

*Marcos Ferreira Minicucci*

# **INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO DIETÉTICA DE VITAMINA A NA REMODELAÇÃO CARDÍACA PÓS-INFARTO**

Tese Apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para  
obtenção do título de doutor em Fisiopatologia em Clínica  
Médica, área de concentração Cardiologia.

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

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

Botucatu  
2008

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

Mnicucci, Marcos Ferreira.

Influência da restrição dietética de vitamina A na remodelação cardíaca pós-infarto / Marcos Ferreira Minicucci. – 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Co-orientador: Prof. Adj. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva

Assunto CAPES: 40101002

1. Infarte do miocárdio. 2. Vitamina A na nutrição humana.

CDD 616.12

Palavras-chave: Infarto do miocárdio; Remodelação ventricular; Vitamina A.

# **Dedicatória**

À FERNANDA, que me completa e  
acompanha todos os dias, e a quem  
agradeço todo amor e carinho.

Aos meus pais EUGÊNIA e OSWALDO,  
meus exemplos de vida e caráter.  
Obrigado pelo amor e ensinamentos  
essenciais para eu trilhar esse  
caminho.

Aos meus irmãos MARCELO e RENATO, por  
toda a amizade, carinho e apoio.

Aos meus avós OSWALDO, LUCY,  
MARIA (in memoriam) e a PAULINO,  
por terem sido fundamentais na  
minha vida.

A toda minha FAMÍLIA pela presença e  
incentivo constantes.

# **Agradecimentos**

À DEUS por todas as oportunidades e pela presença  
constante em minha vida

Aos professores da disciplina de clínica médica geral

LUIZ SHIGUERO MATSUBARA  
SERGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA  
MARINA POLITI OKOSHI  
LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF

Obrigado pela amizade, apoio e por me ensinarem que sempre podemos  
ser melhores.

Tenho orgulho de trabalhar com vocês, que foram fundamentais na  
minha formação.

Aos médicos e amigos

ROBERTO MINORU TANI INOUE  
PAULA SCHMIDT AZEVEDO GAIOLLA  
DANIELLA DE REZENDE DUARTE  
ELINE DE ALMEIDA SORIANO

Obrigado pela amizade, apoio e por me ensinarem que o trabalho em  
grupo é essencial para o crescimento de todos.

DAVID NICOLETTI GUMIEIRO  
LISA MILARÉ GUMIEIRO  
PAULA SCHMIDT AZEVEDO GAIOLLA  
RAFAEL DEZEN GAIOLLA

Obrigado pela amizade, convivência diária e por me ajudarem a transpor  
meus obstáculos.

À todos que colaboraram com a realização desta tese:

MARIO BATISTA BRUNO, que criou e cuidou dos animais utilizados nesse estudo.

CAMILA CORREA

CORINA CORREA

CRISTIANE FREIRE

DIJON S CAMPOS

ELENIZE JAMAS PEREIRA

JOSÉ CARLOS GEORGETE

PAULA FELIPPE MARTINEZ

ROGÉRIO APARECIDO MONTEIRO

ROSÂNGELA NOVO

SANDRA ÂNGELA FABIO

SILVIO ASSIS DE OLIVEIRA JÚNIOR

SUELI APARECIDA CLARA

VITOR MARCOS DE SOUZA

Meus mais sinceros agradecimentos

## Agradeço aos professores,

Profa. Adj. BEATRIZ BOJIKIAN MATSUBARA pela realização do estudo ecocardiográfico e pela disponibilidade e apoio em todas as etapas da realização deste trabalho.

Prof. Adj. LUIZ SHIGUERO MATSUBARA pelos ensinamentos e auxílio nas técnicas experimentais do trabalho.

Prof. Titular JOEL SPADARO pela amizade e auxílio durante a prova de qualificação.

Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pelo importante auxílio durante a prova de qualificação, essencial para melhoria deste trabalho.

Prof. Emérito ÁLVARO OSCAR CAMPANA, Prof. Titular ANTONIO CARLOS CICOGNA, Profa. Adj. CÉLIA NOGUEIRA, Prof. Adj. CARLOS ROBERTO PADOVANI pelos ensinamentos durante as disciplinas da pós-graduação que auxiliaram a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Clínica Médica  
MARIO AUGUSTO DALLAQUA, pela disponibilidade e competência na  
formatação desta tese

ALEXANDRE LUIS LOUREIRO

BRUNO CESAR GOMES DA SILVA

BRUNO JOSÉ FAJIOLI

ELISANGELA APARECIDA DA SILVA

LAURA ANDRADE CÂMARA

RENATO BORGES PEREIRA

Aos funcionários da Pós-graduação e da Biblioteca

ANA MARIA MENGUE

ANDREA PAULA LONGO DEVIDÉ

JANETE APARECIDA HERCULANO NUNES SILVA

LÍLIAN CRISTINA NADAL BIANCHI NUNES

NATHANAEL PINHEIRO SALLES

REGINA CÉLIA SPADIN

SELMA MARIA DE JESUS

Que nos atendem sempre com muita gentileza e atenção

Meus mais sinceros agradecimentos

## Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Adj. LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF, pelo exemplo profissional e pessoal.

Por todas às vezes, que seu incentivo e confiança, não deixaram que eu desanimasse ou desistisse de meus objetivos.

Obrigado pela amizade, dedicação, ensinamentos, compreensão e competência em orientar esta tese.

## Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Adj. SERGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA, pela participação dedicada na co-autoria desta tese.

Obrigado pela amizade, ensinamentos, exemplos e por incentivar sempre meu crescimento.

À Dra. PAULA SCHMIDT AZEVEDO GAIOLLA por ser minha amiga e irmã. Obrigado pelo auxílio em todos os momentos e nas etapas da elaboração desta tese.

# Sumário

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Introdução .....                 | 1  |
| Hipótese.....                    | 8  |
| Objetivo .....                   | 10 |
| Material e Métodos .....         | 12 |
| Resultados .....                 | 23 |
| Discussão .....                  | 33 |
| Conclusões .....                 | 43 |
| Resumo .....                     | 45 |
| Abstract .....                   | 47 |
| Referências Bibliográficas ..... | 49 |

## **Lista de Abreviações**

**AD** - área diastólica  
**AE** - átrio esquerdo  
**Ao** - aorta  
**AR** - ácido retinóico  
**AS** - área sistólica  
**DC** - débito cardíaco  
**DDVE** - diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo  
**DSVE** - diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo  
**EPP** - espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo  
**FC** - frequência cardíaca  
**FVA** - fração de variação de área do ventrículo esquerdo  
**IAM** - infarto agudo do miocárdio  
**LRAT** - lecitina retinol acil transferase  
**MMPs** - metaloproteínases da matriz extracelular  
**MHC** - miosina de cadeia pesada  
**PC** - peso do rato  
**RAR** - receptor do ácido retinóico  
**RBP** - proteína carreadora do retinol  
**RE** - equivalente de retinol  
**RXR** - receptor retinóide  
**TIMPs** - inibidores teciduais das MMPs  
**TRIV** - tempo de relaxamento isovolumétrico  
**TRIV/RR<sup>0,5</sup>** - tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela FC  
**VD** - ventrículo direito  
**VE** - ventrículo esquerdo  
**VS** - volume sistólico  
**VTI** - integral da velocidade-tempo

# Introdução

As patologias envolvendo o aparelho cardiocirculatório são as principais causas de morte em todo o mundo. No Brasil, segundo o Datasus<sup>(1)</sup>, correspondiam a 31,8% das causas de óbito em 2004, sendo responsáveis em 2005 por mais de um milhão de internações<sup>(2)</sup>. Dentro deste grupo, devido aos altos índices de mortalidade, destaca-se a síndrome coronariana aguda, que inclui a angina instável e o infarto agudo do miocárdio (IAM), com e sem supra-desnívelamento do segmento ST.

Após o IAM, podem ocorrer alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a região infartada como a não infartada. Nos últimos anos, estas adaptações passaram a ser estudadas com o nome de remodelação ventricular ou cardíaca. Outro dado relevante é que a remodelação pode levar à insuficiência cardíaca, principal responsável pelo aumento da morbimortalidade após o IAM<sup>(3)</sup>.

A remodelação cardíaca obedece ao processo geral de adaptação biológica. A adaptação biológica é o processo pelo qual um órgão ou organismo expressa novo programa genético em resposta a estímulo ambiental<sup>(4)</sup>. Na sobrecarga pressórica do ventrículo esquerdo, por exemplo, ocorre resposta quantitativa (hipertrofia concêntrica, que normalizará a tensão na parede do ventrículo esquerdo) e qualitativa (diminuição da velocidade de encurtamento da fibra miocárdica), que levará a diminuição da quantidade de ATP consumido. Essa alteração da expressão gênica, que possibilita ao coração recuperar o gasto energético normal, tem efeitos benéficos e deletérios. Nesse caso, a insuficiência cardíaca, quando ocorre, indica o limite do processo biológico adaptativo<sup>(5)</sup>.

As alterações fenotípicas do processo de remodelação são semelhantes em diversas condições, como desenvolvimento fetal, sobrecarga de volume e pressão, senescência e hipotireoidismo. Isso ocorre porque a agressão externa leva sempre à re-expressão do mesmo programa genético, o fetal. Logo, a remodelação cardíaca é caracterizada como a re-expressão de programa genético fetal.

Apesar da remodelação ser evento complexo, as alterações morfológicas do ventrículo esquerdo, como o aumento da massa, volume e alterações geométricas são os componentes de mais fácil detecção. Podemos

distinguir três formas principais de remodelação: a concêntrica, a excêntrica e a remodelação com manutenção da geometria ventricular<sup>(6)</sup>.

Na remodelação concêntrica, ocorre redução da relação entre a cavidade ventricular e a espessura da parede, induzidos, principalmente, pela sobrecarga pressórica. Na excêntrica, há aumento da relação cavidade ventricular/espessura da parede, induzidos, principalmente, pela sobrecarga de volume. Na remodelação com manutenção da geometria, ocorre aumento da cavidade ventricular com manutenção da relação entre a cavidade e a espessura da parede.

No início do processo de remodelação, as adaptações morfológicas são importantes para a manutenção da função cardíaca. No entanto, cronicamente, a remodelação é reconhecida como processo patológico considerável, que resulta em progressiva disfunção ventricular, insuficiência cardíaca clínica e morte súbita<sup>(7)</sup>.

As causas da transição da remodelação compensada para a insuficiência cardíaca ainda não estão bem esclarecidas. Algumas hipóteses principais foram propostas: ativação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) e redução da expressão dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs); ativação neurohumoral; estresse oxidativo; alteração das proteínas contráteis e acúmulo anormal de colágeno<sup>(8-10)</sup>.

O processo de remodelação após o IAM é, entretanto, mais complexo. Esse processo inclui: expansão do infarto, dilatação aguda da área infartada; sobrecarga de volume induzida por esta expansão; e sobrecarga de pressão induzida pelo aumento de volume<sup>(11)</sup>.

A expansão ocorre devido à morte e deslizamento de miócitos principalmente na região apical do ventrículo esquerdo, onde a tensão parietal é maior. Na fase inicial da remodelação pós-IAM, o aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo melhora ou até normaliza o débito cardíaco pela lei de Starling. No entanto, a longo prazo, ocorre aumento no comprimento dos miócitos da região não infartada devido à hipertrofia, acarretando o aumento da cavidade ventricular esquerda e da mortalidade<sup>(12)</sup>.

Além dessas alterações morfológicas, na remodelação podemos identificar alterações fenotípicas dos miócitos, da matriz extracelular e alterações relacionadas à perda de miócitos.

A perda de miócitos é fator determinante do processo de remodelação cardíaca, principalmente após o IAM. Tanto a necrose quanto a apoptose levam à perda de tecido contrátil, hipertrofia compensatória e fibrose<sup>(13)</sup>. Os miócitos que sobrevivem à isquemia sofrem alterações fenotípicas como hipertrofia e mudanças na expressão das proteínas contráteis.

A miosina e actina são proteínas contráteis fundamentais na contração miocárdica. A interação entre essas proteínas converte a energia gerada pela hidrólise do ATP em trabalho mecânico. A molécula de miosina é composta por um par de miosinas de cadeia pesada (MHCs)  $\alpha$  ou  $\beta$ , ambas com 220 kDa, e dois pares diferentes de cadeia leve. No ventrículo esquerdo do rato, podemos identificar três isoformas de miosina, que se distinguem pela composição da MHC: V1 ( $\alpha$ - $\alpha$ ), V2 ( $\alpha$ - $\beta$ ) e V3 ( $\beta$ - $\beta$ ). A atividade ATP-ásica está localizada na cabeça da MHC e é dependente do tipo de isoforma. A V1 tem atividade ATP-ásica três vezes maior que a isoforma V3 e, conseqüentemente, maior velocidade de encurtamento muscular. Na remodelação cardíaca, há a re-expressão do gene da isoforma V3, no intuito de economizar energia<sup>(14,15)</sup>. No entanto, esta economia acarreta redução da velocidade de encurtamento e da contratilidade miocárdicas.

Além da diminuição da contratilidade miocárdica, a fibrose é um dos principais determinantes de evolução desfavorável na remodelação, responsável pelo desenvolvimento de insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita<sup>(16)</sup>.

O equilíbrio entre a produção e degradação do colágeno é dependente da ativação de MMPs e dos TIMPs<sup>(17)</sup>. Existem mais de 20 tipos de MMPs e, dentre elas, podemos destacar as MMPs 2 (gelatinase A, 72 kDa) e 9 (gelatinase B, 92 kDa).

No processo de remodelação, células inflamatórias produzem fatores de crescimento e transformam fibroblastos em miofibroblastos, que produzem MMPs. O aumento da atividade dessas enzimas e a redução dos TIMPs leva à degradação do colágeno normal e ao aumento anormal do colágeno tipo I,

resultando em alterações do alinhamento entre os miócitos, da geração de força e do relaxamento<sup>(18,19)</sup>.

Em modelos de miocardiopatia isquêmica<sup>(20,21)</sup> e insuficiência cardíaca<sup>(22,23)</sup>, observam-se aumento da expressão das MMPs 2 e 9 e diminuição das TIMPs. Rouet-Bezineb e colaboradores observaram ainda que o aumento da MMP-9 pode estar relacionado à maior degradação da miosina de cadeia pesada, interferindo também com o aparato contrátil dos miócitos<sup>(19)</sup>.

Atualmente, aceita-se que devido às alterações descritas acima, entre outras, a remodelação cardíaca pode levar à disfunção ventricular, à insuficiência cardíaca e ao óbito. Com a finalidade de atenuar a remodelação e reduzir a mortalidade após o IAM, utilizam-se, nos últimos anos, estratégias como os inibidores da enzima de conversão da angiotensina II e os beta-bloqueadores<sup>(24,25)</sup>. No entanto, devido ao grande impacto sócio-econômico e às altas taxas de mortalidade, torna-se relevante a identificação de outros fatores que modulem o processo de remodelação ventricular. Entre esses fatores destaca-se a vitamina A.

A vitamina A é termo genérico, que engloba qualquer composto dietético lipossolúvel, com atividade biológica do retinol. O termo retinóide refere-se ao retinol, seus metabólitos endógenos e análogos sintéticos<sup>(26)</sup>. Os retinóides apresentam, em sua estrutura, pelo menos um anel  $\beta$  - ionona ligado a cadeia de carbonos conjugados, com dupla ligação<sup>(26)</sup>.

Numerosos retinóides são formados durante o metabolismo e, em sua maior parte, encontram-se na forma de álcoois (retinol e ésteres), aldeído (retinal) e ácido carboxílico (ácido retinóico)<sup>(27)</sup>.

O retinol é obtido pela dieta na forma de éster retinílico ou de carotenóides com atividade pró-vitamina A, sendo o beta-caroteno a fonte principal. Os ésteres retinílicos são encontrados em alimentos de origem animal como fígado, ovos e derivados do leite; e os carotenóides em frutas que contém pigmentos avermelhados e alaranjados, como cenoura e mamão e vegetais verdes como o espinafre e brócolis<sup>(26)</sup>.

A deficiência de vitamina A é considerada problema de saúde pública em mais de 60 países. No Brasil, a deficiência de vitamina A foi registrada em grupos populacionais de vários estados<sup>(28,29)</sup>. As crianças e gestantes são as mais

atingidas, mas a deficiência também pode ser detectada em populações adultas<sup>(28,30)</sup>.

A principal causa da deficiência de vitamina A é a baixa ingestão deste nutriente em relação às necessidades, sendo que o consumo inadequado e necessidades elevadas estão relacionados à pobreza<sup>(31)</sup>. A diminuição da absorção da vitamina A, secundária a baixa ingestão de lipídeos e infecções parasitárias, também pode contribuir para sua deficiência<sup>(29)</sup>. No Brasil, os inquéritos de consumo alimentar mostram que 60% da população ingere menos de 50% das necessidades de vitamina A<sup>(29)</sup>. Entretanto, de forma geral, mesmo que a ingestão de vitamina A seja inadequada, a mobilização dos estoques hepáticos evita que a prevalência de deficiência de vitamina A seja grande na população adulta.

Em decorrência do importante papel na regulação gênica, os retinóides são essenciais no controle da diferenciação de células epiteliais, no sistema imune, no crescimento e reprodução<sup>(26)</sup>. No entanto, apenas recentemente, o coração passou a ser estudado como alvo dos retinóides.

Em estudos experimentais no período embrionário, alterações nas concentrações (deficiência ou excesso) de vitamina A ou ácido retinóico estiveram associadas à ocorrência de malformações cardíacas, como situs inversus, transposição de grandes vasos, alterações da septação cardíaca, bloqueios atrioventriculares diversos e quadros de miocardiopatia dilatada<sup>(32-35)</sup>.

No período pós-embrionário, diferentemente do que ocorre no período embrionário, os efeitos da deficiência de vitamina A são pouco conhecidos. Em tese recente desenvolvida em nosso laboratório, em que a deficiência cardíaca de vitamina A foi induzida por restrição alimentar desta vitamina, foi observado aumento do diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo acompanhado de disfunção ventricular<sup>(36)</sup>. Devemos considerar que a remodelação cardíaca provocada pela restrição alimentar de vitamina A pode ser regulada por alterações na expressão de diversos genes como, por exemplo, os que regulam a expressão das MMPs e das proteínas cardíacas contráteis.<sup>(19,37-39)</sup>

Outro aspecto a ser considerado refere-se ao fato de que, após o IAM, podem ocorrer alterações no metabolismo da vitamina A. Palace e colaboradores mostraram que a captação de retinol está aumentada no coração

de ratos infartados, com a conseqüente depleção de seus estoques hepáticos<sup>(41)</sup>. Considerando que a vitamina A é um modulador do processo inflamatório, existe a possibilidade de que a mobilização da vitamina A seria necessária para a regulação do processo de cicatrização e/ou remodelação pós-IAM.

Pelo exposto, a vitamina A pode modular alterações morfológicas e funcionais cardíacas, tanto no período embrionário como após o nascimento. No entanto, o papel da deficiência cardíaca de vitamina A na remodelação após o IAM ainda não foi estabelecido.

**Hipótese**

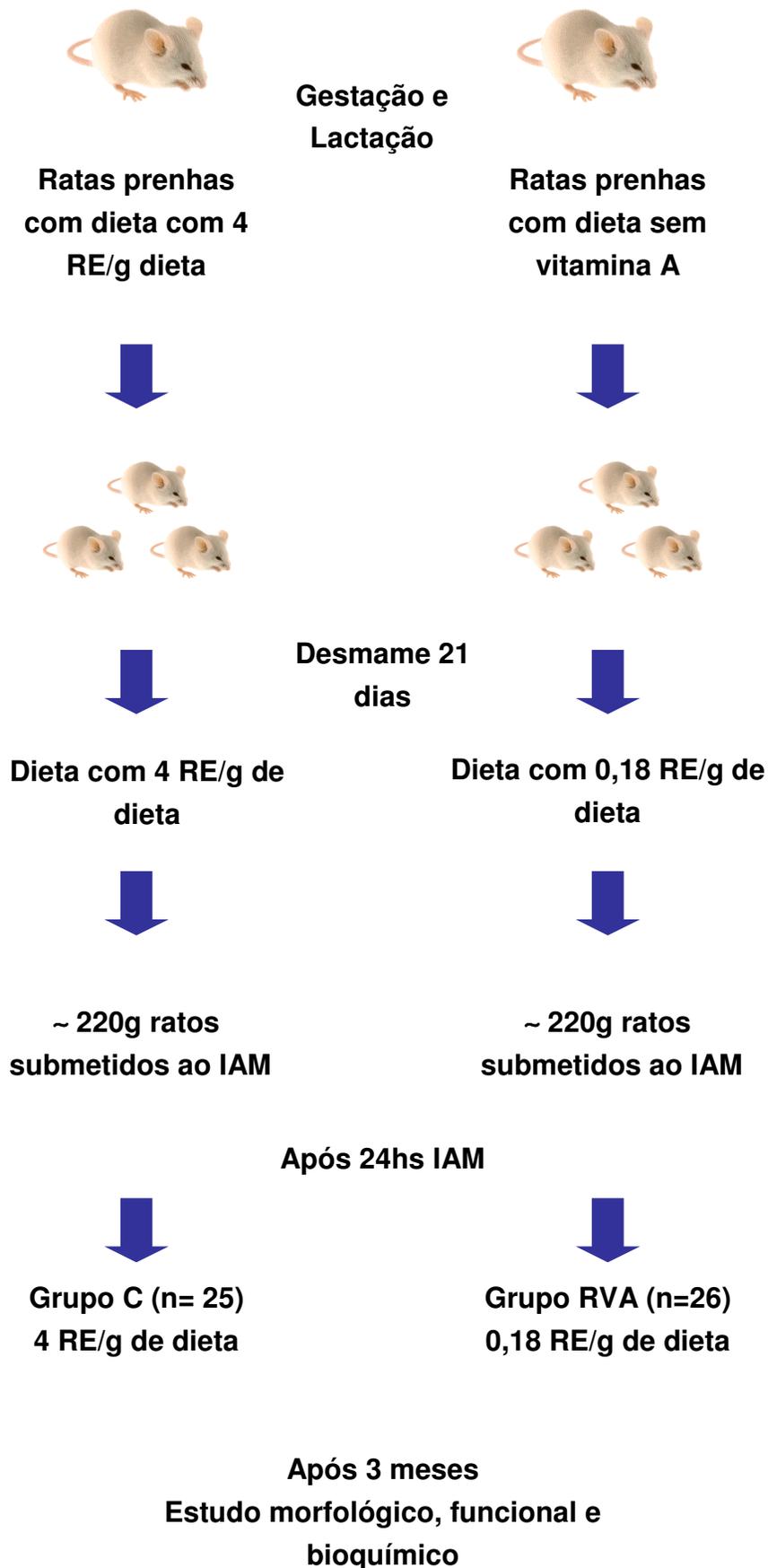
Formulamos a hipótese de que a restrição alimentar de vitamina A interfere no processo de remodelação cardíaca após o infarto.

**Objetivo**

O objetivo desse estudo foi analisar a influência da restrição alimentar de vitamina A sobre a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio em ratos.

# **Material e Métodos**

## Delineamento



O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal de nossa instituição (CEEA - protocolo 512), estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizadas ratas prenhes, Wistar, previamente híginas, pesando aproximadamente 100 g, condicionadas no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu. Os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Durante a gestação e lactação, as ratas tiveram livre acesso à água e foram distribuídas em 2 grupos: 1) dieta AIN-93 isenta de vitamina A + 4 RE/ g de dieta (dose fisiológica); 2) dieta AIN-93 isenta de vitamina A. Optou-se pela dieta AIN-93 pelo fato desta apresentar composição de macro e micronutrientes definida.

Após o nascimento dos filhotes, estes foram desmamados com 21 dias e os machos separados em gaiolas individuais. Os filhotes das ratas tratadas com dieta com dose fisiológica de vitamina A continuaram recebendo 4 RE / g de dieta e os filhotes das ratas tratadas com dieta isenta de vitamina A receberam 0,18 RE/ g de dieta (restrição dietética de vitamina A). Para tornar nosso grupo de ratos homogêneo e minimizar a interferência das mães na ninhada, foi adotado um coeficiente de variação de 10%, em relação ao peso do nascimento dos filhotes.

Quando atingiram, aproximadamente 220 g, os ratos foram submetidos ao infarto experimental. Nas primeiras 24 horas após o infarto, podem ocorrer diversas intercorrências (sangramento, pneumotórax, efeitos anestésicos, entre outros) não relacionados ao tamanho do infarto ou à intervenção terapêutica. Por essa razão, após 24 horas do procedimento, os ratos foram divididos em grupo controle (Grupo C, n=25), que continuou recebendo dieta com dose fisiológica de vitamina A, e grupo com restrição alimentar de vitamina A (Grupo RVA, n=26), que continuou recebendo 0,18 RE/ g de dieta. Os ratos dos grupos C e RVA foram acompanhados durante 3 meses. Após esse

período, os animais foram submetidos a estudo funcional, morfométrico, e bioquímico.

O modelo de restrição alimentar utilizado nesse trabalho foi adaptado de Gardner e Ross<sup>(42)</sup>. Dados de tese recente desenvolvida em nosso laboratório mostram que, nesse modelo, ao nascimento, os ratos restritos apresentam estoque de vitamina A hepático semelhante aos animais controle<sup>(36)</sup>. Assim, nosso modelo não causa deficiência de vitamina A no período embrionário. Entretanto, no momento do IAM, o grupo RVA apresentou estoque hepático de retinol diminuído em relação ao grupo controle, mas não em níveis que caracterizam deficiência de vitamina A<sup>(36)</sup>. Adicionalmente, os níveis teciduais cardíacos de retinol também foram inferiores em relação ao grupo controle. Outro fato relevante é que, no momento do IAM, o peso dos animais e os níveis séricos de retinol foram semelhantes (Tabela 1)<sup>(36)</sup>.

**Tabela 1:** Dosagem do retinol sérico, hepático e cardíaco em ratos wistar com diferentes modelos dietéticos de vitamina A

|  | Quantidade adequada de vitamina A <sup>*</sup> | Restrição alimentar de vitamina A <sup>*</sup> | Deficiência de vitamina A <sup>**</sup> |
|--|--|--|---|
| Retinol Hepático Nascimento $\mu\text{mol/kg}$     | 28,4 $\pm$ 7,01                                | 22,1 $\pm$ 12,8                                | < 20,0                                  |
| Retinol Sérico com ~ 220g ( $\mu\text{mol/L}$ )    | 4,1 $\pm$ 2,26                                 | 2,24 $\pm$ 2,9                                 | 0,9 $\pm$ 0,0                           |
| Retinol Hepático com ~ 220g ( $\mu\text{mol/kg}$ ) | 1007 $\pm$ 249                                 | 125 $\pm$ 50,3 <sup>***</sup>                  | 3,8 $\pm$ 1,3                           |
| Retinol Cardíaco com ~ 220g ( $\mu\text{mol/kg}$ ) | 0,95 $\pm$ 0,44                                | 0,24 $\pm$ 0,16 <sup>***</sup>                 | —                                       |

\* Dados de tese recente desenvolvida em nosso laboratório. \*\* Dados de Gardner e Ross. \*\*\* p<0,05

## Infarto Experimental

O IAM foi produzido de acordo com método descrito inicialmente por Heimburger e modificado por Pfeffer e colaboradores<sup>(43-45)</sup>. Após anestesia com cloridrato de cetamina (50mg/kg), por via intramuscular, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria coronária esquerda ligada a, aproximadamente, 2 mm da origem, com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio à 100% e o tórax fechado.

## Estudo Funcional

Após o período de observação de três meses pós-IAM, os ratos foram novamente anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma transtorácico. Utilizou-se equipamento da Philips (HDI 5500) dotado de transdutor eletrônico de 12 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando a 5 MHz.

Foram analisadas imagens monodimensionais obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor ultrassônico na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M, logo abaixo do plano da valva mitral, entre os músculos papilares. A imagem da aorta e do átrio esquerdo também foi obtida na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado no nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100 mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Todas as medidas foram efetuadas de acordo com as recomendações da American

Society of Echocardiography<sup>(46)</sup> e já validadas no modelo de ratos infartados<sup>(47)</sup>. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do VE (HDPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede posterior da cavidade. As áreas diastólicas (AD) e sistólicas (AS) do VE foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo longo e eixo menor. A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a fração de variação de área [FVA=(AD-AS)/AD x 100], obtida pela média dos valores dos dois eixos<sup>(46)</sup>. O volume sistólico (VS) e o débito cardíaco (DC) também foram calculados, segundo as fórmulas: VS = VTI x  $\pi$  x (VSVE/2)<sup>2</sup> e DC=VS x FC, onde VTI = integral da velocidade/tempo, VSVE = diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo e FC = frequência cardíaca<sup>(48)</sup>. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e abertura da mitral. O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical de quatro câmaras. As medidas referentes aos fluxos foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo.

## Coleta de Material Biológico

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram sacrificados por dose excessiva do anestésico pentobarbital sódico e foram extraídos o sangue, coração, fígado e o pulmão. Em seguida, o sangue contido nos ventrículos foi coletado por punção. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4° C para obtenção do soro que foi congelado a -80° C. O fígado, pulmão e coração foram colocados em soro fisiológico para retirada do sangue. Os ventrículos direito (VD), esquerdo (VE) e o átrio esquerdo (AE) foram dissecados e pesados.

Em seguida, foi realizado corte transversal entre 4 a 6 mm do ápice para a base do VE, pelo fato deste corte refletir a média dos resultados de cortes de todo o ventrículo<sup>(49)</sup>. Um fragmento de 3 mm foi colocado em formol tamponado a 10%. Os pesos úmidos do VD, fígado, pulmão e AE foram aferidos e, em seguida, foram colocados em estufa a 65° C por 48hs. Após esse período, os

pesos secos foram aferidos. A relação entre peso seco e úmido foi utilizada para caracterizar a porcentagem de líquido nesses tecidos.

Fragmentos do VD, fígado e pulmão, também foram colocados em formol tamponado a 10% por 24 horas, depois lavados em água corrente por mais 24 horas e posteriormente colocados em álcool 70%, antes de serem parafinados<sup>(50)</sup>.

A base do VE foi dividida em 2 segmentos longitudinais e o ápice em corte transversal. Esses fragmentos e amostras do VD, fígado e pulmão também foram congelados a -80° C.

Os materiais coletados foram processados e submetidos às análises bioquímicas e eletroforese de proteínas.

## **Determinação do Retinol no Soro e Fígado**

A vitamina A foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) das amostras armazenadas a -80° C. No soro, dosou-se o retinol. No fígado, dosou-se o retinol obtido após a saponificação de toda vitamina A existente no tecido, incluindo os estoques de ésteres retinílicos. Portanto, chamamos de retinol sérico a vitamina A encontrada no soro e vitamina A total, a encontrada no tecido hepático.

As amostras para a dosagem de retinol no soro foram preparadas a partir de alíquotas de 200 µl de soro. O retinol foi extraído pelo método descrito por Tang e Krisky em 1993<sup>(51)</sup>: 200 µl de soro foram tratados com 2 ml de solução clorofórmio: metanol (2:1, v/v). Cento e cinquenta µl de padrão interno (acetato de retinila) e 500 µl de soro fisiológico (8,5 g NaCl/L água) foram adicionados em seguida. Os tubos contendo solução soro-clorofórmio-metanol-soro fisiológico foram agitados por 1 minuto em agitador "vortex". Após, realizou-se centrifugação em 3.500 rpm, a temperatura de 4° C, por 10 minutos. A película de clorofórmio (camada de baixo) formada foi transferida para tubo de vidro de 13 x 100 mm e ficou reservada. Ao restante da amostra, isto é, à película aquosa, foram adicionados 3 ml de hexano. Os tubos contendo hexano - soro fisiológico foram agitados durante 1 minuto e centrifugados em 3.500 rpm a 4° C

por 10 minutos; a película de hexano (parte superior) foi transferida para o mesmo tubo de vidro de 13 x 100 mm, contendo a película de clorofórmio. As duas películas extraídas foram combinadas e submetidas à evaporação por meio de gás nitrogênio estando os tubos, durante esse procedimento, em banho-maria a 40° C. O resíduo foi ressuspensão em 150 µl de etanol, agitado e “sonicado” por 30 segundos; 50 µl da amostra obtida foram injetadas no cromatógrafo.

Foram utilizadas amostras de tecido hepático de aproximadamente 200 mg. A vitamina A total foi extraída utilizando o método modificado de Yeum e colaboradores <sup>(52)</sup>. Aos fragmentos hepáticos adicionou-se 100 µl de pirogalol a 12% (em etanol), 300 µl de hidróxido de potássio a 30% (em água) e 1,0 ml de etanol. A mistura foi agitada durante 10 segundos em baixa velocidade em agitador “vortex”. Logo após, as amostras foram incubadas a 37 °C durante duas horas, sob agitação contínua, estando os tubos cobertos com parafilme. Passado esse tempo, resfriou-se a mistura a temperatura ambiente e foi adicionado 1,0 ml de água. Imediatamente após, as amostras foram agitadas por 10 segundos. Na seqüência, adicionou-se 100 µl de padrão interno (equinenona) e 3,0 ml de éter-hexano (2:1, com 1% de etanol); a mistura foi agitada por 40 segundos e, posteriormente, centrifugada (3.000 rpm) por 5 minutos. Logo após este período, transferiu-se a película de éter-hexano para outro tubo de vidro e novamente foram adicionados 2,0 ml de éter-hexano. Após centrifugação, obteve-se, a mesma película de éter-hexano. Adicionou-se 2,0 ml de água ao extrato de éter-hexano, agitou-se e centrifugou-se (3.000 rpm) o material por 5 minutos. Transferiu-se a película de éter-hexano obtida para o mesmo tubo de vidro contendo a primeira película. Os tubos contendo a película éter-hexano foram colocados em banho-maria 40° C e os solventes evaporados por meio de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em 100 µl de etanol; o tubo foi agitado e sonicado por 30 segundos; 50 µl da amostra foram injetadas no cromatógrafo.

As condições operacionais para o método estão descritas a seguir. A coluna utilizada foi a de carbono 18 (C<sub>18</sub>) Pecosphere-3. O comprimento da onda do detector foi fixado em 325 nm para determinação do retinol. Este método usou duas soluções, cada uma infundida por uma bomba de infusão, com a finalidade de se estabelecer gradiente entre: solvente A - tetrahidrofurano (THF) :

acetonitrilo: água (20:50:30, v/v/v), com acetato de amônio 1% na água; solvente B - tetrahidrofurano (THF) : acetonitrilo: água (44:50:6, v/v/v, com acetato de amônio 1% na água). O fluxo total foi de 1 ml / min. durante todo o procedimento analítico, à temperatura de 25° C. Inicialmente, após a injeção da amostra, do tempo zero até dois minutos, foi bombeada a fase móvel, na seguinte proporção: 85% do solvente A e 15% do solvente B. No fim do segundo minuto, aumentou-se a infusão da bomba “B”; mantendo o aumento linear do solvente B por sete minutos; neste tempo, a concentração do solvente B passou a 83%. No tempo 16 minutos, realizou-se outro aumento linear do solvente B por três minutos; neste tempo, a concentração do solvente B chegou a 100%. Após, realizou-se aumento linear de 1 minuto do solvente A para o retorno às concentrações de 85% do solvente A e 15% do solvente B. A corrida terminou no tempo de 20 minutos. Aguardou-se, então, mais sete minutos, que é tempo suficiente para estabilizar novamente a coluna, possibilitando novas determinações. O retinol foi adequadamente separado por este método. Quantificaram-se os cromatogramas pela comparação entre as relações de área da substância/área do padrão interno (acetato de retinila, na dosagem de retinol sérico e equinenona na dosagem de vitamina A total do fígado e coração), obtidas na análise do soro ou do tecido do animal e da amostra da solução padrão. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar ( $E = DO/g^{1\%}_{1cm}$ ).

## **Estudo Morfométrico**

O bloco de parafina, contendo o fragmento de 3 mm do VE, foi seccionado em cortes de 5 micrômetros de espessura. O tecido miocárdico obtido foi corado em lâmina, com solução de hematoxilina-eosina e com o picrossirius red (Sirius red F3BA em saturação aquosa de ácido pícrico) e utilizado para análise morfométrica. Os comprimentos endocárdicos e epicárdicos dos segmentos infartados e não infartados foram determinados, além da porcentagem de colágeno por meio do software de análise de imagem (Image-Pro Plus 3,0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

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.

A porcentagem do volume do colágeno intersticial foi determinada nas lâminas coradas com picrossirius red, no mesmo microscópio, com objetiva de 40x. Foram considerados aproximadamente 30 campos, excluindo-se o colágeno perivascular<sup>(50,53)</sup>.

## **Eletroforese para Miosina de Cadeia Pesada**

Para a separação das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  da MHC, foi realizada a eletroforese de proteína em SDS-page<sup>(54)</sup>.

Na fase de extração da proteína, adicionou-se 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM; e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco proveniente do septo interventricular. O material foi homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 min à 4° C com 12.000 rpm, e o sobrenadante coletado<sup>(55)</sup>. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml.

A eletroforese foi realizada em SDS-page, com gel de separação a 8%. O aparato de eletroforese foi preparado e, após a polimerização do gel, foi aplicado azul de bromofenol nos poços, seguido por 8  $\mu$ g da amostra. Após a aplicação, foi adicionado o tampão de corrida (“lower buffer” = 50 mM Tris, 384 mM glicina, 0,2% de SDS e 4 litros de H<sub>2</sub>O; “upper buffer” = “lower buffer” + 10 mM de 2 mercaptoetanol)<sup>(54)</sup>.

Durante a corrida, a temperatura foi mantida ao redor de 20° C. A corrida ocorreu em 36 h à 70 V e com amperagem inicial de 4 mA<sup>(54)</sup>. Após a corrida, o gel foi deixado em solução fixadora por 10 minutos (metanol 50%, ácido acético glacial 7%) e, em seguida, corado com solução de Coomassie Blue R-250 (metanol 40%, ácido acético glacial 5%, Coomassie Blue 0,1%), durante 30 minutos.

Posteriormente, o gel foi descorado sucessivamente em solução com metanol 40% e ácido acético 7%. Após a descoloração, foi feita a captura da imagem do gel e a determinação da porcentagem de MHC  $\alpha$  e  $\beta$ , em unidade de imagem denominada pixel.

## **Análise Estatística**

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste *t de Student*. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. O teste do  $\chi^2$  foi utilizado para as comparações das variáveis categóricas. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows v 2.03 da SPSS.

# Resultados

## **Peso no momento do IAM**

Considerando o peso dos ratos no momento do IAM, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (C=210 (190 - 227)g; RVA=220 (206 - 230)g,  $p=0,28$ ).

## **Tamanho do Infarto**

Considerando o tamanho do IAM dos grupos experimentais, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (C= $36,9 \pm 9,6\%$ ; RVA= $36,3 \pm 8,9\%$ ;  $p=0,88$ ) (Figura 1).

## **Mortalidade**

Em relação à mortalidade dos animais nos grupos experimentais durante o período de três meses, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (C=48%, RVA=50%,  $p=0,891$ ).

## **Concentração de retinol sérico e hepático**

A concentração de retinol hepático foi estatisticamente menor entre os animais do grupo RVA em relação aos do grupo C, após três meses do IAM, enquanto a concentração sérica permaneceu semelhante (tabela 2).

## Estudo Ecocardiográfico

As tabelas 3 e 4 resumizam os resultados do estudo ecocardiográfico.

Considerando os dados morfológicos, o grupo RVA apresentou maiores diâmetros da aorta (Figura 2), DDVE (Figura 3) e AD menor/PC (Figura 4) que o grupo C.

Considerando os dados funcionais, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas variáveis relacionadas à função sistólica, como FVA e DC. Em relação à função diastólica, houve diferença estatisticamente significativa apenas no TRIV normalizado pela FC ( $\text{TRIV}/\text{RR}^{0,5}$ ), enquanto o TRIV permaneceu no limite da significância. O grupo RVA apresentou menor TRIV (Figura 5) e  $\text{TRIV}/\text{RR}^{0,5}$  que o grupo C (Figura 6). Os valores da onda E, A e relação E/A, não foram diferentes entre os grupos.

## Estudo Morfométrico

Os dados relativos às análises morfométricas estão na tabela 5.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao VE/PC, VD/PC, AE/PC, e teor de água no AE, VD, fígado e pulmão, entre os grupos.

O grupo RVA apresentou porcentagem de colágeno maior que o grupo C, no limite da significância estatística ( $C=2,8 \pm 0,9$  %;  $RVA=3,7 \pm 1,1$  %,  $p=0,05$ ) (Figura 7).

## Miosina de Cadeia Pesada

Em relação à miosina de cadeia pesada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à  $\alpha$ -miosina ( $C=52,7 \pm 6,6\%$ ;  $RVA= 53,4 \pm 5,8\%$ ;  $p=0,85$ ),  $\beta$ -miosina ( $C=47,3 \pm 6,6\%$ ;  $RVA= 46,6 \pm 5,8\%$ ;  $p=0,85$ ) e relação  $\beta/\alpha$  ( $C=0,92 \pm 0,23$ ;  $RVA= 0,89 \pm 0,22$ ;  $p=0,83$ ).

**Tabela 2.** Concentração do retinol sérico e hepático 3 meses após o IAM

|  | Grupo C<br>(n=7) | Grupo RVA<br>(n=7) | Valor p |
|--|------------------|--------------------|---------|
| Retinol Sérico<br>( $\mu\text{mol/L}$ )    | $1,1 \pm 0,3$    | $1,3 \pm 0,3$      | 0,28    |
| Retinol Hepático<br>( $\mu\text{mol/kg}$ ) | $334 \pm 122$    | $216 \pm 71,5$     | 0,049   |

IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais com dieta padrão; Grupo RVA: animais com restrição alimentar de vitamina A. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 3.** Resultados morfológicos do ecocardiograma 3 meses após o IAM

|                        | Grupo C<br>(n=13) | Grupo RVA<br>(n=13) | Valor p |
|------------------------|-------------------|---------------------|---------|
| AE (mm)                | $6,7 \pm 1,9$     | $6,6 \pm 1,1$       | 0,89    |
| Ao (mm)                | 3,4 (3,1-3,6)     | 3,5 (3,4-3,9)       | 0,04    |
| AE/Ao                  | $2,0 \pm 0,6$     | $1,8 \pm 0,4$       | 0,39    |
| AE/PC (mm/kg)          | $14,3 \pm 3,0$    | $14,8 \pm 3,0$      | 0,64    |
| DDVE (mm)              | $9,4 \pm 1,4$     | $10,5 \pm 1,2$      | 0,04    |
| EPP (mm)               | $1,3 \pm 0,2$     | $1,3 \pm 0,3$       | 0,89    |
| EPP/DDVE               | $0,15 \pm 0,04$   | $0,13 \pm 0,04$     | 0,28    |
| VSVE ( $\text{cm}^2$ ) | $0,24 \pm 0,02$   | $0,25 \pm 0,03$     | 0,61    |

IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais infartados com dieta padrão; Grupo RVA: animais infartados com restrição alimentar de vitamina A; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Ao: diâmetro da aorta; AE/Ao: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; PC: peso do rato; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; EPP: espessura diastólica da parede posterior; EPP/DDVE: relação entre a espessura da parede posterior e o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

**Tabela 4.** Resultados morfofuncionais do ecocardiograma 3 meses após o IAM

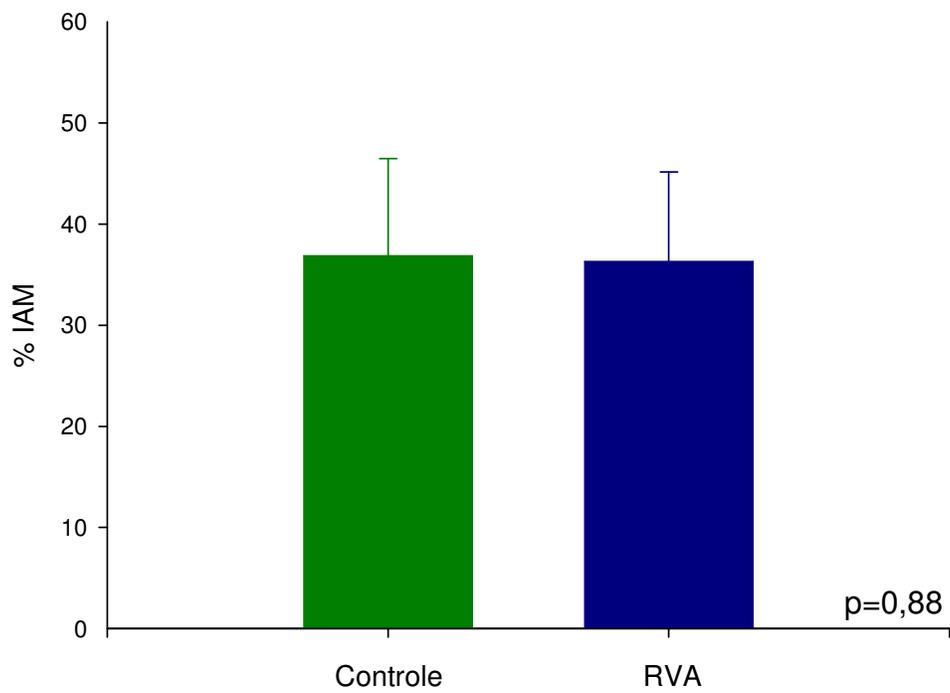
|                                   | Grupo C<br>(n=13) | Grupo RVA<br>(n=13) | Valor p |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------|---------|
| Onda E (cm/s)                     | 84,1 ± 21,0       | 94,6 ± 20,7         | 0,21    |
| Onda A (cm/s)                     | 61,0 (40,7-74,5)  | 61,0 (17,7-88,2)    | 0,76    |
| E/A                               | 1,17(1,15-1,70)   | 1,40 (1,13-5,31)    | 0,59    |
| TRIV (ms)                         | 31,0 (29,0-32,2)  | 27,0 (19,5-31,0)    | 0,05    |
| TRIV/RR <sup>0,5</sup> (ms)       | 68,8 ± 11,4       | 56,3 ± 16,8         | 0,04    |
| FC (bpm)                          | 316 ± 43,7        | 319 ± 62,3          | 0,91    |
| VAo (cm/s)                        | 81,0 (76,7-94,0)  | 90,0 (82,7-99,0)    | 0,38    |
| DC (ml/min)                       | 73,4 ± 38,3       | 75,6 ± 32,5         | 0,88    |
| VS (ml/min)                       | 0,23 ± 0,11       | 0,24 ± 0,10         | 0,85    |
| AS menor/PC (cm <sup>2</sup> /kg) | 1,24 ± 0,42       | 1,50 ± 0,40         | 0,18    |
| AD menor/PC (cm <sup>2</sup> /kg) | 1,81 ± 0,40       | 2,15 ± 0,33         | 0,03    |
| AS maior/PC (cm <sup>2</sup> /kg) | 1,64 ± 0,45       | 1,90 ± 0,63         | 0,32    |
| AD maior/PC (cm <sup>2</sup> /kg) | 2,42 ± 0,42       | 2,70 ± 0,50         | 0,15    |
| FVA menor (%)                     | 33,2 ± 9,92       | 32,9 ± 9,65         | 0,94    |
| FVA maior (%)                     | 32,7 ± 11,4       | 31,9 ± 11,6         | 0,87    |
| FVA média (%)                     | 33,0 ± 10,0       | 32,1 ± 8,70         | 0,82    |

IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais infartados com dieta padrão; Grupo RVA: animais infartados com restrição alimentar de vitamina A; E/A: relação entre as ondas E e A avaliadas pelo fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/RR<sup>0,5</sup>: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela FC; FC: frequência cardíaca; VAo: velocidade do sangue na aorta; DC: débito cardíaco; VS: volume sistólico; AS menor/PC: área sistólica no eixo menor corrigida pelo peso; AD menor/PC: área diastólica no eixo menor corrigida pelo peso; AS maior/PC: área sistólica no eixo maior corrigida pelo peso; AD maior/PC: área diastólica no eixo maior corrigida pelo peso; FVA menor: fração de variação de área no diâmetro menor; FVA maior: fração de variação de área no diâmetro maior, FVA média: fração de variação de área média. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

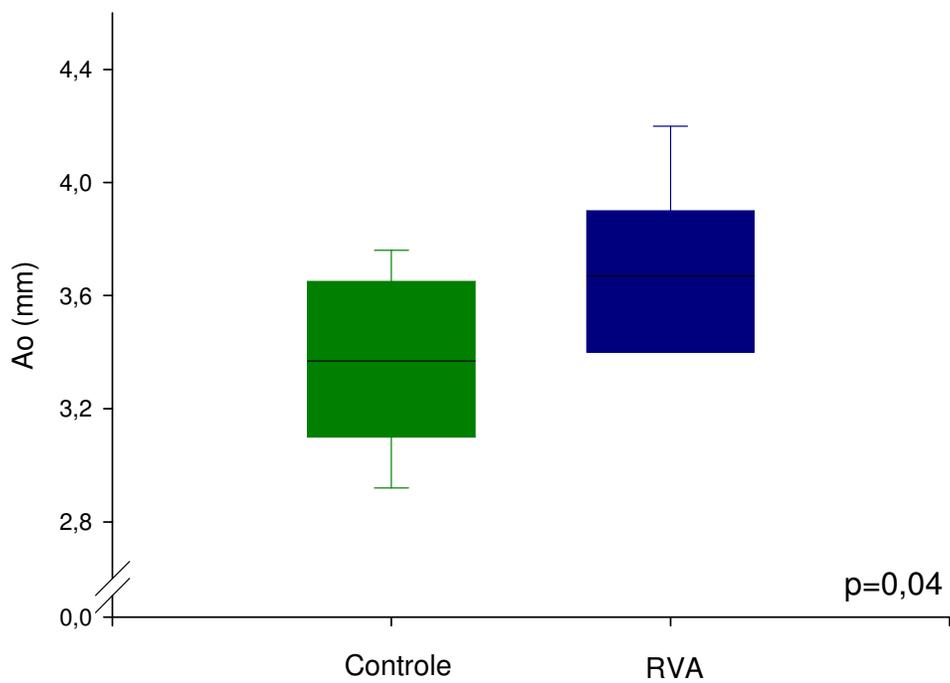
**Tabela 5.** Dados morfométricos dos ratos 3 meses após o IAM

|                         | Grupo C<br>(n=13)  | Grupo RVA<br>(n=13) | Valor p |
|-------------------------|--------------------|---------------------|---------|
| VE/PC (mg/g)            | 2,30 (1,95 - 2,44) | 2,20 (1,94 - 2,22)  | 0,33    |
| VD/PC (mg/g)            | 1,00 ± 0,50        | 1,03 ± 0,30         | 0,66    |
| AE/PC (mg/g)            | 0,17 (0,11- 0,25)  | 0,17 (0,12- 0,20)   | 0,68    |
| Teor água no pulmão (%) | 63,2 ± 10,1        | 68,0 ± 9,60         | 0,22    |
| Teor água no AE (%)     | 77,3 (75,2 - 79,6) | 76,8 (75,7 - 78,4)  | 0,84    |
| Teor água no fígado (%) | 68,8 (67,0 - 69,9) | 68,3 (68,0 - 69,2)  | 0,88    |
| Teor água no VD (%)     | 72,8 (69,1 - 75,3) | 75,1 (74,4 - 75,6)  | 0,14    |

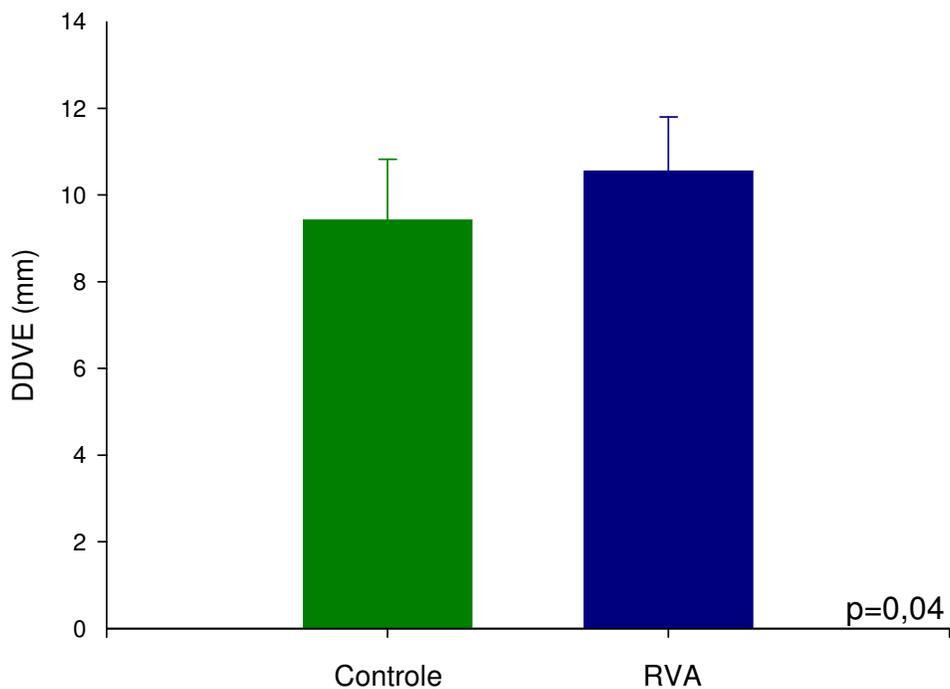
IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais infartados com dieta padrão; Grupo RVA: animais infartados com restrição alimentar de vitamina A; VE: ventrículo esquerdo; PC: peso do rato; VD: ventrículo direito; AE: átrio esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).



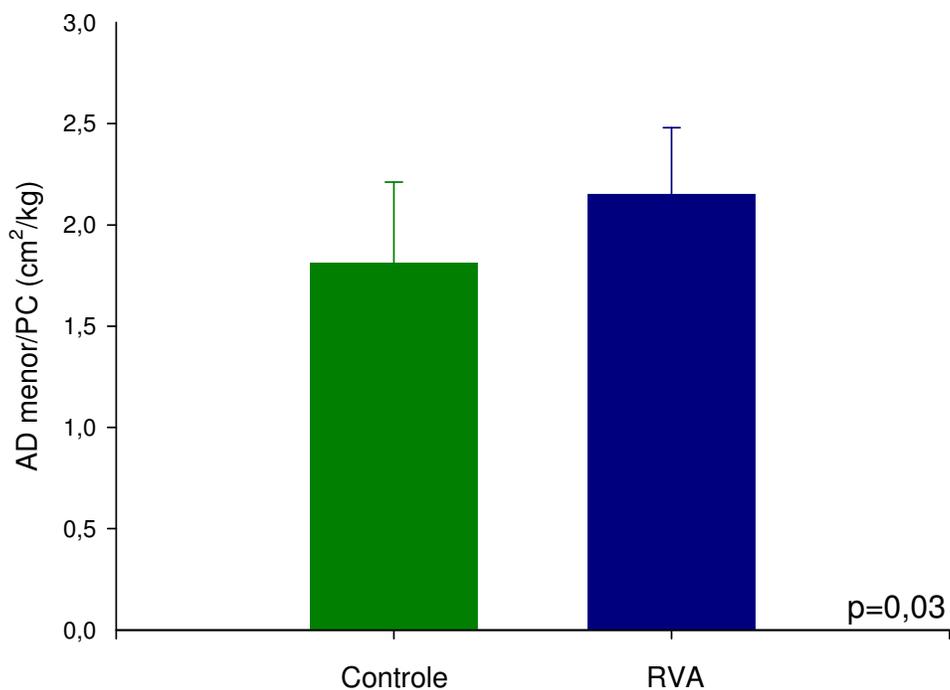
**Figura 1.** Tamanho do infarto após 3 meses de observação. % IAM = porcentagem do infarto agudo do miocárdio.



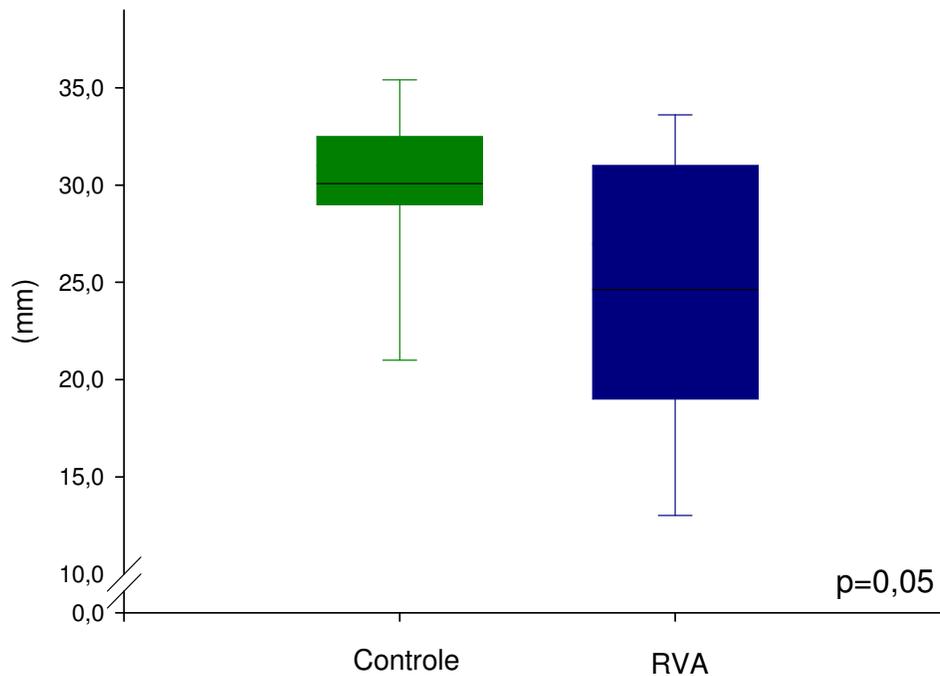
**Figura 2.** Diâmetro da aorta dos grupos infartado controle e infartado com dieta restrita em vitamina A.



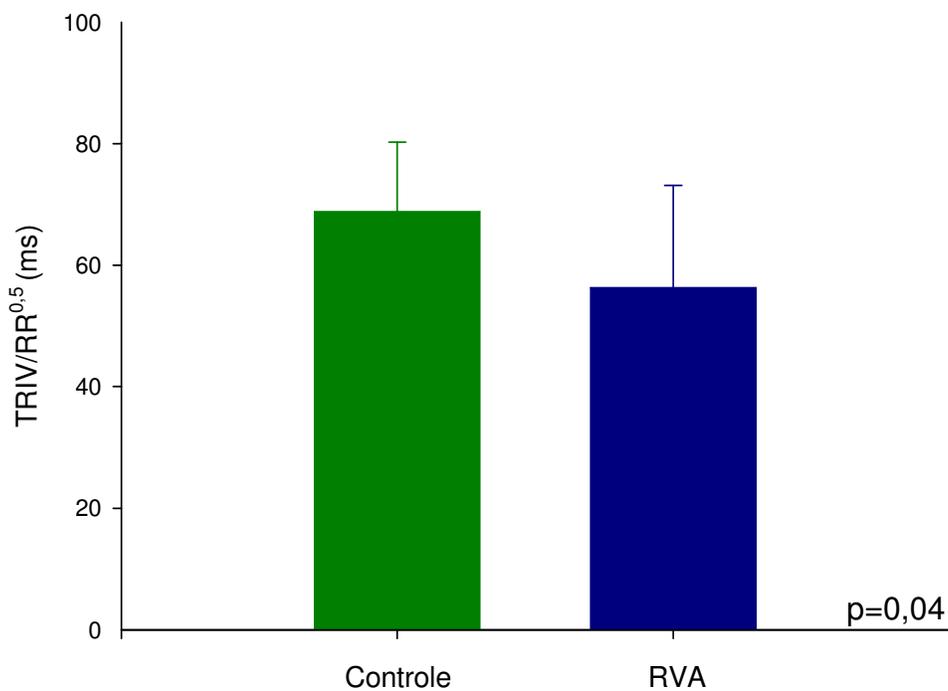
**Figura 3.** Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDVE) nos grupos infartado controle e infartado com dieta restrita em vitamina A.



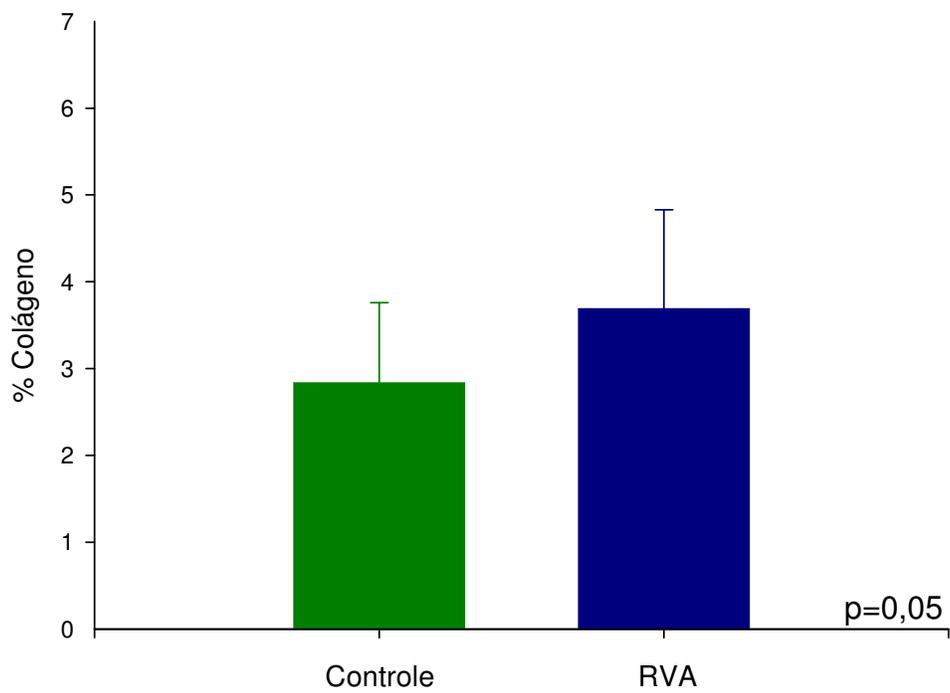
**Figura 4.** Área diastólica do ventrículo esquerdo no eixo menor (AD menor) corrigido pelo peso, nos grupos infartado controle e infartado com dieta restrita em vitamina A.



**Figura 5.** Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) dos grupos infartado controle e infartado com dieta restrita em vitamina A.



**Figura 6.** Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela FC ( $TRIV/RR^{0,5}$ ) dos grupos infartado controle e infartado com dieta restrita em vitamina A.



**Figura 7.** Porcentagem de colágeno (% Colágeno) dos grupos infartado controle e infartado com dieta restrita em vitamina A.

## **Discussão**

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da restrição alimentar de vitamina A no processo de remodelação ventricular, após o infarto agudo do miocárdio, em ratos. O conjunto de nossos resultados sugere intensificação da remodelação cardíaca após o IAM com a restrição alimentar de vitamina A.

Remodelação pode ser definida como alterações genéticas, que resultam em modificações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas. Essas alterações podem se manifestar clinicamente como alterações de volume, massa, constituição, geometria e/ou de função cardíaca<sup>(56-58)</sup>. Apesar da extrema complexidade do processo de remodelação ventricular, esse termo, após o infarto do miocárdio, é freqüentemente utilizado como sinônimo de crescimento celular, detectado pelo aumento da cavidade ventricular<sup>(56-59)</sup>. Um aspecto relevante desse processo refere-se ao fato de que a remodelação ventricular pós-infarto estar associada a pior prognóstico. Sua presença e intensidade estão relacionadas à maior incidência na formação de aneurisma, ruptura cardíaca, fibrose, alterações na função, arritmias e maior mortalidade<sup>(60)</sup>. Por essa razão, diversas estratégias vêm sendo estudadas para prevenir ou atenuar a remodelação pós-infarto. Entre estas estratégias, destaca-se a vitamina A.

O termo vitamina A engloba qualquer composto lipossolúvel com atividade biológica do retinol. Após sua ingestão, a vitamina A é absorvida, esterificada em sua maior parte pela lecitina retinol aciltransferase (LRAT) e incorporada ao quilomicron. O quilomicron é rapidamente hidrolizado e o quilomicron remanescente é clareado pelos hepatócitos. A vitamina A é transferida ao fígado sob a forma de retinol, e é reesterificada nas células de Ito, formando o maior estoque corporal dessa vitamina. Quando ocorre deficiência de vitamina A, temos redução da LRAT, e aumento da proteína carreadora do retinol celular que estimula a hidrólise do éster retinílico, possibilitando a secreção do retinol no sangue. Dessa forma, o fígado regula os níveis séricos de retinol e valores baixos desse composto, característicos de quadros de deficiência de vitamina A, apenas são encontrados quando os estoques hepáticos estão depletados<sup>(61)</sup>.

Aproximadamente 90-95% da vitamina A do plasma está na forma de retinol, ligado através de interações hidrofóbicas com a proteína carreadora do retinol (RBP). A holo-RBP (retinol + RBP) junto com a transtiretina forma o complexo circulante do retinol, que é levado aos tecidos e, provavelmente, através de um receptor para a RBP, o retinol é captado. Pela retinol desidrogenase o retinol é oxidado reversivelmente em retinal. O retinal, por sua vez, é convertido irreversivelmente em ácido retinóico (AR), pela retinal desidrogenase<sup>(26)</sup>.

A vitamina A pode chegar aos tecidos por meio de outras vias que não são reguladas pelo fígado. O AR ligado à albumina, os ésteres retinílicos e beta-caroteno através dos quilomicrons são alguns exemplos dessas vias<sup>(37)</sup>.

Os ácidos retinóicos que podem ser encontrados no organismo são o todo-trans-AR, 13-cis-AR, 9-cis-AR, e seus metabólitos como o 13-cis-4-oxo-AR. O ácido retinóico exerce praticamente todos os efeitos fisiológicos da vitamina A, através de sua ligação com os receptores nucleares RXR (receptor rexinóide) e RAR (receptor do ácido retinóico)<sup>(61)</sup>. Esses receptores organizam-se de maneira homodímera ou heterodímera, sendo que o RXR pode combinar-se de modo heterodímero com outros receptores nucleares esteróides (hormônio tireoidiano, vitamina D, e receptor ativado por proliferador de peroxissomo - PPAR)<sup>(62)</sup>. A ativação desses receptores inibe ou estimula a transcrição gênica.

O ácido retinóico, assim como o beta-caroteno, tem sua atuação cardíaca pouco estudada, principalmente em adultos. Estudos experimentais sugerem que o ácido retinóico possui papel importante na regulação da estrutura e função cardíaca durante a vida<sup>(63)</sup>.

No período embrionário, o papel do AR no coração é mais conhecido. Nos estágios iniciais da cardiogênese, o excesso de ácido retinóico produz defeitos congênitos relacionados à fusão e septação das câmaras cardíacas, além de alterações na via de saída do ventrículo esquerdo<sup>(33)</sup>.

No período pós-embrionário, as alterações do AR no coração são menos conhecidas. Em condições patológicas, a suplementação de AR reduziu a hipertrofia miocárdica induzida pela endotelina, fenilefrina e angiotensina II<sup>(64-66)</sup>.

Em camundongos transgênicos, o excesso de ácido retinóico resultou em alterações nos cardiomiócitos e miocardiopatia dilatada<sup>(34)</sup>. No entanto, em

estudo realizado por Paiva e colaboradores, ratos adultos suplementados com doses fisiológicas de ácido retinóico (0,3 mg/ kg de todo-trans-AR) apresentaram hipertrofia miocárdica, aumento do diâmetro ventricular e melhora da função cardíaca<sup>(67)</sup>. Dessa forma, os diferentes modelos de animais utilizados, dosagens diferentes de AR suplementadas e condições fisiopatológicas diversas parecem estar envolvidos nos resultados aparentemente controversos dos efeitos do excesso do AR no coração.

Em relação à deficiência de vitamina A, no período embrionário, modelos com deleção de genes dos receptores do AR, evoluem com paredes miocárdicas delgadas e edema generalizado associado à insuficiência cardíaca<sup>(68)</sup>.

A deficiência de vitamina A é um dos problemas nutricionais mais freqüentes do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 250 milhões de crianças em todo o mundo tem reservas de vitamina A diminuídas. Nesse grupo estão incluídas também a deficiência subclínica ou marginal de vitamina A, definida pelo nível sérico de retinol entre 0,35 e 0,70  $\mu\text{mol/L}$ , e conseqüentemente estoque hepático depletado<sup>(69)</sup>.

A deficiência de vitamina A, em modelos experimentais, pode ser estudada através da deleção de genes dos receptores de vitamina A, da hepatectomia e da restrição alimentar do nutriente.

O modelo de restrição alimentar é o mais próximo ao que acontece em seres humanos. Em nosso laboratório, o modelo de restrição alimentar de vitamina A padronizado por Azevedo foi adaptado de Gardner e Ross<sup>(36)</sup>. Este modelo utiliza a restrição alimentar, sendo possível a obtenção de ratos com estoque de retinol hepático diminuído, sem comprometimento da fertilidade das matrizes, do desenvolvimento dos filhotes e com ausência de malformações teciduais. Adicionalmente, foram observados níveis séricos de retinol adequados, mas com baixas concentrações de vitamina A no tecido cardíaco, provavelmente devido à redução do transporte de vitamina A aos tecidos pelos quilomicrons<sup>(36)</sup>. A diminuição da concentração tecidual de vitamina A também foi observada por Ross e Li no pulmão de ratos com restrição alimentar deste nutriente<sup>(70)</sup>.

Em nosso estudo, é importante observar que, apesar das matrizes já estarem sendo tratadas com dieta sem vitamina A durante a gestação e lactação,

seus filhotes não apresentaram diferença nos valores de retinol hepático, em relação aos controles. Portanto, esse modelo não acarreta deficiência de vitamina A intra-uterina, o que poderia estar relacionado ao desenvolvimento de malformações e insuficiência cardíaca<sup>(36)</sup>.

Outro aspecto importante de nosso protocolo é que tínhamos a intenção de que os ratos restritos apresentassem estoque hepático de retinol reduzido no momento do IAM, mas sem apresentarem peso inferior aos do grupo controle no momento do IAM, fato que poderia mascarar nossos resultados (Tabela 1). Assim, esse protocolo permitiu submeter ratos com estoque de retinol hepático diminuído, com aproximadamente 220 g, ao modelo de IAM experimental já padronizado em nosso laboratório.

O modelo de IAM experimental pela oclusão da coronária esquerda foi descrito inicialmente por Heimbürger em 1946 e modificado por Johns e Olson, Kaufman e colaboradores e Selye e colaboradores<sup>(49)</sup>. Aspecto relevante a ser considerado é que o rato, assim como o Ser humano, apresenta pobre circulação colateral. Assim, a oclusão da coronária esquerda resulta, na maioria das vezes, em infartos transmuralis. Considerando que o processo de remodelação após o IAM ocorre predominantemente/exclusivamente em infartos transmuralis, esse modelo é adequado para o estudo das alterações fisiopatológicas após o infarto.

A oclusão da coronária esquerda no rato, a 2 mm da origem, resulta em infartos que envolvem a maior parte da parede livre do ventrículo esquerdo, mas mantém a integridade da parte central do septo interventricular. Isso ocorre, pois o septo é irrigado por um ramo septal que se origina muito próximo da origem da coronária esquerda, sendo impossível ocluí-lo com esta técnica<sup>(49)</sup>.

Outro aspecto relevante neste modelo é a quantificação do tamanho do infarto. Tradicionalmente, essa quantificação pode ser realizada através de quatro métodos diferentes: medida do perímetro endocárdico da região infartada, em relação ao perímetro endocárdico total pelo ecocardiograma; medida do perímetro endocárdico da região infartada, em relação ao perímetro endocárdico total pela histologia; medida da área infartada em relação à área total pela histologia; e medida do perímetro endocárdico e epicárdico da região infartada

em relação ao perímetro endocárdico e epicárdico totais. Este último é o método mais utilizado para a quantificação do tamanho do IAM<sup>(71)</sup>.

Ainda em relação à quantificação do tamanho do infarto, tanto o método ecocardiográfico quanto o histológico, que quantificam o perímetro endocárdico podem superestimar o tamanho do infarto devido ao processo de expansão do IAM. O método que quantifica a área do infarto, por sua vez, devido à reabsorção e retração da área infartada e à hipertrofia da área não infartada, pode subestimar o tamanho do infarto. Além disso, nesse modelo de IAM experimental, a porcentagem do infarto no ápice é maior que na base do ventrículo esquerdo. Spadaro e colaboradores observaram que apenas o corte transversal do ventrículo esquerdo entre 4 e 6 mm, a partir do ápice, reflete o tamanho do infarto de todo o ventrículo esquerdo<sup>(49)</sup>.

Outro aspecto que dificulta a análise do infarto neste modelo é a grande variação do tamanho do IAM, que pode variar de 5 a 60%. Essa peculiaridade evidencia a importância dos tamanhos dos infartos do grupo RVA e C serem iguais, pois o tamanho do infarto é a principal variável que interfere com a remodelação cardíaca e com a disfunção ventricular<sup>(71)</sup>.

Pfeffer e colaboradores, utilizando o mesmo método utilizado por nós para quantificação do infarto, relacionaram o tamanho do IAM com a presença de remodelação cardíaca e disfunção ventricular. Animais com infartos menores que 20% não apresentaram evidências de remodelação ou disfunção ventricular. Infartos entre 20 e 40% induziram diversos graus de remodelação e disfunção ventricular, mas não sinais de insuficiência cardíaca, o que só ocorreu com IAMs superiores a 40%<sup>(44)</sup>. É importante ressaltarmos que, em nosso estudo, tanto os animais do grupo C quanto do grupo RVA apresentaram IAMs, em média, entre 20 e 40%. Portanto, apesar de não haver comparação com animais sem infarto, podemos inferir que ambos os grupos apresentam disfunção ventricular induzida pelo IAM.

A exemplo do que ocorre com o infarto, a restrição alimentar de vitamina A também leva à disfunção cardíaca, com piora da função sistólica, quando comparada a ratos normais. Azevedo, utilizando o mesmo modelo de restrição alimentar de vitamina A, comparou dieta restrita em vitamina A com a

controle, em corações de ratos normais. Os animais do grupo com restrição de vitamina A apresentaram maiores diâmetros das câmaras cardíacas esquerdas, acompanhados de menor porcentagem de encurtamento e fração de ejeção, em relação aos ratos do grupo controle.

Em nosso modelo, procuramos mostrar intensificação das alterações cardíacas com dieta restrita em vitamina A, em ratos cuja função ventricular já está comprometida pelo IAM. Nossos resultados sugerem que a restrição alimentar de vitamina A levou ao aumento da cavidade do ventrículo esquerdo.

Aceita-se que o aumento da cavidade ventricular esquerda parece ser modulado, pelo menos em parte, pelo aumento da atividade colagenolítica das MMPs. Acredita-se que o deslizamento de miócitos que ocorre no período imediatamente após o IAM, denominado expansão do infarto, seja ocasionado pelo aumento da tensão parietal e pelo aumento da atividade das MMPs. Além das alterações na área infartada, essas enzimas também levam a alterações na área não infartada. Assim, o aumento da atividade dessas enzimas e a redução TIMPs levam ao deslizamento de miócitos, com alterações do seu alinhamento, fazendo com que estes passem a apresentar distribuição em série, aumentando assim a cavidade ventricular. Além da degradação do colágeno normal, há aumento anormal do colágeno tipo I em outras regiões, levando ao aumento da rigidez da parede miocárdica e à disfunção diastólica<sup>(18,19)</sup>.

Dentre essas MMPs, podemos destacar a MMP-2 e 9. Em modelos de miocardiopatia isquêmica<sup>(20,21)</sup> e insuficiência cardíaca,<sup>(22,23)</sup> observou-se aumento da expressão das MMPs 2 e 9 e diminuição das TIMPs. Além disso, as MMPs são proteínas cuja expressão gênica também é regulada pelo AR. Estudos com cultura de fibroblastos mostraram que o AR (13-cis-AR e todo-trans-AR) diminuiu a expressão e a atividade colagenolítica das MMPs<sup>(38,39)</sup>. Zhu e colaboradores observaram, em modelo animal de enfisema, que o AR diminuiu a expressão das MMPs 1, 3 e 9<sup>(37)</sup>. Outro estudo mostrou que o aumento da atividade da MMP-2 e 9 também está relacionado ao desenvolvimento de aneurisma de aorta abdominal<sup>(72)</sup>. Nossos resultados também mostraram maior diâmetro da aorta nos ratos do grupo RVA. Tanto o aumento pressórico quanto o aumento da atividade das MMPs poderiam justificar esse resultado. Como a medida da pressão

arterial dos ratos não foi realizada, não sabemos qual a interferência dessa variável no aumento do diâmetro da aorta. Entretanto, podemos inferir que o aumento da atividade colagenolítica pode ter levado a esta dilatação. Portanto, esses dados reforçam nossa hipótese de que a atividade colagenolítica, tanto da MMP-2 quanto da MMP-9, deve estar aumentada nos ratos do grupo RVA.

Em relação às características funcionais de nossos animais, aparentemente não houve piora na função diastólica. Entretanto, alguns aspectos devem ser considerados. Primeiramente, o aumento da quantidade do colágeno intersticial e o aumento do DDVE são apenas algumas das variáveis que podem interferir com a função diastólica. Mecanicamente, a diástole inicia-se quando a pressão do ventrículo esquerdo começa a diminuir, durante o período de relaxamento isovolumétrico. Quando a pressão do ventrículo esquerdo cai abaixo da pressão atrial, ocorre a abertura da válvula mitral e o rápido enchimento do ventrículo esquerdo. O relaxamento ventricular, que é dependente de ATP e da quantidade de cálcio citoplasmático, normalmente termina no primeiro terço da fase de enchimento. Logo, o restante do enchimento ventricular é dependente das propriedades passivas do ventrículo esquerdo, das interações entre este com o ventrículo direito e com o pericárdio. No final da diástole, a contração atrial é responsável por determinar o volume diastólico final do ventrículo esquerdo.

Outro fator a ser discutido é que o grau de disfunção diastólica usualmente é determinado por meio da Doppler-ecocardiografia. É importante considerar a diferença entre o padrão caracterizado como pseudonormal e o restritivo. No padrão pseudonormal, ocorre manutenção do gradiente pressórico entre o átrio e o ventrículo, mas em patamar mais elevado de pressão, em relação ao normal. Com a piora gradual da complacência ventricular, pequenas variações do volume ventricular levam ao rápido aumento pressórico. Logo, no padrão restritivo, o fluxo inicial pela válvula mitral é mais rápido, levando ao aumento da onda E, com rápido equilíbrio do gradiente de pressão entre o átrio e o ventrículo. A complacência nesses casos é tão diminuída que há pequena contribuição da contração atrial no enchimento ventricular, levando a redução da onda A<sup>(73)</sup>. Adicionalmente, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), que corresponde na medida ecocardiográfica ao tempo entre o fechamento da válvula

aórtica e a abertura da mitral, pode estar reduzido no padrão restritivo, pelo gradiente pressórico mais elevado entre átrio e ventrículo, levando à abertura mais rápida da válvula mitral. O aumento da frequência cardíaca é outra variável que pode reduzir o TRIV.

Em nosso estudo, em relação às variáveis diastólicas, apesar da relação E/A não ser diferente entre os grupos, e da onda E ser maior que a onda A, o grupo RVA apresentou TRIV e TRIV/RR<sup>0,5</sup> estatisticamente menores que o grupo C. Como não houve diferença em relação à frequência cardíaca entre os grupos, o TRIV e TRI/RR<sup>0,5</sup> parecem estar mais rápidos no grupo RVA devido à diferença de gradiente pressórico entre o átrio e o ventrículo. Assim, podemos sugerir que a disfunção diastólica, já apresentada no modelo de IAM, pode ter sido intensificada pela dieta restrita em vitamina A.

Em relação às variáveis que determinam a função sistólica, não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais dos grupos controle e restrito. É importante ressaltar que, no modelo do rato, a distribuição das miosinas de cadeia pesada parecem ser importantes moduladores da função sistólica. A atividade ATP-ásica é dependente do tipo de isoforma de miosina encontrado no ventrículo esquerdo. Nos ratos, sabemos que a isoforma V3, formada por duas moléculas de MHC- $\beta$ , apresenta atividade três vezes menor que a isoforma V1. A mudança do padrão das isoformas da miosina, mediada tanto por sobrecarga pressórica, quanto volumétrica, é considerada marcador da hipertrofia patológica.

A expressão dos genes da MHC é controlada por diversos fatores, entre eles destacam-se: o hormônio tireoídiano, as catecolaminas, a mudança do substrato metabólico e a hipertrofia. Uma de nossas hipóteses é que a restrição de vitamina A poderia interferir com a estimulação do receptor nuclear do hormônio tireoídiano, visto que este pode estar ligado, de modo heterodímero, com o RXR. Além disso, em estudo realizado por Rouet-Bezineb e colaboradores, o aumento da MMP-9 estava relacionado à maior degradação da MHC<sup>(19)</sup>. No entanto, contrariamente à nossa hipótese, mas em consonância com os dados da função sistólica, a expressão das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  foi semelhante entre os animais de nosso estudo.

Em resumo, os ratos do grupo RVA apresentaram aumento da cavidade do ventrículo esquerdo, com aumento da porcentagem de colágeno. Além disso, o grupo RVA mostrou piora da função diastólica, mas sem redução da função sistólica em relação ao grupo controle. Um período de observação superior a três meses após o IAM poderia ser necessário para evidenciar potencial diferença na função sistólica. Adicionalmente, o IAM aumenta a captação cardíaca de vitamina A transportada pelo complexo carreador do retinol, fato que poderia minimizar a deficiência cardíaca de retinol mediada pela redução do transporte deste nutriente pelos quilomicrons em modelos de restrição alimentar de vitamina A<sup>(41)</sup>. Outro fator que pode ter contribuído para não encontrarmos diferença na função sistólica entre os grupos é o tamanho do infarto, que poderia mascarar os possíveis efeitos deletérios da restrição de vitamina A.

## **Conclusões**

Em conclusão, os achados do presente trabalho sugerem que:

- 1) A restrição dietética de vitamina A, após o infarto do miocárdio, promove intensificação do processo de remodelação cardíaca.
- 2) A intensificação da remodelação não é mediada por alterações na expressão das cadeias pesadas da miosina.

## **Resumo**

O objetivo de nosso estudo foi analisar a influência da restrição alimentar de vitamina A sobre a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio em ratos. **Métodos:** Foram utilizadas ratas prenhas, Wistar, previamente híginas, submetidas durante a gestação e lactação a duas dietas: 1) dieta AIN-93 isenta de vitamina A + 4 RE/g de dieta (dose fisiológica); 2) dieta AIN-93 isenta de vitamina A. Após o nascimento dos filhotes, os machos foram separados em gaiolas individuais. Os filhotes das ratas tratadas com dieta com dose fisiológica de vitamina A continuaram recebendo 4RE/g de dieta e os filhotes das ratas tratadas com dieta isenta de vitamina A receberam 0,18 RE/g de dieta. Quando atingiram, aproximadamente 220 g, os ratos foram submetidos ao infarto experimental. Após 24 horas do procedimento os ratos foram divididos em grupo controle (Grupo C, n=25), que continuou recebendo dieta com dose fisiológica de vitamina A, e grupo com restrição alimentar de vitamina A (Grupo RVA, n=26), que continuou recebendo 0,18 RE/g de dieta. Os ratos dos grupos C e RVA foram acompanhados durante 3 meses. Após esse período, os animais foram submetidos a estudo funcional, morfométrico e bioquímico. Para análise estatística foram utilizados o teste *t*-Student, Mann-Whitney e o  $\chi^2$ . O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação ao peso no momento do infarto e ao tamanho do infarto (C=36,9  $\pm$  9,6 %; RVA=36,3  $\pm$  8,9 %; p=0,88). A mortalidade durante o período de três meses, também não se mostrou diferente entre os grupos (C=48%; RVA=50%, p=0,891). O grupo RVA apresentou maior diâmetro da aorta [C=3,4 (3,1-3,6) mm; RVA=3,5 (3,4-3,9) mm, p=0,04], DDVE (C=9,4  $\pm$  1,4 mm; RVA=10,5  $\pm$  1,2 mm, p=0,04) e AD menor/PC (C=1,8  $\pm$  0,4 cm<sup>2</sup>/kg; RVA=2,1  $\pm$  0,3 cm<sup>2</sup>/kg, p=0,03) que o grupo C. Em relação à função diastólica, o grupo RVA apresentou menor TRIV/RR<sup>0,5</sup> que o grupo C (C=68,8  $\pm$  11,4 ms; RVA=56,3  $\pm$  16,8 ms, p=0,04). Além disso, grupo RVA apresentou porcentagem de colágeno maior que o grupo C (C=2,8  $\pm$  0,9 %; RVA=3,7  $\pm$  1,1 %, p=0,05). Em relação à função diastólica não houve diferença entre os grupos inclusive em relação à expressão da miosina de cadeia pesada  $\beta$  (C=47,3  $\pm$  6,6 %; RVA= 46,6  $\pm$  5,8 %, p=0,85). **Conclusões:** A dieta pobre em vitamina A, após o infarto do miocárdio, promoveu intensificação do processo de remodelação cardíaca, com alteração da função diastólica, mas sem alteração da função sistólica. A remodelação não foi mediada por alteração na expressão das cadeias pesadas da miosina.

# **Abstract**

The aim of this study was to analyze the influence of inadequate vitamin A ingestion on cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. **Methods:** wistar female rats during pregnancy and lactation were fed with two diets: 1) AIN-93 vitamin A sufficient diet (4 RE/g of diet) and 2) AIN-93 vitamin A free diet. After born, male rats were studied. Newborns from dams fed with AIN-93 vitamin A free diet, after weaning received AIN-93 with 0,18 RE/g of diet. Newborns from dams fed with AIN-93 vitamin A sufficient diet, after weaning, received the same diet until they were around 220 g. With 220 g the animals were submitted to myocardial infarction. After 24 hours from the procedure, the surviving rats were divided into two groups: control group (C group, n=25) that remain receiving AIN-93 vitamin A sufficient diet; and reduced vitamin A group (RVA group, n=26) that remain receiving AIN-93 with 0,18 RE/g of diet. The groups were observed during 3 months. After this period, they were submitted to morphometric, functional and biochemical analysis. Statistical analysis was performed with Student t-test and Mann-Whitney for comparisons between two groups when variables were continuous, and  $\chi^2$  when variables were categorical. The significant level was 5%. **Results:** There was no difference in weight at infarction moment and infarct size between the two groups (C=36,9  $\pm$  9,6 %; RVA=36,3  $\pm$  8,9 %; p=0,88). The mortality during the 3 months period after infarction was not different between the groups (C=48%; RVA=50%, p=0,891). RVA group showed higher aorta diameter [C=3,4 (3,1-3,6) mm; RVA=3,5 (3,4-3,9) mm, p=0,04], left ventricle diastolic diameter (C=9,4  $\pm$  1,4 mm; RVA=10,5  $\pm$  1,2 mm, p=0,04) and diastolic area in short axes/body weight (C=1,8  $\pm$  0,4 cm<sup>2</sup>/kg; RVA=2,1  $\pm$  0,3 cm<sup>2</sup>/kg, p=0,03) than C group. Considering the variables that represent diastolic function, RVA group showed lower TRIV/RR<sup>0,5</sup> than C group (C=68,8  $\pm$  11,4 ms; RVA=56,3  $\pm$  16,8 ms, p=0,04). Despite that, RVA group showed collagen percentage higher than C group (C=2,8  $\pm$  0,9 %; RVA=3,7  $\pm$  1,1 %, p=0,05). In regard to systolic function, there was no difference between the groups, including the expression of myosin heavy chain  $\beta$  (C=47,3  $\pm$  6,6 %; RVA=46,6  $\pm$  5,8 %, p=0,85). **Conclusions:** the inadequate vitamin A ingestion intensified cardiac remodeling after myocardial infarction, with alteration in diastolic function, despite no difference in systolic function. The remodeling process was not mediated by alterations in myosin heavy chain expression.

## **Referências Bibliográficas**

- 1) Ministério da saúde - Rede Interagencial de Informações para a Saúde. 2004. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c04.def>.
- 2) Ministério da saúde - Rede Interagencial de Informações para a Saúde. 2005. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d13.def>.
- 3) 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; 3:371-8.
- 4) Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999; 79:215-62.
- 5) Alpert NR, Muliere LA, Hasenfuss G. Myocardial chemo-mechanical energy transduction. In: *The Heart and Cardiovascular System*. Fozzard HA, Haber E, Kats AM, Jennings R, Morgan H, editors. New York: Raven, 1992, p111-128.
- 6) Opie LH, Commerford PJ, Gersh B, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*. 2006; 367:356-67.
- 7) Sugden PH. Mechanotransduction in cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation*. 2001; 103:1375-7.
- 8) Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44:1609-18.
- 9) Banfi C, Cavalca V, Veglia F, Brioschi M, Barcella S, Mussoni L, et al. Neurohormonal activation is associated with increase levels of plasma matrix metalloproteinase-2 in human heart failure. *Eur Heart J*. 2005; 26:481-8.
- 10) Sawyer DB, Siwik D, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34:379-88.
- 11) Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I Myocyte hypertrophy. *Am J Physiol*. 1985; 248:876-82.
- 12) St John Sutton M, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of

- captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation*. 1997; 96:3294-9.
- 13) Schaper J, Froede TA, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991; 83:504-14.
  - 14) Brooks WW, Bing OHL, Blaustein AS, Allen PD. Comparison of contractile state and myosin isozymes of rat right and left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1987; 19:433-40.
  - 15) Dorn GW, Robbins J, Ball N, Walsh RA. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol*. 1994; 36:400-5.
  - 16) Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991; 83:1849-65.
  - 17) Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JPM. Tissue repair and angiotensin II generated at sites of healing. *Basic Res Cardiol*. 1997; 92:75-8.
  - 18) Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JPM. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling, and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26:279-92.
  - 19) Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P, Delcourt A, Dorent R, Perennec J, et al. Altered balance between matrix gelatinases MMP-2 and/ MMP-9 and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail*. 1999; 1:337-52.
  - 20) Tziakas DN, Chalikias GK, Papaioakeim M, Hatzinikolaou EI, Stakos DA, Tentes IK, et al. Comparison of levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 in patients with ischemic cardiomyopathy versus nonischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2005; 96:1449-51.
  - 21) Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase - 2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000; 101:1833-9.
  - 22) Moshal KS, Tyagi N, Moss V, Henderson B, Steed M, Ovechkin A, et al. Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human

- heart end stage failure. *J Cell Mol Med.* 2005; 9:704-13.
- 23) Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Sapallarossa P, et al. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33:648-56.
  - 24) Aikawa Y, Rohde L, Plehn J, Greaves SC, Menapace F, Arnold MO, et al. Regional wall stress predicts ventricular remodeling after anteroseptal myocardial infarction in the Healing and Early Afterload Reducing Trial (HEART): an echocardiography-based structural analysis. *Am Heart J.* 2001; 141:234-42.
  - 25) Doughty RN, Whalley GA, Gamble G, MacMahon S, Sharpe N. Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. Australia-New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29:1060-6.
  - 26) Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1440:139-62.
  - 27) Ross AC. Vitamin A and carotenoids. In: *Modern Nutrition in Health and Disease.* Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 351-75.
  - 28) Geraldo RRC, Paiva SAR, Pitas AMCS, Godoy I, Campana AO. Distribution of hypovitaminosis A in Brazil in the last four decades: dietary intake, clinical signs and biochemical data. *Rev Nutr.* 2003; 16:443-60.
  - 29) Ramalho RA, Flores H, Saunders C. Hypovitaminosis A in Brazil: a public health problem. *Rev Panam Salud Publica.* 2002; 12:117-22.
  - 30) Cruz AAVE, Castro FAA, Fernandes SL, Cortes JF, Pierre-Filho PTP, Rocha EM, Marchini JS. Adult blindness secondary to vitamin A deficiency associated with an eating disorder. *Nutrition.* 2005; 21:630-3.
  - 31) Third report on the world nutrition situation. Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition. Geneva: Publications WHO; 1997. 111p.
  - 32) Smith SM, Dickman ED. New insights into retinoid signaling in cardiac development and physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 1997; 7:324-9.
  - 33) Shenefel RE. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic

- acid-relation to dose and stage at treatment. *Teratology*. 1972; 5:103-18.
- 34) Colbert MC, Hall DG, Kimball TR, Witt SA, Lorenz JN, Kirby ML, et al. Cardiac compartment-specific overexpression of a modified retinoic acid receptor produces dilated cardiomyopathy and congestive heart failure in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1997; 100:1958-68.
- 35) Colbert MC, Kirby ML, Robbins J. Endogenous retinoic acid signaling colocalizes with advanced expression of the adult smooth muscle myosin heavy chain isoform during development of the ductus arteriosus. *Circ Res*. 1996; 78:790-8.
- 36) Azevedo PS. Influência da restrição alimentar de vitamina A sobre o coração de ratas adultas.[tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2007.
- 37) Zhu YK, Liu X, Ertl RF, Kohyama T, Wen FQ, Wang H, et al. Retinoic acid attenuates cytokine-driven fibroblast degradation of extracellular matrix in three-dimensional culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 25:620-7.
- 38) Bauer EA, Seltzer JL, Eisen AZ. Retinoic acid inhibition of collagenase and gelatinase expression in human skin fibroblast cultures. Evidence for a dual mechanism. *J Invest Dermatol*. 1983; 81:162-9.
- 39) Bauer EA, Seltzer JL, Eisen AZ. Inhibition of collagen degradative enzymes by retinoic acid in vitro. *J Am Acad Dermatol*. 1982; 6:603-7.
- 40) Hill M, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation*. 1997; 96:2414-20.
- 41) Palace VP, Hill MF, Khaper N, Singal PK. Metabolism of vitamin A in the heart increases after a myocardial infarction. *Free Rad Biol Med*. 1999; 26:1501-7.
- 42) Gardner EM, Ross AC. Dietary vitamin A restriction produces marginal vitamin A status in young rats. *J Nutr*. 1993; 123:1435-43.
- 43) Heimbürger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946; 52:677-89.
- 44) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979; 44:503-12.

- 45) Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000; 95:208-14.
- 46) Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58:1072-83.
- 47) Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail.* 1999; 5:213-23.
- 48) Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000; 89:1445-54.
- 49) Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980; 104:179-83.
- 50) Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol.* 2000; 279:1534-9.
- 51) Tang G, Krisky NI. Differentiation between central and excentric cleavage of beta-carotene. *Methods Enzymol.* 1993; 214:69-74.
- 52) Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64:594-602.
- 53) Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; 22:686-95.
- 54) Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; 39:233-41.
- 55) Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle

- myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol*. 1993; 75:2337-40.
- 56) Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990; 81:1161-72.
- 57) Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left-ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985; 57:84-95.
- 58) Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling, Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35:569-82.
- 59) Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D, Christ M, Ertl G. Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 104:982-5.
- 60) Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process. *Am J Cardiol*. 1991; 68:127-31.
- 61) Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol Rev*. 1991; 71:951-90.
- 62) Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 1996; 10:940-54.
- 63) Pan J, Baker KM. Retinoic acid and the heart. *Vitam Horm*. 2007;75:257-83.
- 64) Wang HJ, Zhu YC, Yao T. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2002; 92:2162-8.
- 65) Wu JM, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D-3 and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1996; 97:1577-88.
- 66) Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial-cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:7391-5.
- 67) Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in

- adult rats. *Am J Physiol.* 2003; 284:2242-6.
- 68) Dyson E, Sucov HM, Kubalak SW, Schmidschonbein GW, Delano FA, Evans RM, et al. Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid-X receptor -  $\alpha$  -/- mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:7386-90.
- 69) Fourth Report on the World Nutrition Situation. Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition. Geneva: Publications WHO; 2000. 121p.
- 70) Ross AC, Li N. Lung retinil ester is low in young adult rats fed a vitamin A-deficient diet after weaning, despite neonatal vitamin A supplementation and maintenance of normal plasma retinol. *J Nutr.* 2007; 137:2213-8.
- 71) 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; 89:83-7.
- 72) Papalambros E, Sigala F, Georgopoulos S, Menekakos C, Giatromanolaki A, Bastounis E, et al. Immunohistochemical expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in abdominal aortic aneurysms: correlation with symptoms and aortic diameter. *Int J Mol Med.* 2003; 12:965-8.
- 73) Ommen SR, Nishimura RA. A clinical approach to the assessment of left ventricular diastolic function by Doppler echocardiography: update 2003. *Heart.* 2003; 89:iii18-iii23.