	1,56(1,53-1,67)	0,554
ERPP	0,36 (0,34-0,38)	0,38(0,33-0,46)	0,40(0,37-0,42)	0,103
ESSV (mm)	2,04(1,79-2,30)	2,40(2,14-2,80)	2,50(2,30-281)*	0,022
MEV (mg)	1076±244	952±238	957±150	0,210
IMVE (mg/g)	2,57±0,49	2,29±0,40	2,39±0,36	0,205

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta; PC: peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDPP: espessura diastólica da parede

Tabela 4. Variáveis ecocardiográficas de função sistólica.

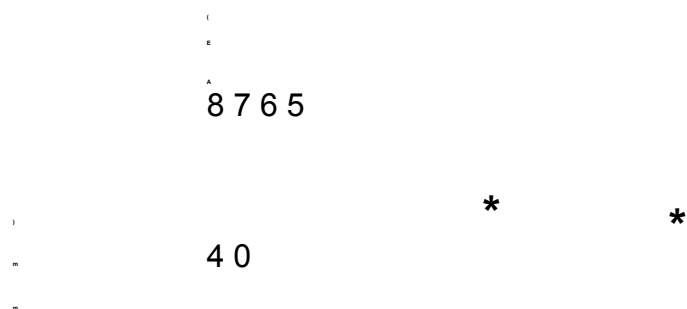
Variável	C(n=15)	VC(n=15)	A(n=16)	p	FC (bpm)	338±71,9	348±64,8	327±82,6	0,729
FE	0,69±0,09	0,80±0,08*	0,79±0,12*	0,013	% Enc. Endo	33,3±7,99	42,6±8,30*		
	42,9±12,9*	0,014	FVA	34,5±12	42,7±11,8	42,7±11,5	0,119	IPM	0,56 (0,33-0,76) 0,33
	(0,28-0,69)	0,23 (0,17-0,43)*	0,006	VEPP (mm/s)	41,5±12,6	49,2±12,3	53,9±14,9*		
	0,044	DC	155±38,0	158±61	136±35,7	0,549	S' médio (cm/s)	4,37±0,51	4,88±0,47
	4,96±0,50	0,106							

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. FC: frequência cardíaca; FE: fração de ejeção; % Enc. Endo: % encurtamento endocárdico; FVA: fração de variação da área; IPM: Índice de Performance Miocárdica; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; DC: débito cardíaco; S'médio: média da velocidade mitral anular sistólica septal e lateral inicial. p: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis. * ≠ do grupo I.

Tabela 5. Variáveis ecocardiográficas de função diastólica.

Variável	I(n=15)	IVC(n=15)	IA(n=16)	p	Onda E (cm/s)	80,2±17,9	78,3±20,5	79,2±15,7	
	0,962	Onda A (cm/s)	64,9±23,9	68,7±22,8	52,6±22,7	0,139			
	E/A	1,36 (0,88-1,58)	1,24 (0,84-1,41)	1,51 (1,28-1,94)	0,096	TRIV (ms)	32,0 (25,2-37,0)		
	30,0 (22,0-30,0)	24,5 (21,0-30,0)	0,059	TRIV/RR	74,4 (58,3-87,9)	60,7 (53,6-77,1)	63,3 (46,1-73,8)	0,073	TDE (ms)
	49,6±9,41	48,3±8,91	50,4±12,3	0,851	E'medio (cm/s)	4,05±0,73	4,66±1,01	4,86±0,89*	0,039
	A'medio (cm/s)	5,1 (4,28-5,63)	5,20 (4,64-5,63)	4,53 (3,9-5)	0,105	E'/A'	0,85±0,27	0,89±0,19	1,12±0,34* [#] 0,015
	E/E' médio	19,9±3,81	17,3±4,70	16,5±3,47	0,057				

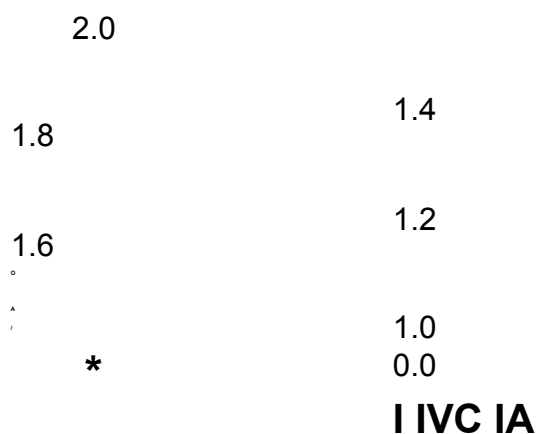
Dados expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. Onda E: onda E do fluxo transmitral; Onda A: onda A do fluxo transmitral; E'médio: média da velocidade mitral anular diastólica septal e lateral inicial; A'médio: média da velocidade mitral anular diastólica septal e lateral final. TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/R-R: TRIV normalizado para a frequência cardíaca (TRIV dividido pela raiz quadrada do R-R); TDE: tempo de desaceleração da onda E. p: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis. * ≠ do grupo I; [#] ≠ do grupo IVC.



I IVC IA

Figura 3. Diâmetro do átrio esquerdo.

Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,004. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.



I IVC IA

Figura 4. Razão entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,008. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

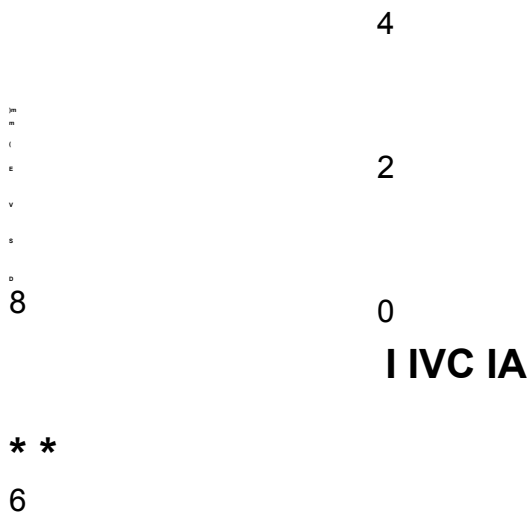


Figura 6. Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,027. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

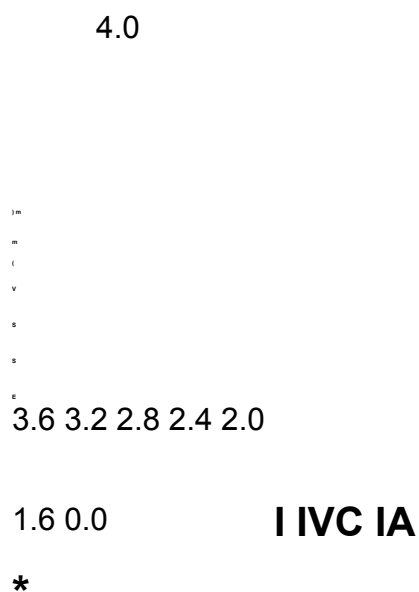


Figura 5. Espessura sistólica do septo interventricular. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,022. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

0.2

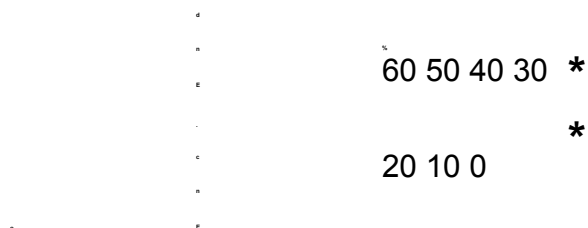
0.0

Figura 7. Fração de Ejeção.

**

I IVC IA

Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,013. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.



I IVC IA

Figura 8. % Encurtamento Endocárdico.

Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,014. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

30

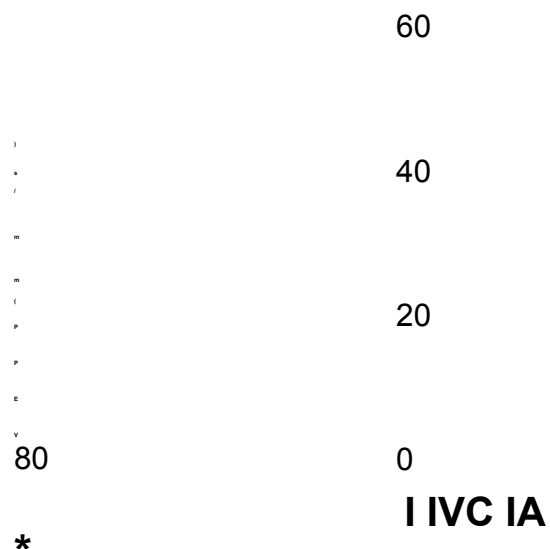
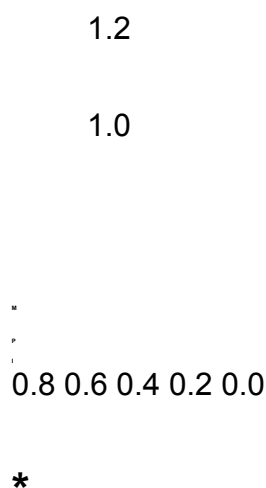


Figura 9. Velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo.

Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,044. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.



I IVC IA

Figura 10. Índice de Performasse Miocárdica.

Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,006. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

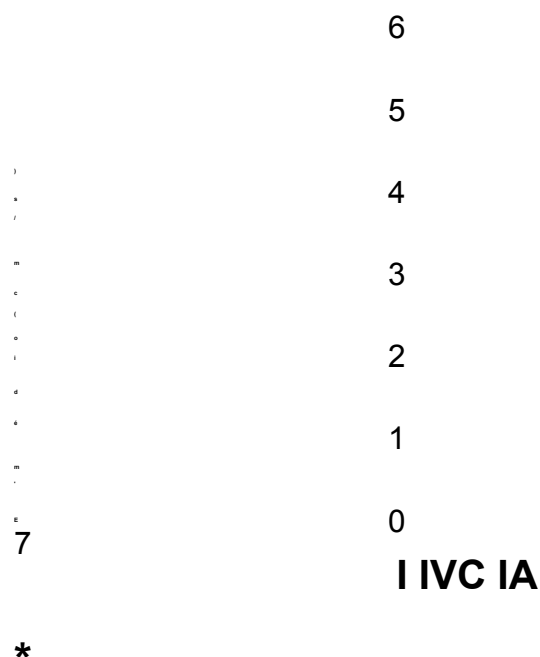


Figura 11. Média da velocidade mitral anular diastólica septal e lateral inicial. Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,039. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

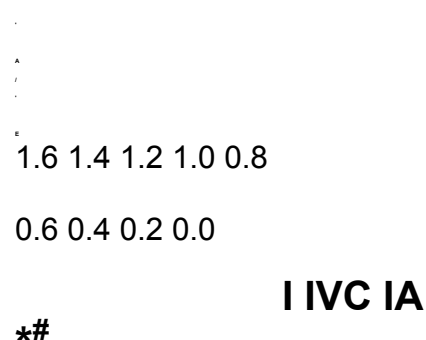


Figura 12. Razão da média da velocidade mitral anular diastólica septal e lateral inicial e final. Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,015. I(n=15): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=15): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I; # ≠ do grupo IVC.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para nenhuma variável morfométrica analisada, conforme apresentado na tabela 6.

Tabela 6. Variáveis morfométricas.

Variável	I (n=15)	IVC (n=15)	IA (n=16)	p
A (mg)	60,5(37,4-76,0)	52,3(39,1-91,7)	27,1(43,7-66,0)	0,842
A/PC (mg/g)	0,12(0,10-0,15)	0,13(0,09-0,19)	0,14(0,10-0,16)	0,727
VD (mg)	181(158-210)	177(151-220)	175(155-192)	0,798
VD/PC (mg/g)	404(381-472)	432(393-506)	445(381-472)	0,598
VE (mg)	761±82,2	722±90,7	720±59,0	0,273
VE/PC (mg/g)	1753(1624-1887)	1789(1669-1893)	1805(1680-1900)	0,790

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitaminas C; IA: animais infartados suplementados com acerola. A: átrios; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis.

4.6 Análise Histológica

Na tabela 7 estão apresentados os dados de área do miócito, que é uma análise da hipertrofia de VE; a porcentagem de colágeno total, que é uma análise da fibrose intersticial cardíaca; e a coloração com dihidroetídio, que avalia a quantidade de espécies reativas de oxigênio. Como podemos observar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 7. Análise histológica.

	Variável	I	IVC	IA	p
% Colágeno total	3,33±0,71	3,52±1,01 (6)	3,32±0,98	(6)	0,911
	(7)				

Dados expressos em média ± desvio padrão. Números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. p: valor de p da ANOVA de 1 via.

4.7 Mediadores inflamatórios.

Como podemos observar na tabela 8, a citocina anti-inflamatória interleucina-10 apresentou diferença estatisticamente significativa, entretanto, o pós teste de

Holm-Sidak não conseguiu mostrar entre quais grupos estava a diferença. O que podemos observar é que os valores de interleucina-10 estão maiores nos animais suplementados com acerola. Para os mediadores inflamatórios INF- γ e TNF- α , não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 8. Citocinas inflamatórias.

Variável I IVC IA p

IL-10 (pg/mg)	543 $\pm$ 237 (14)	1,42(0,78-1,72) (15) 568 $\pm$ 164 (14)	(16) 0,042 5,92(4,44-10,7)
INF- γ (pg/mg)			(15) 0,572 1,67(1,35-2,77)
5,42(4,32-6,65) (15)		6,08(4,39-6,97) (15)	
		1,33(1,25-1,78) (14)	(16) 0,119
TNF- α (pg/mg)		753 $\pm$ 292	

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. Números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. IL-10: Interleucina-10; INF- γ : Interferon- γ ; TNF α : Fator de necrose tumoral α . p: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis.

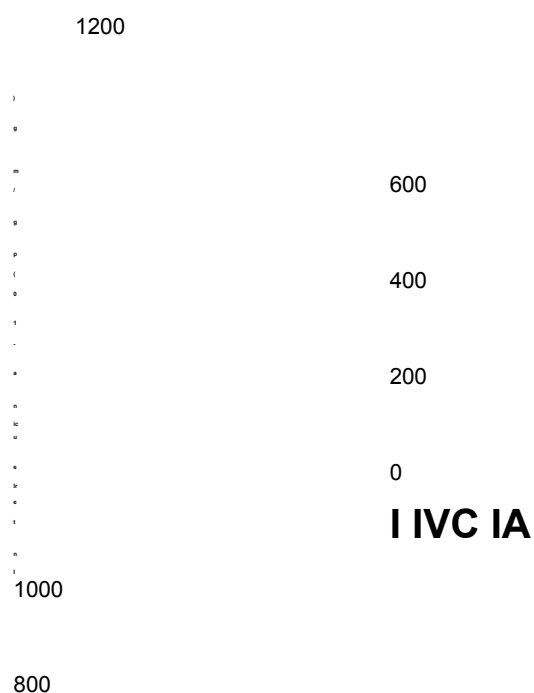


Figura 13. Interleucina-10.

Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste ANOVA de 1 via = 0,042. I(n=14): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=14): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=16): animais infartados suplementados com acerola.

4.8 Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2)

Os resultados referentes à avaliação das MMP-2 estão apresentados na tabela 9. Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as

bandas ativa, ativa intermediária, inativa, total, nem para as relações realizadas entre elas.

Tabela 9. Metaloproteinases de matriz 2.

Variável	I(n=12)	IVC(n=15)	IA(n=15)	p
Ativa (ua)	1,00(0,89-1,12)	0,99(0,96-1,48)	1,19	
(0,85-1,42)	0,799	Ativa intermediária (ua)	1,013±0,099	1,002±0,181
			1,013±0,256	0,983
Inativa (ua)	1,00 (0,97-1,09)	1,06(0,99-1,27)	1,00 (0,83-1,16)	0,513
Ativa/Inativa	1,00(0,90-1,15)			
	1,01(0,75-1,22)	1,16(0,80-1,26)	0,666	
Ativa + Ativa intermediária/Inativa	2,00(1,93-2,07)	1,96(1,61-2,08)	1,91(1,69-2,47)	0,778
Total (ua)	3,00(2,99-3,07)	3,24(2,96-3,67)	3,02 (2,75-3,38)	0,498
Ativa/Total	0,33±0,04			
	0,34±0,06	0,36±0,07	0,542	
Ativa + Ativa intermediária/Total	0,66(0,66-0,67)	0,66(0,61-0,67)	0,65(0,63-0,71)	0,778

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. n: número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. p: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis.

4.9 Avaliação da expressão proteica por Western blot

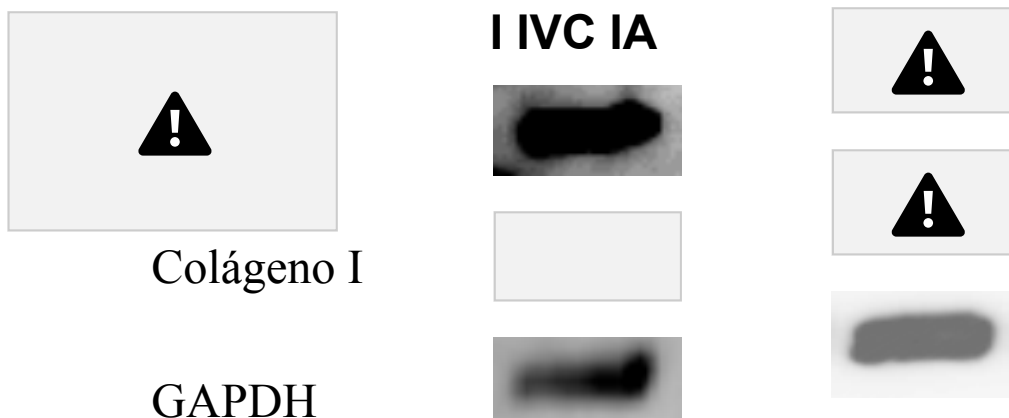
Os resultados da expressão das proteínas GPx, HO-1, NF-κB, colágenos I e III, e TIMP-2 e 4, estão apresentados na tabela 8. A suplementação de vitamina C e acerola não alterou a expressão das proteínas antioxidantes GPx e HO-1, nem tampouco do fator de transcrição NF-κB, nem em quantidades totais, nem na sua forma fosforilada, nem na relação fosforilada/total. Para as proteínas relacionadas à matriz extracelular, podemos observar menores valores de colágeno 1 no grupo IVC quando comparado aos ao grupo I (figura 14), e menores valores de colágeno 3 em ambos os grupos suplementados (figura 15). Para a variável TIMP-2 foi possível observar redução dos valores quando os grupos suplementados são comparados ao grupo que recebeu somente ração padrão (Figuras 16). Para o TIMP-4, apenas os valores do grupo IVC foram menores quando comparados ao grupo I (figura 17).

Tabela 10. Expressão proteica por Western blot

Variável I IVC IA P

GPx-1 (ua) 1,86±0,34 (15)	TIMP-2 (ua) 0,90(0,53-1,55) (14)	1,83±0,44 (16) 0,142 8,12(7,39-10,2)
HO-1 (ua) 11,2(6,16-19,0) (15)	TIMP-4 (ua) 1,18±0,39 (14)	(16) 0,521 48,7±2,29
DHE(densidade ótica) 50,8±1,87 (6)	1,57±0,53 (12)	(6) 0,154 0,22(0,14-0,57)
p-NF-κB (ua) 0,45(0,07-1,00) (15)	10,3(7,78-15,0) (12)	(13) 773 0,03(0,01-0,24)
p-NF-κB/NF-κB (ua) 0,11(0,03-0,27) (15)	29,7±9,12 (5)	(13) 0,456 1,06(0,61-1,77)
Colágeno 1 (ua) 1,63(1,38-2,52) (13)	0,43(0,22-0,60) (14)	(13) 0,020 5,79±1,72*
	0,17(0,01-0,24) (14)	(13) 0,018 0,45(0,25-0,62)*
Colágeno 3 (ua) 7,60±2,28 (13)	0,97(0,82-1,27)* (10)	(13) 0,004 0,85±0,19*
	5,56±1,29* (10)	(13) 0,042
	0,36(0,19-0,50)* (11)	
	1,00±0,34 (11)	

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e percentil 25 e 75. Números entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo. I: animais infartados que receberam ração padrão; IVC: animais infartados suplementados com vitamina C; IA: animais infartados suplementados com acerola. GPx-1: glutathione peroxidase 1; HO-1: heme-oxigenase 1; NF κB: fator nuclear Kappa B; p-NF-κB: fator nuclear Kappa B fosforilado; TIMP-2: inibidor tecidual de metaloproteinase 2; TIMP-4: inibidor tecidual de metaloproteinase 4. p: valor de p da ANOVA de 1 via ou Kruskal Wallis. * ≠ do grupo I.





70 kDa 37 kDa

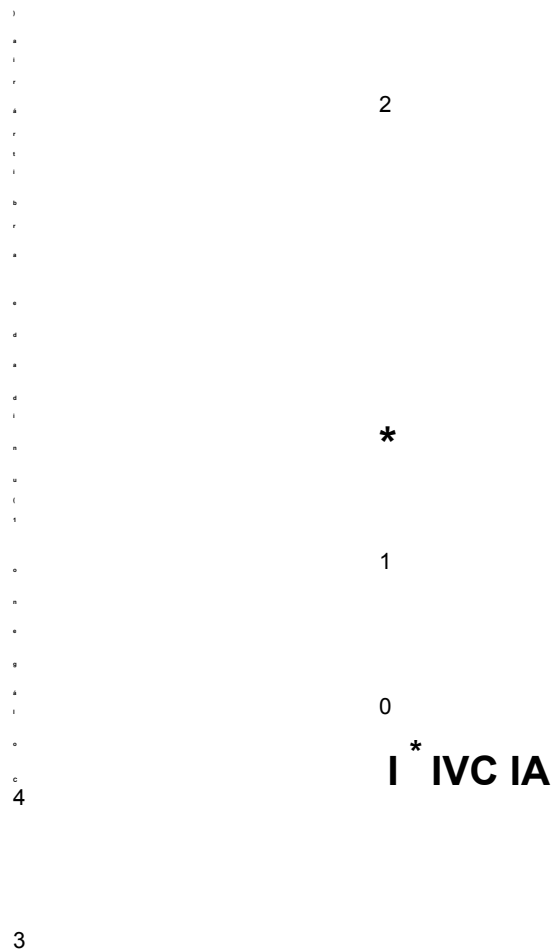
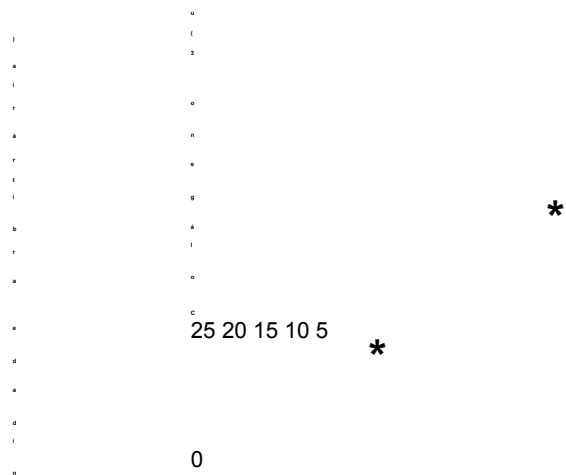
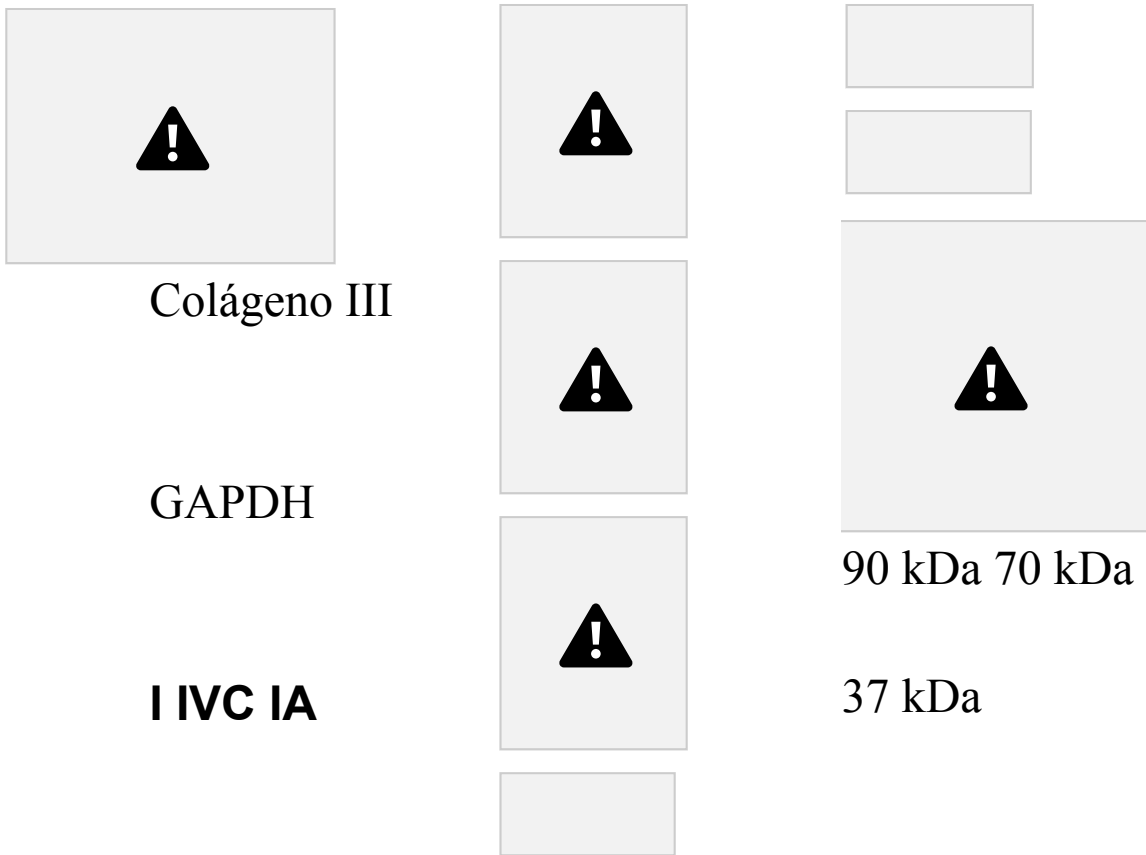


Figura 14. Expressão do colágeno I.

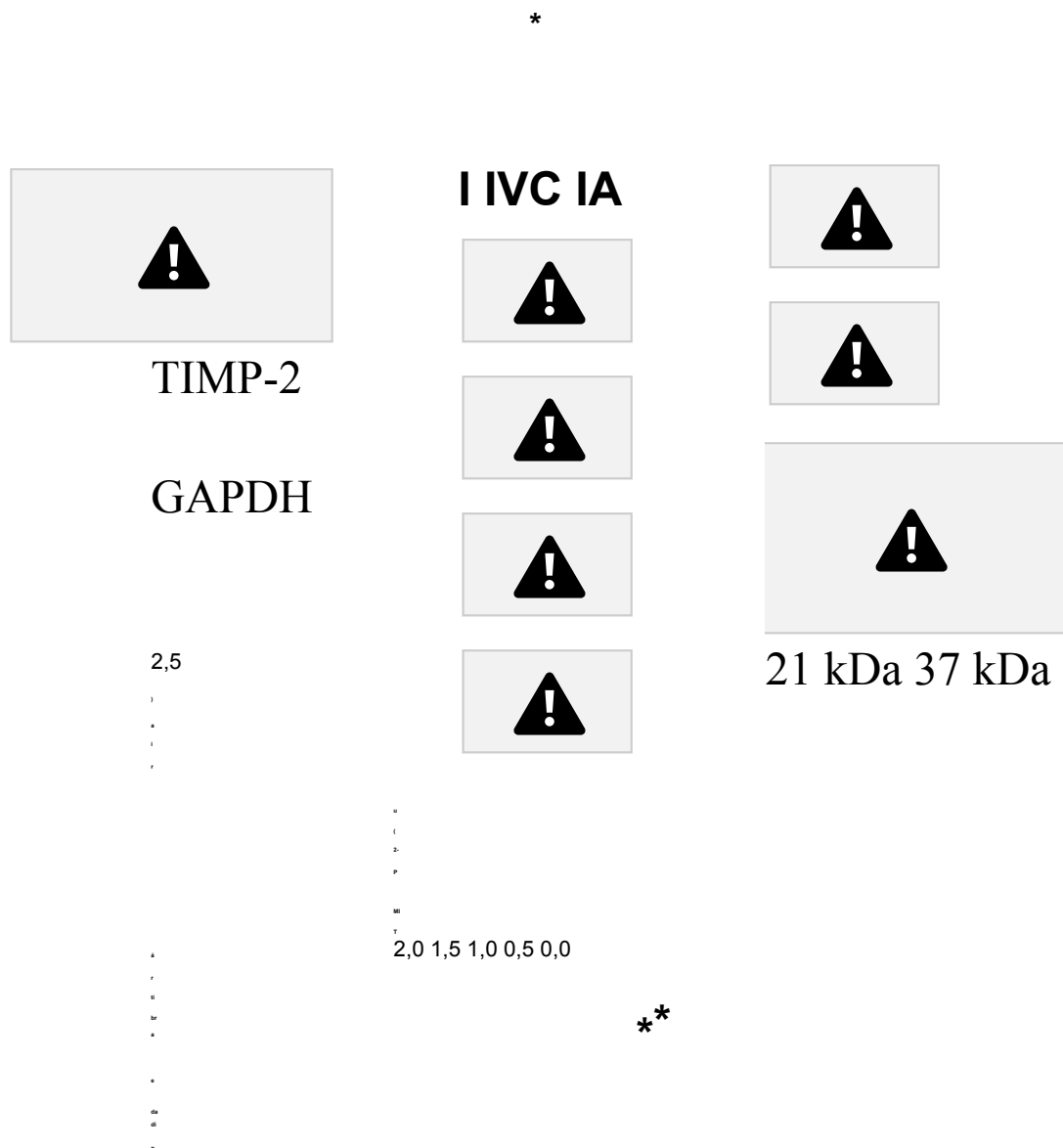
Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,020. I(n=13): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=10): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=13): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.



I IVC IA

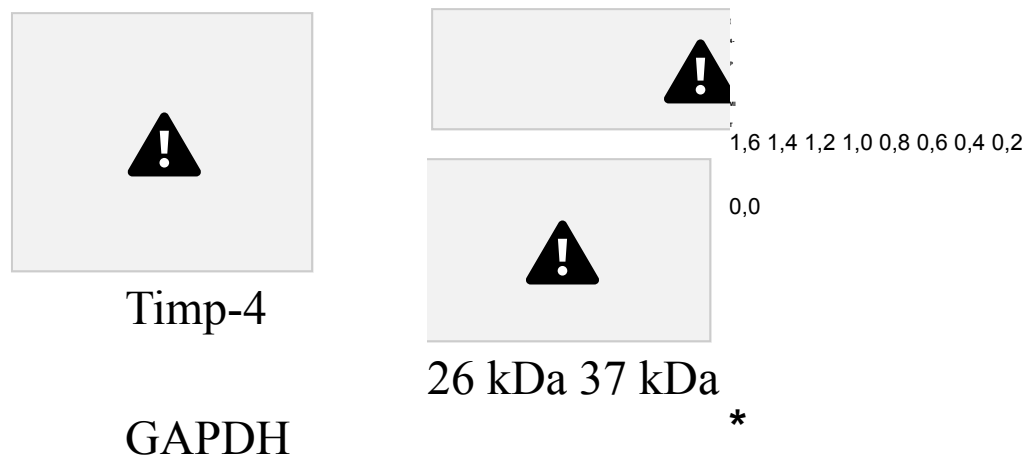
Figura 15. Expressão do colágeno III.

Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,018. I (n=13): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=10): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=13): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.



I IVC IA

Figura 16. Expressão do Inibidor tecidual de metaloproteinase-2. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,0004. I (n=13): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=10): animais infartados suplementados vitamina C; IA (n=13): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.



39

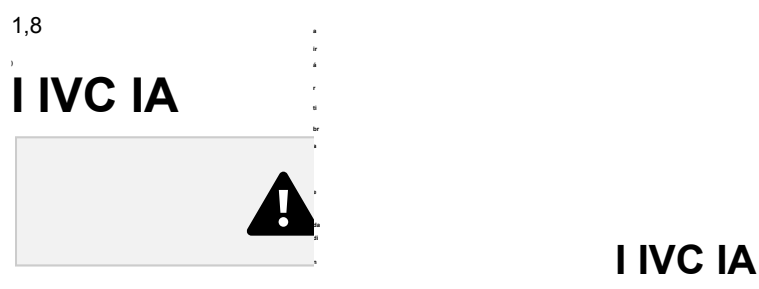


Figura 17. Inibidor tecidual de metaloproteinase-4. Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p do teste de Kruskal Wallis = 0,042. I (n=13): animais infartados que receberam ração padrão; IVC (n=10): animais

infartados suplementados vitamina C; IA (n=13): animais infartados suplementados com acerola. * ≠ do grupo I.

40

5. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a suplementação de vitamina C e acerola por três meses em ratos submetidos a infarto experimental leva a alterações nos marcadores de estresse oxidativo avaliados. Entretanto, a suplementação de acerola aumenta a citocina antiinflamatória IL-10. Adicionalmente, a suplementação de vitamina C e acerola remodelam a matriz extracelular cardíaca, com diminuição dos colágenos I e III e dos TIMP-2 e 4, porém, sem alteração na atividade da MMP-2. Juntas, essas alterações podem ter participado da melhora de função sistólica e diastólica observada nesses animais.

Em nosso estudo não houve diferença para o peso corporal inicial e final, e para o consumo diário de ração. A ausência de diferença estatisticamente significativa para o peso corporal é importante, uma vez que as avaliações morfológicas cardíacas podem ser alteradas conforme o peso corporal dos animais. O consumo diário de ração semelhante entre os grupos também é importante, para ingestão semelhante dos compostos da ração e de vitamina C entre os grupos IVC e IA.

No presente estudo utilizamos apenas os animais que apresentaram área de infarto avaliada pela análise histológica maiores que 30% (45). Há vários modelos para o estudo do infarto experimental em ratos, entretanto o método da oclusão coronariana esquerda possui várias vantagens, a principal é a similaridade das alterações fisiopatológicas que ocorrem após o infarto em humanos. Neste modelo é importante identificar o tamanho do infarto porque este induz diretamente às alterações fisiopatológicas como remodelação ventricular, disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca. Desta forma, ratos com infartos menores que 30% não apresentam grandes anormalidades hemodinâmicas (45)

Os resultados obtidos na comparação do tamanho do infarto entre o grupo I, IVC

e IA não foram diferentes. Nosso modelo de infarto apresenta uma característica importante que é a variação do tamanho do infarto, entre 4% a 65%. Isto acontece devido à incapacidade de obstruir a coronária exatamente no mesmo ponto em todos os animais e de eventuais variações anatômicas entre eles. Dessa maneira, esse modelo não é adequado para a verificação de efeito redutor de tamanho do infarto por meio de diferentes intervenções, já que eventuais diferenças no tamanho do infarto podem ser inerentes à variabilidade do método (45, 50).

Em nosso estudo utilizamos a avaliação ecocardiográfica para analisar a morfologia e a função sistólica e diastólica do coração. Após os 3 meses de suplementação com

41

vitamina C e acerola, não foi possível observar alterações na morfologia cardíaca. Entretanto, observamos melhora de função sistólica, pelo aumento da fração de ejeção e da % de encurtamento endocárdico, nos animais suplementados com vitamina C e acerola, além de menor diâmetro sistólico do VE. Essas alterações melhoram o volume de sangue ejetado do coração, o qual é prejudicado no IM (51).

Em relação aos efeitos da suplementação de vitamina C e acerola nas variáveis de função diastólica, em nosso estudo os animais do grupo IVC e IA apresentaram diminuição do diâmetro do AE em valores absolutos. Quando esta variável é normalizada pelo diâmetro da aorta, apenas o grupo IA permanece apresentando diferença estatisticamente significativa. Estudos têm mostrado que a dilatação do AE está relacionada à disfunção diastólica do VE (52, 53). Alterações no relaxamento e na complacência do VE promovem elevação da pressão de enchimento do VE. Consequentemente, ocorre elevação da pressão no AE para manter o enchimento ventricular. O aumento da tensão parietal leva à dilatação da câmara atrial. Portanto, o tamanho do AE pode funcionar como marcador da cronicidade da disfunção diastólica (52, 53).

Outras variáveis ecocardiográficas utilizadas para caracterizar a diástole ventricular são as variáveis analisadas pelo Doppler tissular, como a velocidade da onda E', A' e sua relação E'/A'. Em nosso estudo, os animais suplementados apenas com a acerola apresentaram aumento do E'médio e da relação E'/A', mostrando melhora da função diastólica nesses animais (54).

Ainda com relação à função cardíaca, o IPM diminuiu apenas com a suplementação de acerola. O IPM é definido como a razão entre a soma dos tempos de contração e relaxamento isovolumétrico pelo tempo de ejeção, variáveis que podem ser obtidas pela técnica de Doppler. Como este índice associa parâmetros sistólicos e diastólicos, ele é considerado como índice de função sistodiastólica e é mais prático para o diagnóstico

da disfunção global cardíaca do que a avaliação desses índices isoladamente (55, 56). O IPM tem sido usado como um método bastante sensível e específico para a análise da função do ventrículo esquerdo em estudos de várias patologias cardíacas, e mostrou ter importante valor prognóstico em doenças cardíacas graves, como o IM. Valores de IPM mais altos correspondem a estados patológicos mais graves, com quadro cardíaco geral de disfunção (57). Sendo assim, a diminuição do IPM com a suplementação de acerola representa uma melhora da função cardíaca nesses animais.

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

42

quanto a não infartada. Essas alterações são definidas como remodelação cardíaca (7). Elas podem ser decorrentes de mudanças genéticas, estruturais e bioquímicas que ocorrem no coração em resposta à isquemia, tais como: estresse oxidativo, inflamação, remodelação da matriz extracelular, alterações no metabolismo energético e apoptose (58)(Zornoff, Paiva et al. 2009). Após a isquemia miocárdica ocorre aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs lesam diretamente as membranas celulares, ativam a resposta inflamatória e levam a morte celular, além de estimular sinais de transdução, como fator nuclear κB (NF- κB). Por sua vez, a ativação do NF- κB produz citocinas inflamatórias, como TNF- α , interleucinas 1b e 6. Progressivamente, as EROs e as citocinas ativam metaloproteinases e estimulam a deposição anormal de colágeno, que contribuem para reparação do tecido lesado e formação da cicatriz do infarto (59, 60). O conjunto dessas adaptações pode levar a alterações na massa, no volume e na geometria ventricular. Inicialmente, essas alterações são importantes para a manutenção da função cardíaca. No entanto, cronicamente pode causar disfunção diastólica e/ou sistólica e consequente aparecimento dos sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e/ou morte súbita (61).

Com relação à alteração de estresse oxidativo, no IM ela ocorre tanto na região infartada como não infartada (58, 62), e este aumento é observado na fase aguda do infarto, como pode se estender durante a progressão do infarto, remodelação cardíaca até o aparecimento da IC (63). O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio de produtos oxidativos, e de defesas antioxidantes. Com o aumento de ER o organismo conta com sistema antioxidante que neutraliza a ação das mesmas, impedindo o dano oxidativo celular. A primeira linha de defesa é composta pelas enzimas superóxido dismutase, GPx e catalase, que vão reduzir as ERO até a formação de H₂O (64). Em condições de estresse oxidativo celular mais intenso, em adição aos sistemas antioxidantes enzimáticos citados acima, a célula também dispõe de enzimas antioxidantes de fase II, como exemplo a HO-1 (65).

Em nosso estudo não foi possível observar diminuição do EO com a suplementação de vitamina C e acerola, após o IM, a partir das variáveis analisadas. Não houve diminuição do DHE, nem aumento das proteínas antioxidantes GPx e HO-1. O DHE é um composto fluorogênico muito utilizado para detecção intracelular de espécies reativas, especialmente o ânion superóxido. Ele é permeável à membrana celular e no citoplasma, exibe baixa fluorescência azul. Ao ser oxidado pelas espécies reativas, o DHE forma produtos altamente fluorescentes. Esses produtos, em especial o cátion Etídio, migram para o núcleo, onde possuem alta afinidade pelas moléculas de DNA. No

43

núcleo eles se intercalam às moléculas de DNA, exibindo alta fluorescência vermelha, devido à mudança na conformação química da molécula. (66).

Tanto a vitamina C quanto a acerola, possuem papel antioxidante (15, 23, 26, 34, 41, 67, 68). No caso da vitamina C, este papel antioxidante foi observado inclusive em estudos após o IM em ratos (26, 67, 68). Entretanto, os trabalhos experimentais com IM e suplementação de vitamina C, que observaram papel antioxidante desta vitamina, foram todos com infarto induzido por isoproterenol, e a suplementação ocorreu na fase aguda ou de cicatrização (0 a 7 dias após o IM) e na fase inicial da remodelação (até 21 dias após o IM), enquanto em nosso trabalho, as variáveis relacionadas à análise de estresse oxidativo foram dosadas em uma fase tardia da remodelação, ou seja, na fase crônica do infarto. Essas diferenças entre os modelos, o tempo de suplementação a fase em que a análise foi realizada podem ter influenciado nas diferenças observadas entre nosso estudo e os trabalhos da literatura. Entretanto, a realização de mais análises de estresse oxidativo, em nossos animais, são necessárias para podermos confirmar os dados observados até o momento.

A matriz extracelular do miocárdio desempenha um papel importante na manutenção da integridade estrutural e funcional do coração e está centralmente envolvida no reparo da cicatriz pós IM. Ela é formada por complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos altamente organizados que contribui para o desenvolvimento estrutural e integridade funcional do coração. Dentre os compostos estão os colágenos I e III (69-71). O colágeno é a principal proteína estrutural da matriz extracelular cardíaca, sendo os principais colágenos fibrilares os tipos I e III. Assim, 85% do colágeno total é do tipo I, que está associado principalmente a fibras espessas que conferem resistência à tração e resistência ao estiramento e à deformação, enquanto 11% do colágeno total é do tipo III, que está associado a fibras finas que conferem resiliência. A biossíntese de colágeno envolve várias enzimas e etapas, e a vitamina C

é cofator requerido pela prolil e lisil hidroxilase, enzimas chave para a formação dos colágenos. É importante lembrar que a remodelação da matriz extracelular cardíaca após o IM depende tanto da quantidade quanto do tipo de colágeno, quanto da organização tridimensional dessas proteínas e das demais proteínas da matriz extracelular (72).

No coração normal, a síntese e degradação da matriz extracelular, também chamada de remodelação da matriz extracelular, é um processo contínuo e rigidamente regulado. O principal sistema proteolítico envolvido na degradação da matriz é o sistema de metaloproteinase de matriz. (69-71). Há mais de 20 tipos diferentes de MMPs, as quais são classificadas em 5 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna: collagenases (MMP- 1, 8, 13 e 18), gelatinases

44

(MMP-2 e 9), estromelisinases (MMP - 3, 10 e 11), tipo-membrana (MT-MMP 1 a 4, 14 a 17) e a matrilisina (MMP- 7). As MMP-2 e -9 degradam os colágenos fibrilares desnaturados, outros tipos de colágeno e elastinas (69-71).

Como os MMPs degradam vários componentes da matriz extracelular, uma regulamentação rígida da atividade de MMP é essencial para evitar a degradação excessiva da matriz. Um grupo de endógenas proteínas, inibidores de tecido de metaloproteinases (TIMP-1, -2, -3 e -4), regulam firmemente a atividade de MMP. Os TIMPs se ligam ao sítio ativo dos MMPs em uma razão molar estequiométrica de 1: 1, bloqueando assim o acesso aos substratos da matriz extracelular. Embora os TIMPs sejam expressos em várias células em diferentes órgãos, o TIMP-4 apresenta um elevado nível de expressão no tecido miocárdico humano, sendo por isso também denominado inibidor cardíaco de MMPs (69-71). Os TIMP-2 e 4, são responsáveis por inibir a atividade da MMP-2 (73)

No presente estudo não observamos alteração na atividade da MMP-2 nos animais suplementados com vitamina C e acerola. Entretanto, observamos diminuição da expressão proteica dos: TIMP-2 e do colágeno III, em ambos os grupos suplementados; TIMP-4 com a suplementação de acerola; e colágeno I com a suplementação de vitamina C. Isto mostra que houve remodelação da matriz extracelular nos animais suplementados com vitamina C e acerola.

As alterações que ocorrem na matriz extracelular após o IM são extremamente complexas. Elas são dependentes do local onde estão acontecendo, ou seja, se estão na região infartada, nas bordas do infarto, ou na área não infartada; e do momento em que ocorrem, fase aguda, fase de início da remodelação ou fase crônica. Por exemplo, na fase aguda do infarto há aumento da atividade de MMPs, para que haja degradação

da matriz extracelular na região infartada, síntese de colágeno e formação do tecido cicatricial (69). Estes eventos são extremamente importantes para que não ocorra ruptura ventricular, o que é um agravo sério e fatal do IM (69). Entretanto, o acúmulo excessivo de colágeno, principalmente na região não infartada, leva à fibrose cardíaca, enrijecimento do coração e piora de função ventricular. Com o aumento na atividade das MMPs, aumenta a expressão dos TIMPs. Com a progressão da remodelação cardíaca e início da fase crônica do infarto, a atividade de algumas MMPs diminui, principalmente na região do infarto, enquanto outras podem aumentar. O mesmo pode acontecer com o TIMPs (69). Com relação especificamente à MMP-2 e ao TIMP-2, a MMP-2 aumenta e o TIMP-2 diminui na fase crônica do infarto, mas, na área infartada (74, 75).

Não encontramos na literatura trabalhos com vitamina C e acerola no IM, que avaliassem a atividade da MMP-2 e a expressão dos TIMP-2 e 4. Em outras situações

45

patológicas a vitamina C diminuiu a atividade da MMP-2 (76) e aumentou a expressão do TIMP-2 (77).

Com relação ao processo inflamatório durante a remodelação cardíaca pós IM. Na fase aguda do IM inicia-se resposta inflamatória aguda na área infartada, pois ocorre migração de células inflamatórias como monócitos, neutrófilos e macrófagos. Esse processo inflamatório induz resposta imune inata e produção e liberação de mediadores pró- inflamatórios, como: óxido nítrico sintase, IL-6, IL- 1b, IL-12a; que auxiliam na resolução da lesão no coração. Entretanto, na fase tardia ou de resposta reparativa, os macrófagos respondem com uma expressão mais elevada de citocinas anti inflamatórias, como IL-10, arginase-1 e TGF- β . Essa alteração no padrão de mediadores inflamatórios é crítica para a reparação tecidual pós IM (78, 79), pois a resposta inflamatória persistente tem efeitos adversos na função do ventrículo esquerdo e na remodelação após infarto agudo do miocárdio (80).

A IL-10 é a citocina mais importante com propriedades antiinflamatórias. Ela diminui a produção e inibe a ação de mediadores inflamatórios, além de estimular a produção endógena de citocinas antiinflamatórias. A IL-10 também possui importante papel na reparação de danos aos tecidos (81). No presente estudo, os animais suplementados com acerola apresentaram aumento da IL-10.

Devido à importante participação da inflamação no processo de fibrose após o IM, a IL-10 tem sido foco de potenciais terapias antifibróticas (82). A administração sistêmica de IL-10, em camundongos após IM induzido por isoproterenol, melhorou a função ventricular esquerda e não apenas inibiu, mas também reverteu a remodelação cardíaca induzida (83). Estudos realizados em animais tratados com IL-10 após IM, por

28 dias, mostraram que esses animais apresentam diminuição da infiltração de células inflamatórias e da expressão de citocinas pró-inflamatórias no miocárdio, além de melhora da função cardíaca e diminuição de fibrose. Estas alterações foram associadas com menor expressão e atividade da MMP-9 (80). A transferência do gene da IL-10 em modelo de IM em ratos levou a diminuição da expressão gênica de MMP-2 e 9, aumento da expressão gênica do TIMP-1 e diminuição da expressão gênica dos colágenos I e III, todos avaliados na fase aguda do IM (84). O mesmo grupo, utilizando o mesmo modelo de IM e transferência do gene da IL-10, observou, 4 a após o IM, diminuição da fração de colágeno da área não infartada, diminuição da expressão gênica de colágeno I e da MMP-2, além de melhora de função cardíaca (85). Não encontramos na literatura trabalhos que analisassem a influência da IL-10 após o IM na expressão dos TIMP-2 e 4.

46

Sendo assim, a IL-10 parece atenuar a remodelação cardíaca pós IM e melhorar a função ventricular por modular o processo inflamatório e componentes da matriz extracelular. Portanto, o aumento da IL-10 observado nos nossos animais suplementados com acerola, pode ter participado das alterações encontradas na matriz extracelular e na melhora da função cardíaca observada nesses animais.

Resumidamente, podemos observar que a suplementação de vitamina C e acerola levam a remodelação da matriz extracelular cardíaca e este processo de remodelação pode ter contribuído para a melhora de função sistólica e diastólica observada nesses animais. Adicionalmente, a suplementação de acerola aumenta a IL 10, o que pode também ter contribuído para a melhora de função observada no grupo IA. As diferenças observadas para a suplementação de vitamina C e acerola podem ser decorrentes da ação sinérgica dos CBAs presentes na acerola. Entretanto, não possuímos dados suficientes que nos permita inferir que a ação da acerola sobre a remodelação cardíaca pós IM foi potencializada.

6. CONCLUSÃO

Suplementação de vitamina C e acerola atenuam remodelação cardíaca pós IM, com melhora da função sistólica e diastólica. Os mecanismos envolvidos podem ser decorrentes da remodelação da matriz extracelular e do aumento da citocina anti inflamatória IL-10.

7. REFERÊNCIAS

1. Cardiologia SBd. Mortes por Doença Cardiovascular no Brasil - Cardiometro 2019 [Available from: <http://www.cardiometro.com.br/grafico.asp>.
2. Cardiologia SBd. Mortes por Doença Cardiovascular no Brasil - Cardiometro 2020 [
3. González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, Rodrigo R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. World Journal of Cardiology.

2018;10(9):74.

4. Machado NG, Alves MG, Carvalho RA, Oliveira PJ. Mitochondrial involvement in cardiac apoptosis during ischemia and reperfusion: can we close the box? *Cardiovascular toxicology*. 2009;9(4):211-27.
5. Brasil MdSBddsSUdS-D. Informações de saúde, estatísticas vitais, mortalidade 1996-2018 pela cid-10, mortalidade geral. [Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
6. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2009;93(4):434-40.
7. 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.
8. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *The Lancet*. 2006;367(9507):356-67.
9. Zornoff LA, Paiva SA, Assalin VM, Pola P, Becker LE, Okoshi MP, et al. Clinical profile, predictors of mortality, and treatment of patients after myocardial infarction, in an academic medical center hospital. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2002;78(4):401-5.
10. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, et al. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2010;61(2):163-70.
11. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacological reviews*. 2007;59(4):418-58.
12. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2016;106(1):62-9.
13. SILVIA M. FRANCISCATO COZZOLINO Biodisponibilidade de Nutrientes—. MANOLE; 2012.
14. da Fonseca Antunes B, Pereira JR, Bohmer BW, Jansen C, Otero DM, Zambiasi RC. Determinação de Vitamina C e Atividade Antioxidante de Frutas Nativas do Brasil. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp*. 2017:1300-10.
15. PEREIRA V. Ácido ascórbico—características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria de alimentos. Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Bacharelado em Química de Alimentos UFPel Pelotas. 2008.
16. DE ALMEIDA E, NAVAS R, Gonçalves E. Compostos fenólicos totais e características físico-químicas de frutos de jabuticaba. *Gaia Scientia*. 2018;12(1):81-9.

49

17. Aghajanzpour M, Nazer MR, Obeidavi Z, Akbari M, Ezati P, Kor NM. Functional foods and their role in cancer prevention and health promotion: a comprehensive review. *American journal of cancer research*. 2017;7(4):740.
18. Khaw K-T, Bingham S, Welch A, Luben R, Wareham N, Oakes S, et al. Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *The lancet*. 2001;357(9257):657- 63.
19. Martín-Calvo N, Martínez-González MÁ. Vitamin C intake is inversely associated with cardiovascular mortality in a cohort of Spanish graduates: the SUN Project.

Nutrients. 2017;9(9):954.

20. Nyyssönen K, Parviainen MT, Salonen R, Tuomilehto J, Salonen JT. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. *Bmj*. 1997;314(7081):634.
21. Riemersma RA, Carruthers KF, Elton RA, Fox KA. Vitamin C and the risk of acute myocardial infarction. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5):1181-6.
22. Mauro AG, Kraskauskas D, Mohammed BM, Fisher BJ, Mezzaroma E, Fowler III AA, et al. Vitamin C Deficiency Impairs Cardiac Function and Post-infarction Survival in the Mouse. *Circulation Research*. 2017;121(suppl_1):A402-A.
23. Ramos C, Brito R, González-Montero J, Valls N, Gormaz JG, Prieto JC, et al. Effects of a novel ascorbate-based protocol on infarct size and ventricle function in acute myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary angioplasty. *Archives of Medical Science: AMS*. 2017;13(3):558.
24. Yogeeta SK, Gnanapragasam A, Kumar SS, Subhashini R, Sathivel A, Devaki T. Synergistic interactions of ferulic acid with ascorbic acid: its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006;283(1-2):139-46.
25. 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.
26. Metias E, Aboelmaaty N, Hussein A, Abdallah E, Abdelaziz A. Modulation of ECG, myocardial oxidative stress markers and connexin 43 expression by ascorbic acid and ferulic acid in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Biochem Physiol*. 2016;5(210):2.
27. Moradi-Arzeloo M, Farshid AA, Tamaddonfard E, Asri-Rezaei S, editors. Effects of histidine and vitamin C on isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Veterinary Research Forum*; 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
28. Valls N, Gormaz JG, Aguayo R, González J, Brito R, Hasson D, et al. Amelioration of persistent left ventricular function impairment through increased plasma ascorbate levels following myocardial infarction. *Redox Report*. 2016;21(2):75-83.
29. Shabani P, Ghazizadeh Z, Gorgani-Firuzjaee S, Molazem M, Rajabi S, Vahdat S, et al. Cardioprotective effects of omega-3 fatty acids and ascorbic acid improve regenerative capacity of embryonic stem cell-derived cardiac lineage cells. *BioFactors*. 2019;45(3):427-38.
30. Kawaguchi M, Tanabe H, Nagamine K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4, 2"-glycosidic linkage from green mature acerola

50

(*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007;71(5):1130-5.

31. Furlaneto F, Nasser M. Panorama da cultura da acerola no estado de São Paulo. *Pesquisa & Tecnologia*. 2015;12(1):1-6.
32. (Sebrae) SBdAàMePE. O cultivo e o mercado da acerola. Fruta de consumo restrito em estado natural, destina-se basicamente à indústria. [Available from: <https://m.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-acerola,db7b9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>].
33. Lima D, Padovani R, Rodriguez-Amaya D, Farfán J, Nonato C, Lima M, et al. Tabela brasileira de composição de alimentos-taco (2011).

34. Leffa DD, da Silva J, Petronilho FC, Biélla MS, Lopes A, Binatti AR, et al. Acerola (Malpighia emarginata DC.) juice intake protects against oxidative damage in mice fed by cafeteria diet. Food Research International. 2015;77:649-56.
35. Leffa DD, da Silva J, Daumann F, Dajori ALF, Longaretti LM, Damiani AP, et al. Corrective effects of acerola (Malpighia emarginata DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2014;770:144-52.
36. Batista KS, Alves AF, dos Santos Lima M, da Silva LA, Lins PP, de Sousa Gomes JA, et al. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. British Journal of Nutrition. 2018;119(1):30-41.
37. Marques TR, Caetano AA, Simão AA, Castro FCdO, Ramos VdO, Corrêa AD. Metanolic extract of Malpighia emarginata bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2016;26(2):191-6.
38. Righetto AM. Caracterização físico-química e estabilidade de suco de acerola verde microencapsulado por atomização e liofilização. 2003.
39. Stangl V, Lorenz M, Stangl K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. Molecular nutrition & food research. 2006;50(2):218-28.
40. Lustosa BHB. Influência do extrato de chá verde na remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio. 2013.
41. Souza NC, de Oliveira Nascimento EN, de Oliveira IB, Oliveira HML, Santos EGP, Mata MERMC, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of blend formulated with compounds of Malpighia emarginata DC (acerola) and Camellia sinensis L.(green tea) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;128:110277.
42. Castillo RL, Herrera EA, Gonzalez-Candia A, Reyes-Farias M, de la Jara N, Peña JP, et al. Quercetin prevents diastolic dysfunction induced by a high-cholesterol diet: role of oxidative stress and bioenergetics in hyperglycemic rats. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018;2018.
43. Li B, Yang M, Liu J, Yin G. Protective mechanism of quercetin on acute myocardial infarction in rats. Genet Mol Res. 2016;15:15017117.
44. Gozzer P, Andrade E, Belotto PCP, Silva BFG, Mascarin AAL, Silva CA. Comportamento de ratos Wistar: importância do enriquecimento ambiental. Saúde em Revista. 17(48):69-77.

45. Minicucci MF, Gaiolla PSA, Martinez PF, Lima AR, Bonomo C, Guizoni DM, et al. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. International journal of cardiology. 2011:242-3.
46. Brasil C. Diretriz brasileira para o cuidado ea utilização de animais para fins científicos e didáticos. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação: Brasília, Brazil. 2013:1-50.
47. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. Free radical biology and medicine. 2012;52(1):1-6.
48. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al.

- Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(41):15038-43.
49. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
 50. 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. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89(2):83-7, 93-8.
 51. Oliveira BC, Santos PP, Figueiredo AM, Rafacho BPM, Ishikawa L, Zanati SG, et al. Influence of Consumption of Orange Juice (*Citrus Sinensis*) on Cardiac Remodeling of Rats Submitted to Myocardial Infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2021;116(6):1127-36.
 52. Simek CL, Feldman MD, Haber HL, Wu CC, Jayaweera AR, Kaul S. Relationship between left ventricular wall thickness and left atrial size: comparison with other measures of diastolic function. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 1995;8(1):37-47.
 53. Tsang TS, Barnes ME, Gersh BJ, Bailey KR, Seward JB. Left atrial volume as a morphophysiologic expression of left ventricular diastolic dysfunction and relation to cardiovascular risk burden. *The American journal of cardiology*. 2002;90(12):1284- 9.
 54. Kono M, Kisanuki A, Ueya N, Kubota K, Kuwahara E, Takasaki K, et al. Left ventricular global systolic dysfunction has a significant role in the development of diastolic heart failure in patients with systemic hypertension. *Hypertens Res*. 2010;33(11):1167-73.
 55. Salgado AA, Albanesi Filho FM, Castier M, Bedirien R. Índice de performance miocárdica. Fim da fração de ejeção. *Rev Bras Ecocardiog*. 2004;17(3):69-74.
 56. da Ecocardiografia DdI. 1. avaliação da função e estrutura ventricular esquerda. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(6 Supl 3):e265-e302.
 57. Karatzis EN, Giannakopoulou AT, Papadakis JE, Karazachos AV, Nearchou NS. Myocardial performance index (Tei index): evaluating its application to myocardial infarction. *Hellenic J Cardiol*. 2009;50(1):60-5.
 58. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(2):150-6.
 59. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovascular research*. 2009;81(3):482-90.
 60. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301(6):H2181-H90.
- 52
61. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2002:371-8.
 62. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81:482-90.
 63. Inoue T, Ide T, Yamato M, Yoshida M, Tsutsumi T, Andou M, et al. Time-dependent changes of myocardial and systemic oxidative stress are dissociated after myocardial infarction. *Free radical research*. 2009;43(1):37-46.
 64. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem*

65. Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J.* 2003;374(Pt 2):337-48.
66. Zielonka J, Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(8):983-1001.
67. Yogeeta SK, Gnanapragasam A, Kumar SS, Subhashini R, Sathivel A, Devaki T. Synergistic interactions of ferulic acid with ascorbic acid: its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and cellular biochemistry.* 2006;283(1):139-46.
68. Moradi-Arzeloo M, Farshid AA, Tamaddonfard E, Asri-Rezaei S, editors. Effects of histidine and vitamin C on isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Veterinary Research Forum*; 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
69. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovascular research.* 2006;69(3):604-13.
70. Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovascular therapeutics.* 2012;30(1):31-41.
71. Zamilpa R, Lindsey ML. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2010;48(3):558-63.
72. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, San Jose G, Diez J. Reprint of "The complex dynamics of myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Focus on collagen cross linking". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 2020;1867(3):118521.
73. Masciantonio MG, Lee CK, Arpino V, Mehta S, Gill SE. The balance between metalloproteinases and TIMPs: critical regulator of microvascular endothelial cell function in health and disease. *Progress in molecular biology and translational science.* 2017;147:101-31.
74. Wilson EM, Moainie SL, Baskin JM, Lowry AS, Deschamps AM, Mukherjee R, et al. Region-and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation.* 2003;107(22):2857-63.

75. Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, et al. Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation.* 2003;107(4):618-25.
76. MA C-c, CHEN Y-c, JIA J-h, ZANG X, HE Y-c, JIANG R-y, et al. Effect of vitamin C on the expression of MMP-2 after renal ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Journal of Jiangsu University (Medicine Edition).* 2009;2.
77. Shang T, Liu Z, Liu C-j. Antioxidant Vitamin C attenuates experimental abdominal aortic aneurysm development in an elastase-induced rat model. *journal of surgical research.* 2014;188(1):316-25.
78. Kain V, Prabhu SD, Halade GV. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic research in*

- cardiology. 2014;109(6):444.
79. Wang X, Guo Z, Ding Z, Mehta JL. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7(9):e008024.
 80. 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-e18.
 81. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(5):331-44.
 82. Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The role of the anti inflammatory cytokine interleukin-10 in tissue fibrosis. *Advances in wound care*. 2020;9(4):184-98.
 83. Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, Singh N, Gupta R, Lambers E, et al. Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload–induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3–dependent inhibition of nuclear factor-κB. *Circulation*. 2012;126(4):418-29.
 84. Hu C-Y, Ding W-H, Han X-N, Chu S-Y, Hao Y-J, Bu D-F. In vivo interleukin-10 gene transfer down-regulates myocardial matrix metalloproteinase and myocardial collagen expressions in rats with acute myocardial infarction. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi*. 2008;36(3):243-8.
 85. Han X, Chunyang H, Chu S, Yongfen Q, Ding W. IL-10 inhibits myocardium collagen deposition after acute myocardial infarction in rats. *Basic & Clinical Medicine*. 2006(01).