



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

Renata Aparecida Candido da Silva

**Influência da via mTOR no processo de
remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico**

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

Orientador: Prof. Adj. Leonardo Antonio Mamede Zomoff
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci

**Botucatu
2015**

Renata Aparecida Candido da Silva

Influência da via mTOR no processo de
remodelação cardíaca induzida pelo ácido
retinóico

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

Orientador: Prof. Adj. Leonardo Antonio Mamede Zornoff
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Renata Aparecida Candido da.

Influência da via mTOR no processo de remodelação
cardíaca induzida pelo ácido retinóico / Renata Aparecida
Candido da Silva. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Coorientador: Marcos Ferreira Minicucci

Capes: 40101100

1. Coração - Doenças - estudos experimentais. 2.
Remodelação ventricular. 3. Ácido retinóico. 4. Rato como
animal de laboratório.

Palavras-chave: Ácido retinóico; Ratos normais;
Remodelação cardíaca.

Dedicatória



Aos meus pais *Argemiro* e *Vera* pelo apoio em todos meus sonhos, pelos valores ensinados e que nunca me abandonaram nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão *André* por ser um exemplo de dedicação e por todo carinho e apoio.

Ao meu namorado *Rafael* pelo amor, carinho, por seu meu companheiro em todos os momentos e fazer dos meus dias como sempre sonhei.

Agradecimentos especiais



A *DEUS* por me guiar pelo melhor caminho e me dar luz para vencer todos os desafios.

Ao meu orientador *Prof. Adj. Leonardo Antonio Mamede Zornoff* pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação profissional que me proporcionou crescer e amadurecer e por nunca deixar de acreditar que tudo iria dar certo. Agradeço a confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci* e aos demais professores do grupo de pesquisa *Sergio, Paula e Bertha*, pelos ensinamentos.

A todos meus colegas, em especial *Andrea e Priscila* que me passaram seus conhecimentos. À *Bruna, Ana Carolina, Amanda, Renan, Diego e Pamela* por compartilhar experiências neste trabalho. Sem vocês eu não teria conseguido.

Meus sinceros agradecimentos

Agradecimientos



Às professoras *Meliza e Silméia* pela realização dos exames ecocardiográficos.

À *Profa Dra Bertha F. Polegato*, pela realização do estudo do coração isolado e pelos ensinamentos.

À *Profa Dra Ana Angélica H. Fernandes*, do Departamento de Bioquímica, pela realização das análises referentes ao metabolismo energético e estresse oxidativo.

Às professoras *Paula Schimit Azevedo e Marina Politi Okoshi* pelas valiosas contribuições no exame geral de qualificação.

Aos colegas de Pós-Graduação do laboratório, por terem compartilhado momentos de alegria e dificuldades comigo.

A todos os colaboradores do Laboratório Experimental da Clínica Médica, em especial *Mario Bruno* por toda dedicação no meu projeto na parte de biotérios e confecção de ração.

Aos colaboradores do Departamento de Clínica Médica, da Pós-Graduação e da Biblioteca que auxiliaram nas diferentes etapas do projeto.

Aos *amigos e familiares* que sempre torceram por mim.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP* pela
concessão da bolsa de estudos (Processo n° 2012/21186-2).

Muito obrigada!

Epigrafe



‘Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.’

Charles Chaplin

Sumário



Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	iv
Introdução.....	1
Hipótese.....	8
Objetivo.....	10
Material e Métodos.....	12
Resultados.....	28
Discussão.....	54
Conclusão.....	63
Referências.....	65

Resumo



Resumo

O processo de remodelação cardíaca pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles: mecânicos, genéticos e bioquímicos, no qual se destaca a relevância do ácido retinóico (AR). Evidências sugerem que o AR é essencial no período embrionário e, no período pós-embrionário, pode desencadear/modular a hipertrofia cardíaca. No entanto, não está claro se a hipertrofia cardíaca induzida pelo AR é fisiológica ou patológica. O objetivo principal do estudo foi verificar a participação da via mTOR por meio do estudo da Akt, NFκB, S6K e PI3K em suas formas totais e fosforiladas. Os objetivos secundários foram avaliar a participação das MAPKs (JNK/ERK) e as consequências no metabolismo energético e estresse oxidativo, de ratos suplementados com ácido retinóico. Para isso foram utilizados 80 ratos divididos em 4 grupos: grupo controle (C, n=20) recebeu dieta padrão; AR1 (n=20), AR2 (n=20) e AR3 (n=20) que receberam 0,3 ; 5 e 10 mg de AR/kg de ração respectivamente. Após dois meses os animais foram submetidos ao estudo ecocardiográfico, estudo de coração isolado e eutanasiados para coleta de material biológico. As variáveis avaliadas foram a porcentagem de colágeno, área seccional dos miócitos, diâmetro transverso dos miócitos, proteínas por western blot, estresse oxidativo e enzimas do metabolismo energético. Para análise estatística foi realizado ANOVA de 1 via complementada por testes recomendados. Para avaliar a resposta dose-dependente foi utilizado o *test for linear trend*. Em nosso estudo observamos que houve efeito dose-dependente para o diâmetro do átrio esquerdo, sendo maior no grupo C e menor no grupo AR3; hipertrofia dos cardiomiócitos sem acúmulo de colágeno; ativação das

MAPKs através do aumento da expressão da JNK; diminuição da piruvato desidrogenase; da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase, da ATP sintase, do complexo I e complexo II quando comparados ao grupo C; e aumento no hidroperóxido de lipídeo e da catalase também quando comparadas ao grupo C. Assim, podemos concluir que a suplementação de ácido retinóico resultou em remodelação cardíaca em ratos normais. Esse fenômeno não teve a participação da via mTOR, porém, teve a participação das MAPKs, estresse oxidativo e alterações do metabolismo energético característicos de remodelação cardíaca deletéria.

Abstract



Abstract

The process of cardiac remodeling can be influenced by several factors including mechanical, genetics and biochemical, that emphasize the importance of retinoic acid (RA). Evidence suggests that the RA is essential in the embryonic period and in the post embryonic development, it can trigger/modulate cardiac hypertrophy. However it is unclear whether the cardiac hypertrophy induced by RA is physiological or pathological. The main objective of the study was to investigate the involvement of mTOR pathway through the study of Akt, NF κ B, S6K and PI3K in its total and phosphorylated forms. Secondary objectives were to evaluate the involvement of MAPKs (JNK / ERK) and the consequences of energy metabolism and oxidative stress in rats supplemented with RA. For this we used 80 rats divided into 4 groups: the control group (C, n = 20) received standard diet; AR1 (n = 20), AR2 (n = 20) and AR3 (n = 20) received 0.3; 5 and 10mg AR/kg diet respectively. After two months the animals were submitted to echocardiographic study, study of isolated heart and euthanized for collection of biological material. The variables evaluated were the percentage of collagen, sectional area of myocytes, transverse diameter of myocytes, protein by western blot, oxidative stress and enzymes of energy metabolism. Statistical analysis was performed through 1-way ANOVA complemented by recommended tests. To assess the dose-response, a test for linear trend was used. In our study we observed that there was a dose-dependent effect on the diameter of the left atrium, being higher in group C and lower group AR3; cardiomyocyte hypertrophy without collagen accumulation; activation of MAPKs by increasing the expression of JNK; reduction of pyruvate dehydrogenase; the β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase,

ATP synthase, complex I and complex II compared to group C; and an increase in lipid hydroperoxide and catalase also when compared to group C. Thus it can be concluded that the retinoic acid supplementation resulted in cardiac remodeling in normal mice. This phenomenon did not have the participation of the mTOR pathway, however, did have the participation of MAPKs, oxidative stress and altered energy metabolism characteristics of deleterious cardiac remodeling.

Introdução



1. Introdução

O termo remodelação pode ser definido como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada injúria ⁽¹⁻³⁾.

O processo de remodelação ocorre em situações fisiológicas, como por exemplo, o desenvolvimento normal do coração até a vida adulta, porém, usualmente, esse termo descreve alterações cardíacas patológicas que ocorrem como consequência de diversos estímulos ⁽¹⁾.

Inicialmente, o objetivo do processo de remodelação ventricular seria o de manter a função cardíaca estável frente à determinada injúria, como por exemplo: isquemia, inflamação, alterações genéticas, sobrecarga de volume ou de pressão. Um bom exemplo é o que ocorre após o infarto agudo do miocárdio. Simultaneamente à necrose das miofibrilas, há desintegração do colágeno interfibrilar. A perda desse tecido de sustentação torna a região mais propensa à distensão e, conseqüentemente, mais susceptível às deformações. Assim, pode ocorrer deslizamento de áreas musculares necróticas, com realinhamento dos miócitos na parede infartada. Como consequência, há afinamento da região infartada e dilatação da cavidade. O aumento da cavidade, via mecanismo de Frank-Starling, poderia aumentar o volume sistólico e manter o débito cardíaco apesar da perda de massa. Cronicamente, entretanto, com a continuidade e/ou progressão do processo, ocorrem diversas alterações genéticas, bioquímicas e estruturais, que resultam em disfunção ventricular progressiva e morte ^(1, 3-8).

Embora seja amplamente aceito que a remodelação resulte em deterioração progressiva da função ventricular, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos. Independentemente do estímulo, uma das características mais marcantes do processo de remodelação é a modificação do padrão de expressão de diversas proteínas, com o aumento ou a re-expressão de genes do período fetal, tais como o peptídeo natriurético atrial, a enzima conversora da angiotensina e as isoformas fetais das proteínas contráteis. As causas e as possíveis vantagens ou desvantagens desse comportamento ainda não estão suficientemente esclarecidas. Aceita-se, entretanto, que a expressão genética fetal seja tanto um marcador, como possa ser um dos mecanismos propriamente envolvidos na progressão do processo de remodelação cardíaca, até o aparecimento da disfunção ventricular ^(5, 7). Os potenciais fatores envolvidos na deterioração progressiva da função ventricular no coração remodelado incluem: morte celular (apoptose, necrose e autofagia), fibrose, déficit energético, aumento do estresse oxidativo, hipertrofia, alterações geométricas, modificações nas proteínas contráteis, ativação das metaloproteases, alterações da via beta-adrenérgica e do transporte de cálcio, no citoesqueleto, nas proteínas de membrana (integrinas ADAM e as metaloproteases de membrana) e nas das proteínas da matriz (trombospondina 2, osteopontina e tenascina C) ^(5, 7).

Portanto, a remodelação cardíaca envolve uma série de alterações morfológicas em resposta a determinado estímulo ou injúria. Inicialmente, esse processo pode ser adaptativo, mas, a longo prazo, uma das consequências da remodelação seria o aparecimento de progressiva disfunção ventricular.

Um dos aspectos mais relevantes a respeito do processo de remodelação ventricular refere-se ao fato de que esse processo é influenciado por diversos estímulos. Fatores mecânicos (sobrecarga hemodinâmica, pressórica ou volumétrica), genéticos (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada), e bioquímicos (angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6, fator de crescimento transformador beta 1, fator de crescimento símile-insulina 1, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) podem tanto desencadear como regular a remodelação cardíaca ^(1, 4-8). Dentre os fatores bioquímicos, o ácido retinóico vem sendo estudado como modulador do processo de remodelação cardíaca.

O ácido retinóico é um metabolito ativo da vitamina A e tem papel essencial na modulação da estrutura e função cardíaca. O ácido retinóico atua por meio de receptores nucleares específicos como o receptor para ácido retinóico (RAR - RAR α , RAR β , RAR γ) e o receptor rexinóide (RXR - RXR α , RXR β , RXR γ). A concentração de ácido retinóico no embrião é altamente regulada para prevenir o excesso ou falta desse composto, condições que podem produzir efeitos teratogênicos, que variam com o tempo e intensidade de exposição. Nesse contexto, a participação do ácido retinóico, via receptores RXR, no desenvolvimento ventricular cardíaco tem sido mostrada em fetos transgênicos de camundongos com receptores RXR α nulos (RXR α -/-). Esses animais morrem durante o desenvolvimento fetal devido a defeitos miocárdicos, como permanência da parede ventricular anormalmente fina e incapacidade do coração em adaptar-se a carga de trabalho demandada pelo feto em crescimento ⁽⁹⁾. Ocorre ainda miócitos com diferenciação celular precoce, morfologia alongada, e com baixo nível de divisão celular mitótica ^(9, 10).

Defeitos nos septos ventriculares e vários graus de bloqueio átrio-ventricular são também observados nesses animais ⁽¹¹⁾. Da mesma forma, mutantes com RXR_β e RAR nulos bem como mutantes duplos, com RXR_α/RXR_β nulos, apresentam fenótipo parecido ⁽¹⁰⁾.

Assim, os retinóides são requeridos nos primeiros estádios de desenvolvimento cardíaco embrionário para prevenir diferenciação, manter adequada proliferação e controlar a forma celular e tanto o RXR como o RAR mediam essas funções.

No período pós-embrionário, o ácido retinóico também parece ter papel na modulação da morfologia e da função cardíaca. Estudos experimentais sugerem que o ácido retinóico suprime alterações morfológicas do coração e alterações na expressão de genes associados com hipertrofia cardíaca induzida por diferentes estímulos como, por exemplo, pela endotelina, angiotensina II e catecolaminas ⁽¹¹⁻¹³⁾. Em ratos adultos o excesso de sinalização do ácido retinóico (superexpressão do RAR ou RXR) resulta em anormalidades no cardiomiócito e cardiomiopatia dilatada ⁽¹⁴⁾. Em contraste, animais deficientes em vitamina A desenvolveram disfunção diastólica ⁽¹⁵⁾ e outros com modelos knockout para o receptor de vitamina A possuem a parede miocárdica mais fina ⁽¹⁶⁾.

Em nosso laboratório, a suplementação de ácido retinóico atenuou o processo de remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio ⁽¹⁷⁾ e durante a exposição à fumaça do cigarro ⁽¹⁸⁾. Portanto, o ácido retinóico possui potencial papel na atenuação do processo de remodelação ventricular secundária a diversos estímulos.

Em ratos normais, a suplementação de ácido retinóico induziu hipertrofia, sem acúmulo de colágeno, com manutenção da função sistólica ⁽¹⁹⁾. Esses achados são compatíveis com alterações encontradas na fase inicial de processo patológico ou alterações observadas em processos fisiológicos como, por exemplo, no exercício físico. Assim, os efeitos da suplementação do ácido retinóico em corações normais não estão completamente esclarecidos. Portanto, o estudo de vias de sinalização envolvidos em alterações fisiológicas ou patológicas cardíacas pode ser interessante. Da mesma forma, o estudo de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e no metabolismo energético podem elucidar se modificações cardíacas são adaptativas ou deletérias.

O complexo mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) é uma serina/treonina quinase responsável pelo controle do crescimento celular regulando processos como biogênese de ribossomos, síntese protéica, metabolismo mitocondrial e autofagia. A mTOR é encontrada sob a forma de dois complexos distintos, mTORC1 e mTORC2, sendo que o complexo mTORC1 possui um substrato bem caracterizado, a S6K, que é um ativador da tradução de proteínas. Em relação à mTORC2, suas ações parecem ser mediadas pelas vias AKT e NF κ B ⁽²⁰⁻²²⁾.

Diversos estudos sugerem que mTORC1 é o complexo envolvido na modulação da hipertrofia secundária a sobrecarga hemodinâmica e outros processos patológicos. Por outro lado, o complexo mTORC2 parece modular a sobrevivência celular e o crescimento em condições fisiológicas ⁽²³⁾.

Da mesma forma, a fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) pode modular o processo de remodelação cardíaca, estando envolvida na hipertrofia fisiológica ^(24, 25) e exercendo efeitos protetores em diferentes modelos de agressão

cardíaca e disfunção ventricular ⁽²⁶⁾. Por outro lado, as proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPK) (kinase regulada por sinal extracelular – ERK1/2 e c-Jun kinase N-terminal – JNK), têm sido implicadas em mediar hipertrofia cardíaca patológica ^(27, 28).

Pelo exposto, o estudo do complexo mTOR poderia auxiliar na interpretação dos efeitos do ácido retinóico no coração. No entanto, a participação da mTOR nas alterações cardíacas induzidas pelo ácido retinóico não é conhecida.

Hipótese



2. Hipótese

A via da mTOR pode participar do processo de remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico.

Objetivo



3. Objetivo

O objetivo principal do nosso trabalho foi analisar o comportamento do complexo mTOR no coração de ratos suplementados com diferentes doses de AR, por meio do estudo da AKT, NFκB, S6K (formas total e fosforilada), juntamente com a via PI3K.

Os objetivos secundários foram avaliar a participação das MAPKs (JNK/ERK) e as consequências no metabolismo energético e estresse oxidativo, de ratos suplementados com ácido retinóico.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

Acondicionamento dos animais

O protocolo experimental do presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

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

Delineamento experimental e suplementação do ácido retinóico

Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo C (n=20), formado pelos animais controle; grupo AR1 (n=20), formado pelos animais suplementados com ácido retinóico na dose de 0,3 mg/kg de dieta; grupo AR2 (n=20), formado pelos animais suplementados com ácido retinóico na dose de 5 mg/kg de dieta e grupo AR3 (n=20), formado pelos animais suplementados com ácido retinóico na dose de 10 mg/kg de dieta. Os animais foram observados por 2 meses.

A ração foi ofertada diariamente e quantificada as sobras no próximo dia. Foi utilizada ração Nuvilab (Nuvital®, com a seguinte composição por Kg de

ração: vitamina A 12000 UI; vitamina D 1800 UI; vitamina E 30 mg; vitamina K 3mg; vitamina B1 5 mg; vitamina B2 6mg; vitamina B6 7 mg; vitamina B12 20mcg; niacina 60mg; ácido pantotênico 20mg; ácido fólico 1mg; biotina 0,05mg; colina 600mg; ferro 50mg; zinco 60mg; cobre 10mg, iodo 2mg; manganês 60mg; selênio 0,05mg; cobalto 1,5mg; metionina 300mg; lisina 100mg; cálcio 1,4%; fósforo 0,8%).

Como o ácido retinóico é lipossolúvel, foi diluído em óleo de milho (10 ml/Kg de ração) antes de ser adicionado a ração triturada. A ração para o grupo controle foi preparada da mesma forma, adicionada apenas de óleo (10 ml/Kg de ração). Após a adição de óleo, a ração foi homogeneizada e peletizada. Após processo de secagem foi armazenada em freezer (-14°C).

Durante o período experimental, os animais foram pesados uma vez por semana.

Estudo Ecocardiográfico

Após 2 meses de tratamento, os animais dos 4 grupos foram submetidos a estudo ecocardiográfico, segundo método descrito previamente ^(17, 18). Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg), por via intramuscular, e após tricotomia da região anterior do tórax, foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. A partir do corte paraesternal em eixo menor, foi possível a obtenção da imagem monodimensional transversa do ventrículo esquerdo, utilizando-se a imagem bidimensional como guia para posicionamento do feixe ultrassônico logo abaixo

do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional, ajustada para a velocidade de 100 mm/s, foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão e em acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography/European Association of Echocardiography ⁽²⁹⁾. O aparelho utilizado foi General Electric Medical System modelo Vivid S6 (Tirat Carmi, Israel), equipado com transdutor eletrônico multifrequência de 5,0-11,5 MHz.

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); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E e E' (E/E').

As estruturas cardíacas foram medidas em três a cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) foi medido no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento de máxima excursão sistólica da parede posterior da cavidade. A função sistólica do VE foi avaliada

calculando-se a porcentagem de encurtamento sistólico ($DDVE-DSVE/DDVE$) x 100 e a fração de ejeção ($DDVE3-DSVE3/DDVE3$) e a velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. As medidas referentes aos fluxos foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, em cinco ciclos cardíacos consecutivos.

Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff

Após o estudo ecocardiográfico, 8 animais de cada grupo receberam tiopental sódico (50 mg/kg, IP) e heparina (1000 UI), por via intraperitoneal e ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir foi efetuada a esternotomia mediana, com ventilação assistida, e dissecada a aorta ascendente. A aorta foi cateterizada com cânula de metal número 15a e iniciada a perfusão retrógrada com solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mmol/l: 115 NaCl, 5,4 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgPO₄, 1,15 NaH₂PO₄, 1,2 Na₂SO₄, 25 NaHCO₃ e 11 glicose. Antes de sua utilização a solução foi filtrada com filtro de acetato de celulose com poro de 5 micrometros. A solução acima foi acrescida de insulina 10 UI/l e manitol, na concentração de 8 mmol, para assegurar maior preservação miocárdica.

Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sachs Elektronik-Germany), com pressão de perfusão constante de 75 mmHg. A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de CO₂, à temperatura de 37°C, pH entre 7,3 e 7,4. O átrio esquerdo foi aberto e o ápice do ventrículo esquerdo puncionado com agulha, para drenar a cavidade ventricular, evitando-se acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de látex, atado ao tubo de polietileno PE 90, foi colocado na cavidade ventricular. A outra extremidade do tubo de polietileno foi conectada a uma torneira de 3 vias, sendo uma das vias acoplada a um transdutor de pressão (Stathan P23 XL) e a outra, a uma seringa de 1 ml, que permite a variação do volume do balão intracavitário. A musculatura atrial direita, compreendendo o nódulo sinoatrial foi extirpada e um eletrodo de marcapasso artificial colocado no miocárdio do ventrículo direito para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca de 250 bpm.

Por meio da preparação descrita, foram registradas a primeira derivada positiva de pressão ($+dP/dt$) e a derivada negativa de pressão ($-dP/dt$). Esses índices são, respectivamente, utilizados como parâmetros de função contrátil e relaxamento do ventrículo esquerdo.

Eutanásia e coleta de material biológico

Após o estudo ecocardiográfico, os animais foram anestesiados com dose excessiva de pentobarbital e foi coletado sangue, antes da retirada do

coração, fígado e pulmão. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos a 4°C, coletado o sobrenadante e armazenado a -80°C.

O coração foi dissecado, separando-se o ventrículo esquerdo (VE) do ventrículo direito (VD) e obtido o peso total do VE e VD, fígado e pulmão. Em seguida o VE foi seccionado a 4 mm da ponta em fragmento de 3 mm colocado em formol tamponado para confecção de lâminas histológicas. O material restante foi colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80°C.

Análise histológica

Após o estudo funcional, foi realizado o estudo morfométrico, segundo técnica já padronizada ^(17, 18). Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução de formol a 10% por período de 48 horas, segundo relato prévio ^(17, 18). Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes histológicos coronais de 4 micra. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição de áreas (ASM) e diâmetro (DSM) da seccional transversa dos miócitos, empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentaram forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localização na camada subendocárdica da parede muscular

do ventrículo esquerdo. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas e diâmetros seccionais médios obtidos para cada grupo foram utilizados como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 micra e corados pela técnica de Picro Sirius red, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. A leitura foi feita utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo, utilizando objetiva de 40X. O colágeno perivascular foi excluído desta análise.

Western Blot

Os corações não submetidos ao estudo do coração isolado foram posteriormente homogeneizados em tampão de extração RIPA (100 mM Tris-HCl pH 7.4; 100 mM pirofosfato de sódio; 100 mM fluoreto de sódio; 10 mM EDTA; 10 mM ortovanadato de sódio; 2 mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para as análises.

A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Bradford. Após quantificação das proteínas, a amostra juntamente com tampão de Laemmli (Tris – HCL 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol

40%, azul de bromofenol 0,02% e β - mercaptoetanol 200 mM), foi aquecida a 100°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer.

As proteínas foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed). A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução, foi determinada de acordo com o peso molecular de cada proteína analisada.

No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA), por 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Neste momento a membrana foi cortada de acordo com o peso molecular das proteínas de interesse do estudo para incubação do anticorpo primário diluído em solução de leite em pó desnatado a 3%, dissolvido em solução basal, sob agitação constante overnight.

Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução de leite desnatado a 1%, dissolvido em solução basal, por 1,5 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram analisadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA) nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

Após essa etapa, se o peso molecular da proteína em questão fosse o mesmo da proteína normalizadora (GAPDH), as membranas eram lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos para o GAPDH e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente.

Uma vez os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi feita da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pelo GAPDH correspondente; 2) foi feita a média (da relação obtida anteriormente) dos animais controles de cada gel; 3) a relação entre proteína/GAPDH então foi dividida pela média dos animais controles do gel correspondente, para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot. Para as proteínas fosforiladas foi realizado o mesmo procedimento e então feita a relação entre proteína fosforilada e proteína total.

a) Anticorpos primários utilizados

- NFκB p65, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-8008);
- pNFκB p65, rabbit policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-33020);
- Akt, rabbit polyclonal (Cell Signaling Technology, #9272);
- pAkt (Ser473), rabbit monoclonal (Cell Signaling Technology, #4060);
- S6k1, rabbit monoclonal (Abcam, ab32529);
- pS6k1, rabbit policlonal (Abcam, ab5231);
- ERK1, rabbit policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-93);
- JNK1/2, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-137019);
- PI3K p85, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-1637);
- pPI3K p85 (Tyr508), goat policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-12929);
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233);

b) Anticorpos secundários utilizados

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

- Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2020);

Determinação do metabolismo energético e estresse oxidativo

Amostras de tecido cardíaco, de aproximadamente 100mg, foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas a 10000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, hidroperóxido de lipídios, atividade das enzimas antioxidantes e enzimas metabolismo energético, por espectrofotometria. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial foi determinada após ressuspensão do pellet com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) e centrifugação (10000 rpm, 5 minutos, 40C), de acordo com técnica adaptada de Cassina e Radi ⁽³⁰⁾.

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

a) Metabolismo energético

- ***Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK)***

A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase,

trifosfato isomerase, ATP e frutose -6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂, segundo método descrito por Bass et al⁽³¹⁾.

- ***Determinação da atividade do complexo piruvato desidrogenase (PI-DH)***

A atividade da PI-DH foi determinada na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, MgCl₂, NBT (nitrobluetetrazóilico), piruvato de sódio e fenazina metassulfato, no qual se mediu a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD⁽³¹⁾.

- ***Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)***

A atividade da LDH foi determinada de acordo com metodologia proposta por Wilkinson⁽³²⁾ com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH₂, (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

- ***Determinação da atividade da citrato sintase***

A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB (dithiobis-2-nitrobenzoato) em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0⁽³¹⁾.

- **Determinação da atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH)**

A Atividade da β -OH-acil CoA-DH foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetyl-CoA e NADH ⁽³¹⁾.

- **Determinação da atividade ATP sintase**

A atividade da ATP sintase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0, na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase) ⁽³³⁾.

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

A atividade do complexo I foi determinada pelo método de Singer ⁽³⁴⁾ em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, no qual foi monitorada a velocidade de oxidação do NADH.

- **Determinação da atividade da succinato desidrogenase (complexo II)**

A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi medida pelo método descrito por Fischer et al. ⁽³⁵⁾ em meio com tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e DPIP (diclorofenolindofenol), o qual teve absorbância, a 600nm, diminuída.

b) Avaliação do estresse oxidativo

- **Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio**

O hidroperóxido de lipídio foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90% ⁽³⁶⁾.

- **Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GSH Px)**

A atividade da GSH Px foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathione reduzida, azida sódica, EDTA, glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada ⁽³⁷⁾.

- **Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH 2 e fenazina metassulfato ⁽³⁸⁾.

- **Determinação da atividade da catalase**

A atividade enzimática da catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%) ⁽³⁹⁾.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75% de acordo com a distribuição normal ou não normal. Para comparações entre os grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) complementada por testes recomendados. O teste de tendência (trend) foi utilizado para verificar os efeitos dose-dependente do AR.

Os pacotes estatísticos utilizados foram o SigmaPlot for Windows versão 12.0 (Systat Software, Inc) e GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc). Os gráficos foram elaborados no programa SigmaPlot for Windows versão 12.0 (Systat Software, Inc). O nível de significância estabelecido foi de 5%.

Resultados



6. Resultados

Peso dos animais e consumo de ração

Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso dos animais, grupo C: $424,0 \pm 21,2$ g; grupo AR1: $427,8 \pm 19,8$ g; grupo AR2: $420,8 \pm 25,3$ g; grupo AR3: $416,8 \pm 19,0$ g; $p:0,404$ e na ingestão de ração, grupo C: $23,6 \pm 0,9$ g; grupo AR1: $23,6 \pm 0,7$ g; grupo AR2: $23,3 \pm 1,3$ g e grupo AR3: $23,7 \pm 0,6$ g; $p:0,593$.

Estudo Ecocardiográfico

As variáveis obtidas pelo ecocardiograma estão apresentadas na Tabela 1, 2 e 3. Em relação às variáveis morfológicas, houve efeito dose-dependente para o diâmetro do átrio esquerdo, sendo menor no grupo AR3 e maior no grupo C (p Trend: 0,01) (Tabela 1) e houve tendência no teste trend para o IMVE ($p:0,07$). Quanto às variáveis funcionais, não encontramos em nosso estudo, diferenças entre os grupos.

Estudo Morfométrico

Os valores para peso do VE, peso do VE normalizado pelo peso corpóreo, peso do VD, peso do VD normalizado pelo peso corpóreo e peso do pulmão e fígado estão representados na Tabela 4. Encontramos tendência para o teste trend para peso do VE normalizado pelo peso corporal ($p: 0,07$)

Estudo do Coração Isolado

Em nosso trabalho encontramos tendência ($p: 0,065$) de piora da função sistólica no grupo AR2, representada pela variável PS (Tabela 5).

Estudo Histológico

A área e o diâmetro seccional dos miócitos foram diferentes entre os grupos suplementados quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). O ácido retinóico induziu hipertrofia miocárdica de forma dose dependente. A fração de colágeno intersticial não diferiu entre os grupos (Tabela 6).

Western Blot

Os dados referentes às proteínas analisadas por *western blot* estão representados na Tabela 7. A expressão da proteína JNK foi maior no grupo AR3 e AR2 quando comparados ao grupo C e AR1 ($p: 0,0240$). Não foram encontradas diferenças em relação às outras proteínas analisadas.

Metabolismo energético e estresse oxidativo

Os valores das enzimas referentes ao metabolismo energético e estresse oxidativo estão representadas na tabela 8 e 9, respectivamente.

Em relação ao metabolismo energético, as enzimas PDH, citrato sintase, β -OH acilCoA-DH, ATP sintase e o complexo II foram menores nos grupos suplementados, enquanto que as enzimas PKF e LDH foram maiores. Para o estresse oxidativo, as enzimas CAT e hidroperóxido de lipídeo foram maiores nos grupos suplementados e a GSH-Px e SOD foram menores nos grupos suplementados, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 1. Variáveis morfológicas avaliadas pelo ecocardiograma.

Variáveis	Grupo C (n=15)	Grupo AR1 (n=15)	Grupo AR2 (n=15)	Grupo AR3 (n=15)	p	pTrend
PC (g)	425 ± 11	423 ± 13	423 ± 13	422 ± 13	0,929	0,531
DDVE (mm)	7,12±0,51	7,51±0,63	7,33±0,76	7,46±0,67	0,422	0,312
DDVE/PC (mm/kg)	16,85±1,63	17,79±1,67	17,35±1,73	17,67±1,45	0,434	0,289
DSVE (mm)	3,35±0,63	3,56±0,64	3,47±0,54	3,57±0,48	0,432	0,291
AO (mm)	3,89±0,25	3,79±0,23	3,77±0,12	3,77±0,23	0,264	0,138
AE (mm)	5,68±0,67	5,36±0,45	5,24±0,47	5,18±0,46	0,099	0,01
AE/AO	1,55±0,12	1,46±0,12	1,46±0,13	1,43±0,17	0,335	0,09
AE/PC	13,11±1,58	12,56±0,95	12,36±0,79	12,21±1,03	0,157	0,03
IMVE (g/kg)	2,10±0,1	1,99±0,1	2,09±0,1	2,11±0,1	0,115	0,073

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração; PC: peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo.

Tabela 2. Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma.

Variáveis	Grupo C (n=15)	Grupo AR1 (n=15)	Grupo AR2 (n=15)	Grupo AR3 (n=15)	p	pTrend
FC (bpm)	297,97±45,41	287,76±60,44	283,83±33,72	292,84±44,01	0,856	0,722
%Enc.Endo	54,54±5,92	52,95±5,02	53,65±4,93	52,56±3,85	0,695	0,342
VEPP(mm/s)	41,19±10,22	42,14±10,83	41,46±12,10	42,73±10,82	0,990	0,883
FE	0,97±0,031	0,95±0,032	0,98±0,031	0,95±0,025	0,770	0,441
E mitral (cm/s)	739,57±53,72	797,54±96,21	773,24±67,96	769,18±81,57	0,240	0,467
A mitral (cm/s)	458,64±75,63	482,96±107,62	503,31±81,27	513,96±136,94	0,479	0,124
E/A	1,67±0,31	1,73±0,24	1,66±0,27	1,69±0,40	0,684	0,312
TDE (m/s)	51,10±6,23	53,71±10,86	55,17±8,02	52,58±7,84	0,579	0,537
TRIV(m/s)	29,77±6,34	29,35±5,32	27,31±4,87	28,89±4,92	0,634	0,460

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração; FC: frequência cardíaca; % Enc. Endo.: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo.

Tabela 3. Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma (Doppler tissular).

Variáveis	Grupo C (n=15)	Grupo AR1 (n=15)	Grupo AR2 (n=15)	Grupo AR3 (n=15)	p	pTrend
S septal (cm/s)	52,12±9,02	49,75±5,91	50,96±4,82	51,35±5,82	0,795	0,845
S lateral (cm/s)	52,93±6,84	51,81±6,93	53,14±7,86	54,3±5,61	0,790	0,473
E' septal (cm/s)	47,63±12,84	52,37±14,84	46,41±10,43	48,78±8,95	0,571	0,858
E' lateral (cm/s)	44,12±9,41	50,96±10,42	46,77±11,72	47,66±8,83	0,337	0,598
A' septal (cm/s)	48,74±15,52	48,97±17,01	44,45±15,12	50,12±15,54	0,775	0,985
A' lateral (cm/s)	38,63±14,32	33,66±8,72	38,36±10,10	38,55±14,32	0,629	0,749
E/E'média	16,71±3,38	15,76±2,12	17,51±3,23	16,21±2,02	0,957	0,968

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração; S septal: onda sistólica do anel mitral lateral; S lateral: onda sistólica do anel mitral lateral; E' septal: onda diastólica inicial do anel mitral septal; E' lateral: onda diastólica inicial do anel mitral lateral; A' septal: onda diastólica tardia do anel mitral septal; A' lateral: onda diastólica tardia do anel mitral lateral; E/E'média.

Tabela 4. Variáveis anatômicas.

Variáveis	Grupo C (n=12)	Grupo AR1 (n=14)	Grupo AR2 (n=13)	Grupo AR3 (n=13)	p	pTrend
VE(g)	0,82±0,06	0,83±0,06	0,82±0,06	0,87±0,05	0,172	0,090
VD (g)	0,21±0,03	0,22±0,04	0,20±0,03	0,22±0,02	0,331	0,599
PULMÃO (g)	1,87±0,34	1,87±0,41	1,82±0,29	1,73±0,15	0,671	0,259
FÍGADO (g)	12,71±1,76	12,8±2,04	13,16±2,13	13,61±2,25	0,691	0,253
VE/PC	1,98±0,08	1,95±0,13	1,98±0,13	2,07±0,15	0,115	0,070
VD/PC	0,50±0,07	0,51±0,08	0,48±0,07	0,52±0,05	0,481	0,654

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. VE: peso ventrículo esquerdo; VD: peso ventrículo direito; PC: peso corporal.

Tabela 5. Estudo do coração isolado (valores máximos).

Variável	Grupo C (n=7)	Grupo AR1 (n=7)	Grupo AR2 (n=6)	Grupo AR3 (n=7)	p	pTrend
+ dp/dt max (mmHg/s)	2910±543,5	2839±652,4	2541±595,1	2910±619,6	0,667	0,774
- dp/dt max (mmHg/s)	2428±509,5	2160±373,0	1875±379,2	2339±606,9	0,207	0,504
PS (mmHg)	133,6±15,3	125,0±13,3	110,0±15,4	130,7±18,9	0,065	0,392

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. +dP/dt e -dP/dt: primeira derivada e derivada negativa, respectivamente; PS: pressão sistólica.

Tabela 6. Variáveis do estudo histológico.

Variável	C (n=8)	AR1 (n=8)	AR2 (n=7)	AR3 (n=8)	p	pTrend
Área seccional dos miócitos (μm^2)*	137,66 \pm 3,27 ^a	151,93 \pm 5,38 ^{ab}	161,07 \pm 7,71 ^b	216,42 \pm 6,68 ^c	<0,001	< 0,0001
Diâmetro transversal do miócito (μm)*	9,14 \pm 0,38 ^a	10,29 \pm 0,11 ^a	10,26 \pm 0,36 ^a	15,05 \pm 0,43 ^b	<0,001	< 0,0001
% colágeno intersticial	5,2 \pm 0,4	4,8 \pm 0,3	5,0 \pm 0,4	5,0 \pm 0,6	0,254	0,425

Dados expressos em média \pm desvio padrão. * Anova de uma via complementado pelo teste de Holm-Sidak. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração.

Tabela 7. Proteínas por Western Blot.

Variável	C (n=13)	AR1 (n=12)	AR2 (n=12)	AR3 (n=12)	p	pTrend
pNkfb/Nfkb	1,06 (0,68-1,65)	0,73 (0,07-1,05)	0,77 (0,13-0,92)	0,86 (0,18-1,21)	0,223	0,518
pAkt/Akt	0,86 (0,53-1,46)	0,84 (0,49-1,33)	0,70 (0,53-0,98)	1,10 (0,79-1,38)	0,246	0,804
pS6k/S6k	1,14 (0,74-1,50)	0,86 (0,698-1,8)	0,97 (0,56-1,38)	0,68 (0,30-1,07)	0,255	0,081
ERK	0,92 (0,74-1,16)	1,09 (0,67-1,31)	0,73 (0,52-1,31)	1,15 (0,72-1,71)	0,449	0,270
pPI3K/PI3K	0,96 (0,68-1,36)	0,98 (0,56-1,70)	0,84 (0,77-1,16)	1,23 (0,41-1,81)	0,968	0,646
JNK*	1,00±0,50 ^a	0,99±0,49 ^a	1,29±0,54 ^{ab}	1,59±0,52 ^b	0,024	0,004

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. * Anova de uma via complementado pelo teste de Holm-Sidak. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração.

Tabela 8. Metabolismo Energético.

Variável	C (n=8)	AR1 (n=8)	AR2 (n=8)	AR3 (n=8)	p	pTrend
PKF-1* (nmoL/g)	107,94±17,23 ^a	116,54±8,52 ^a	136,69±22,44 ^{ab}	145,83±25,33 ^b	0,002	0,0002
PI-DH*(nmoL/g)	314,44±32,29 ^a	171,65±20,35 ^b	164,97±21,75 ^{bc}	160,37±26,56 ^{bcd}	<0,001	<0,0001
LDH (nmoL/mg)	167,48±16,46	161,87±24,24	178,22±23,64	191,03±23,62	0,066	0,0002
Citrato Sintase* (nmoL/mg)	27,7±3,84 ^a	30,35±3,28 ^a	23,71±2,51 ^{ab}	22,84±2,64 ^b	<0,001	0,0002
β-OH-acil CoA- DH(nmoL/mg)*	30,02±2,79 ^a	29,51±2,13 ^a	26,31±2,84 ^b	20,66±2,76 ^c	<0,001	<0,0001
ATP sintase(nmoL/mg)*	54,72±6,10 ^a	46,12±6,97 ^b	40,62±6,02 ^b	42,46±5,63 ^b	<0,001	0,0002
Complexo I (nmoL/mg)	5,99±0,71	6,27±1,02	5,88±0,50	5,61±0,67	0,373	0,2027
Complexo II (nmoL/mg)*	5,74±0,77 ^a	5,24±0,48 ^{ab}	5,21±0,36 ^{ab}	4,52±1,10 ^b	0,025	0,0039

Dados expressos em média ± desvio padrão. * Anova de uma via complementado pelo teste de Holm-Sidak C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. PKF-1: fosfofrutoquinase; PI-DH: piruvato desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase; β-OH-acil CoA-DH: β-hidroxiacil-CoA desidrogenase.

Tabela 9. Estresse oxidativo.

Variável	C (n=8)	AR1 (n=8)	AR2 (n=8)	AR3 (n=8)	p	pTrend
Hidroperóxido de Lipídeo (nmol/g)*	183,07±19,19 ^a	210,79±30,86 ^a	214,10±28,99 ^a	229,36±11,26 ^b	0,006	0,0008
GSH-Px (nmol/mg)*	45,00±4,88 ^a	33,52±4,53 ^b	32,92±5,75 ^{bc}	26,34±4,21 ^d	<0,001	<0,0001
SOD (nmol/mg)*	12,29±1,46 ^a	9,90±0,97 ^b	8,88±0,81 ^{bc}	9,81±1,19 ^{bcd}	<0,001	<0,0001
CAT (µmol/g)*	71,35±8,29 ^a	127,97±15,81 ^b	129,28±27,19 ^{bc}	125,18±15,45 ^{bcd}	<0,001	<0,0001

Dados expressos em média ± desvio padrão. * Anova de uma via complementado pelo teste de Holm-Sidak. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. GSH Px: glutathiona peroxidase; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase.

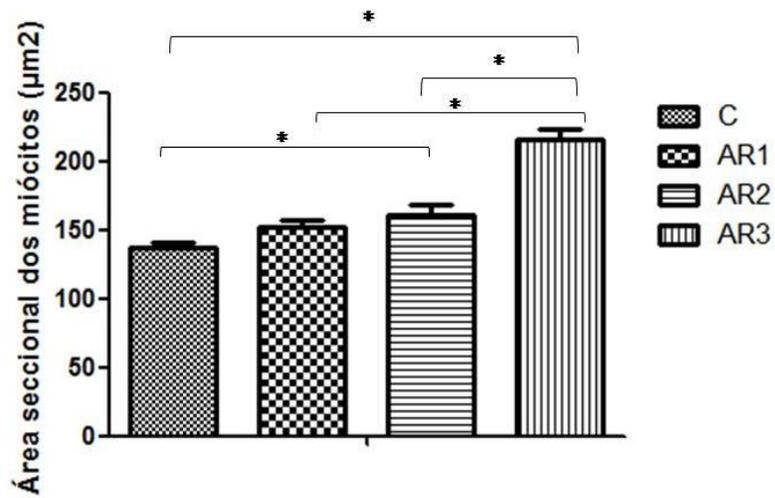


Figura 1. Área seccional dos miócitos. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

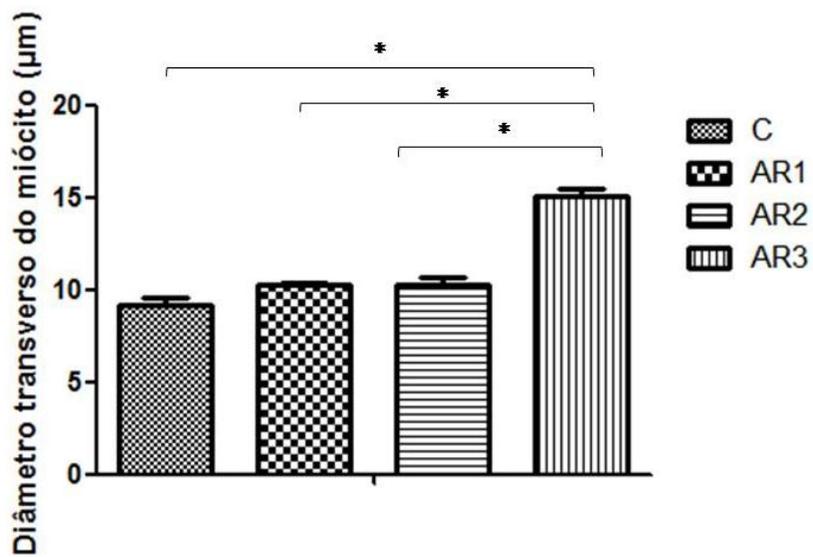


Figura 2. Diâmetro transverso dos miócitos. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

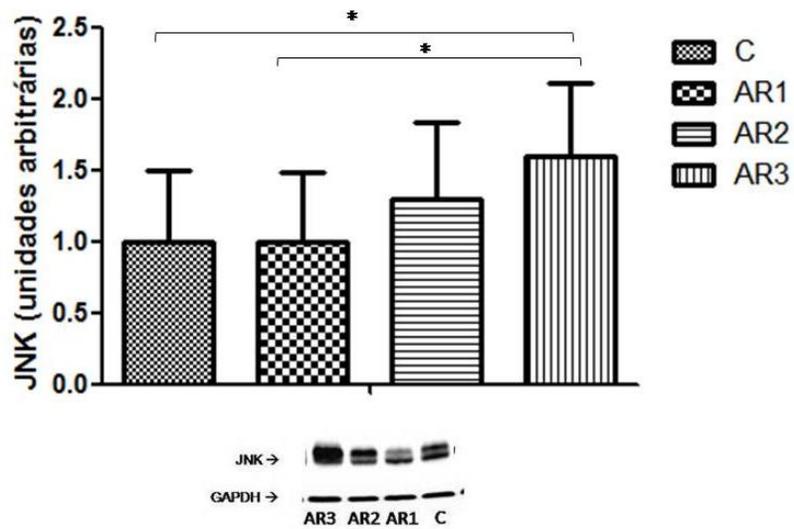


Figura 3. Expressão protéica da JNK. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

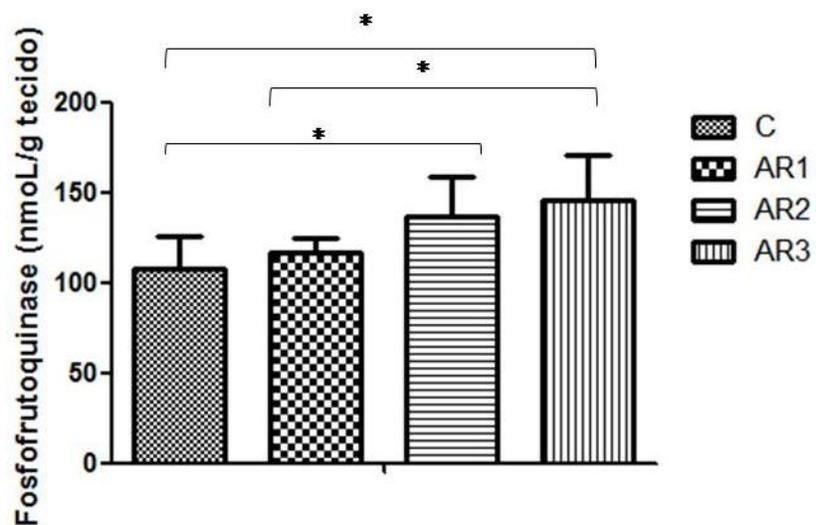


Figura 4. Fosfofrutoquinase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

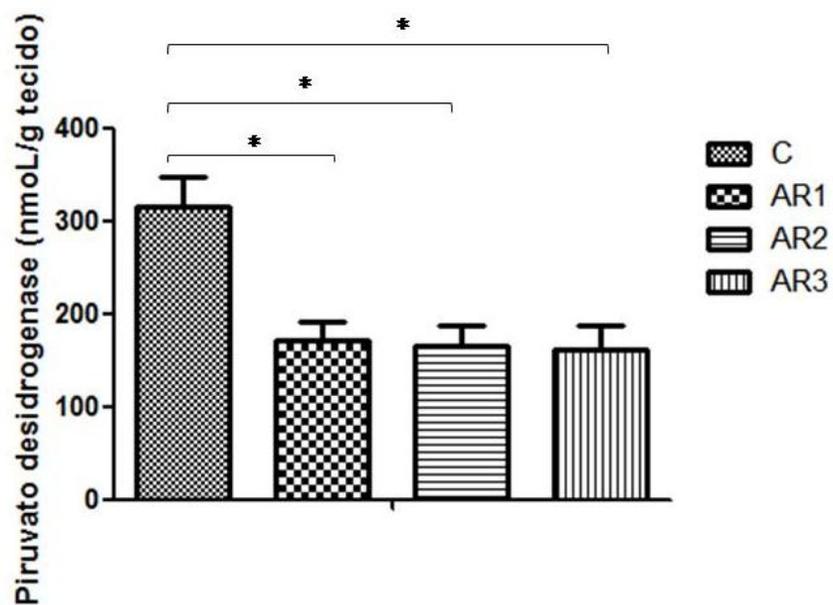


Figura 5. Piruvato desidrogenase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

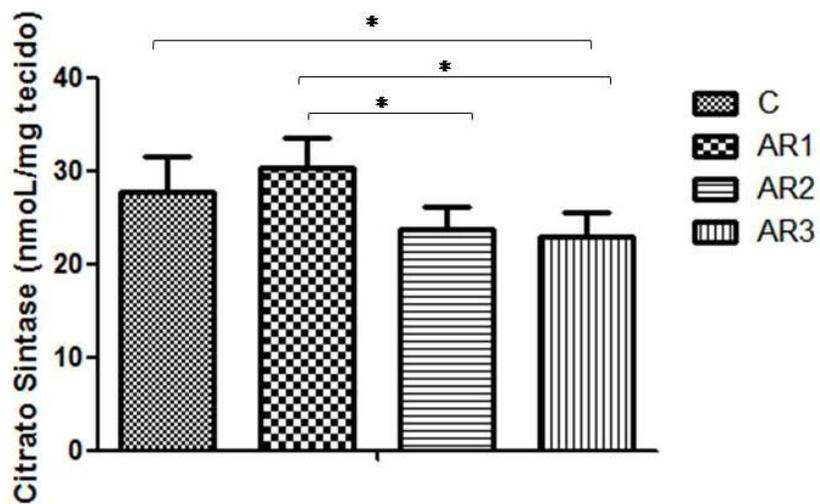


Figura 6. Citrato sintase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

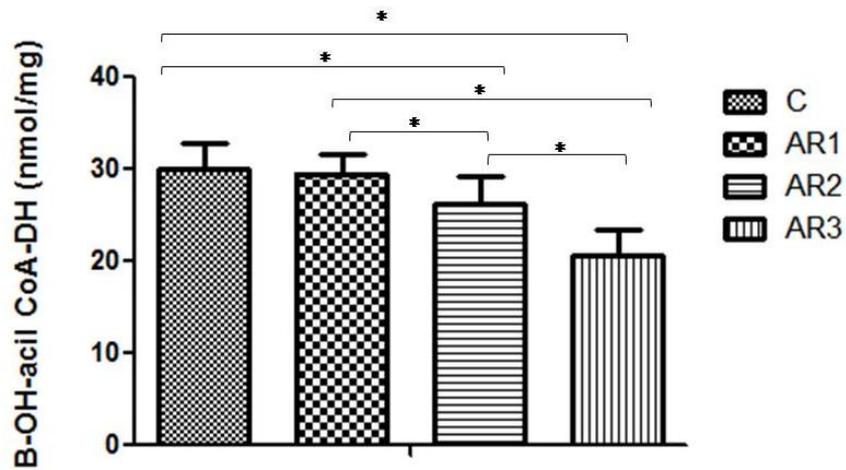


Figura 7. β -OH-acil CoA-DH. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

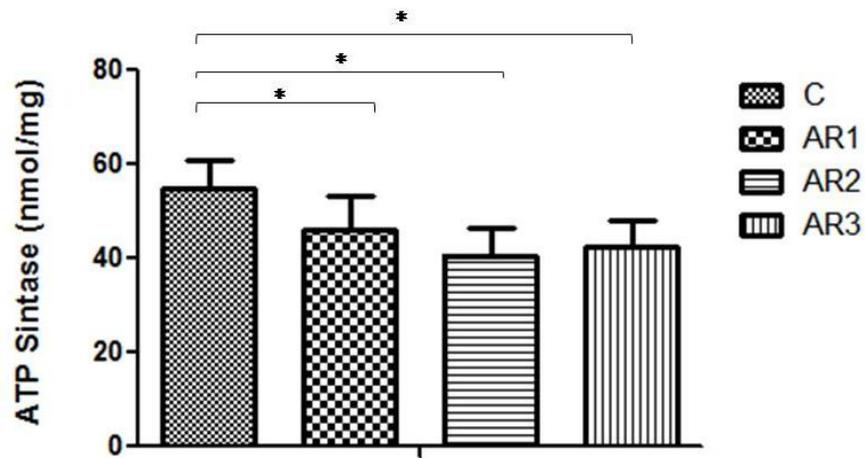


Figura 8. ATP sintase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

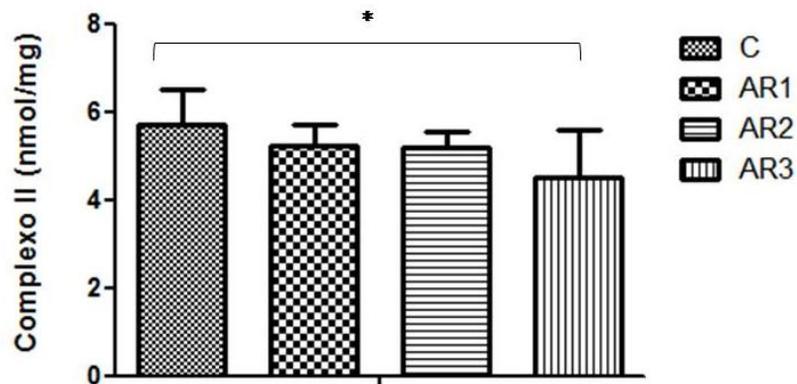


Figura 9. Complexo II. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

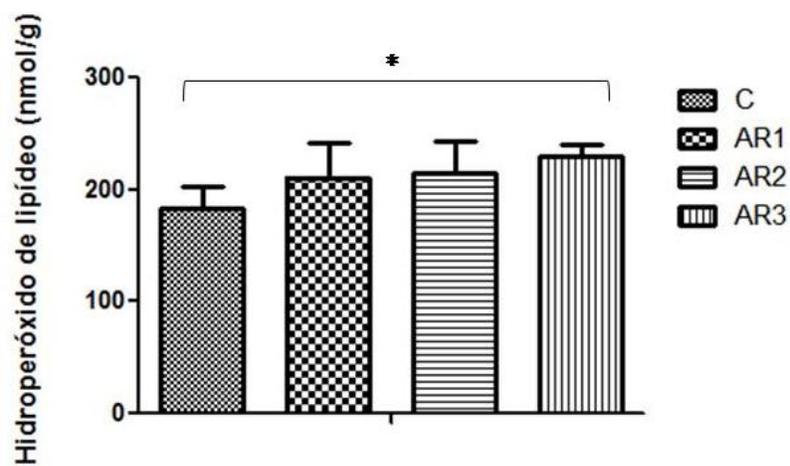


Figura 10. Hidroperóxido de lipídeo. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

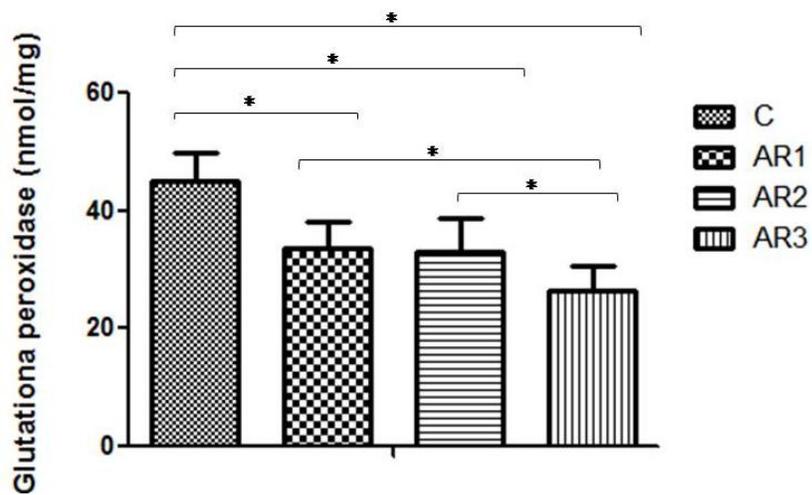


Figura 11. Glutathione peroxidase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

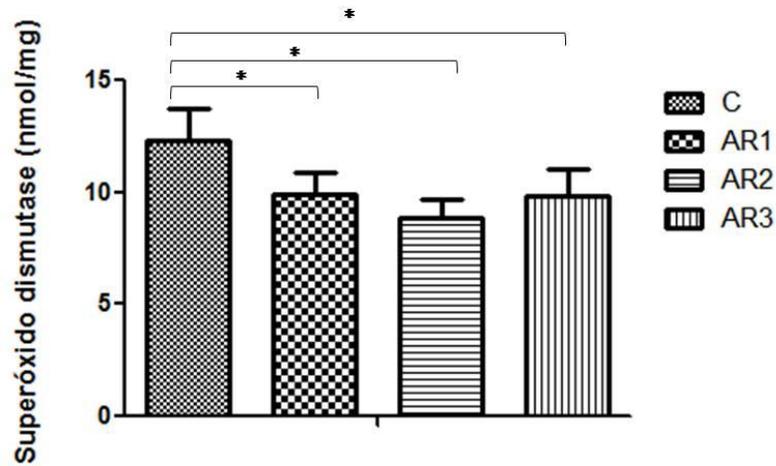


Figura 12. Superóxido dismutase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

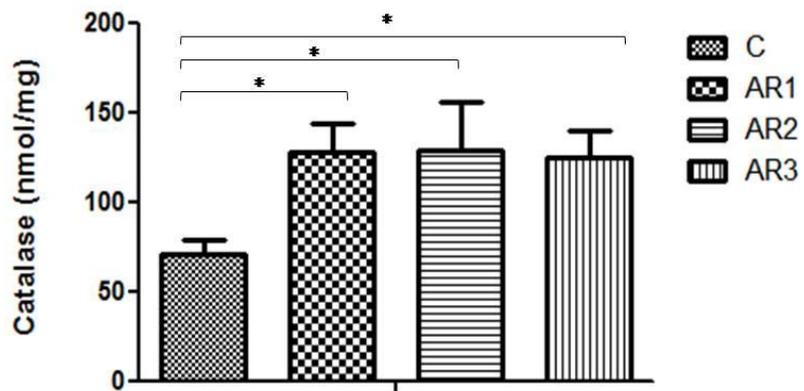


Figura 13. Catalase. C: controle; AR1: suplementados com 0,3mg de AR/kg de ração; AR2: suplementados com 5 mg de AR/kg de ração; AR3: suplementados com 10mg de AR/kg de ração. (*) Diferenças estatisticamente significantes.

Discussão



7. Discussão

Nosso estudo procurou avaliar se a remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico possui características adaptativas ou deletérias. Para isso, estudamos a participação das vias mTOR/PI3K, MAPKs e proteínas envolvidas no equilíbrio redox e metabolismo energético nas alterações cardíacas induzidas pela suplementação de ácido retinóico. Nossos resultados confirmaram a remodelação induzida pelo tratamento. Adicionalmente, esse fenômeno não teve a participação das vias mTOR/PI3K. Por outro lado, os efeitos cardíacos do ácido retinóico tiveram a participação das MAPKs, estresse oxidativo e alterações do metabolismo energético, característicos de remodelação cardíaca deletéria.

A vitamina A tem sido estudada por desempenhar papel essencial em vários processos fisiológicos, especialmente aqueles relacionados à diferenciação e crescimento celular. Estudos mostram que existe participação da vitamina A sobre processos fisiopatológicos cardíacos como a remodelação ⁽¹¹⁻¹³⁾. A diversidade de ação desta vitamina se deve em grande parte ao ácido retinóico, sendo considerado como hormônio de ação pleiotrópica ⁽⁴⁰⁾. Azevedo et al ⁽¹⁵⁾ provocaram deficiência de vitamina A em ratos jovens por meio da dieta AIN-93 modificada e encontraram disfunção diastólica e maiores cavidades esquerdas que animais controle. Nota-se que a dilatação ventricular desempenha grande papel no processo de remodelação cardíaca ^(1, 41, 42).

Os efeitos da vitamina A foram estudados, previamente, em diferentes modelos de agressão. Alguns estudos revelam a relação entre a ingestão de β caroteno e doenças cardiovasculares ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Zornoff et al. ⁽⁴⁶⁾ mostraram que a suplementação de β caroteno (500 mg/kg de dieta) por um período de 30 dias

em ratos expostos à fumaça de cigarro atenua o processo de remodelação cardíaca. Da mesma forma, a suplementação de AR no infarto parece ser benéfica. Paiva et al. ⁽¹⁷⁾ suplementaram ratos com infarto experimental na dose de 0,3 mg/kg de ração por um período de 180 dias. Após o período de observação, o AR atenuou o processo de remodelação, induzindo menores diâmetros do ventrículo esquerdo após a oclusão coronária. Da mesma forma, Oliveira et al. ⁽¹⁸⁾ suplementaram AR em ratos expostos à fumaça de cigarro na dose de 0,3 mg/kg de ração por 2 meses. O AR preveniu a remodelação cardíaca induzida pela fumaça do cigarro. Adicionalmente, estudos experimentais sugerem que o ácido retinóico suprime alterações morfológicas do coração e alterações na expressão de genes associados com hipertrofia cardíaca induzida por diferentes estímulos como, por exemplo, pela endotelina, angiotensina II e catecolaminas ⁽¹¹⁻¹³⁾. Portanto, o conjunto desses resultados sugere que em diferentes modelos patológicos, a suplementação com o AR desempenha papel benéfico.

Ate o momento, no entanto, os efeitos da suplementação de ácido retinóico em ratos normais permaneciam inconclusivos. Paiva et al. ⁽¹⁹⁾ administraram AR na dose de 0,3mg/kg de ração em ratos normais por um período de 90 dias. Após o período de observação, os autores constataram aumento na massa do VE, acompanhado por manutenção da função cardíaca, Freire et al. ⁽⁴⁷⁾ suplementaram ratos adultos em três diferentes doses de AR: 0,3, 10 e 50mg/kg de ração. Ratos suplementados com a maior dose tiveram aumento no átrio esquerdo, DDVE e IMVE, sendo os efeitos dose-dependente. No entanto, nos dois estudos, os resultados são compatíveis com duas

situações distintas: sobrecarga de volume em período inicial ou alterações fisiológicas como, por exemplo, o exercício físico leve/moderado.

Nesse sentido, a hipertrofia cardíaca fisiológica pode se desenvolver por meio de alguns estímulos como a atividade física regular, que gera sobrecarga de volume (ex. corrida, natação) ou sobrecarga de pressão (ex. treinamento de força). Morfológicamente, há aumento no volume dos cardiomiócitos, formação de novos sarcômeros, e não há fibrose intersticial e expressão de genes fetais, não estando relacionada com aumento de mortalidade ⁽⁴⁸⁾. De outra forma, a hipertrofia cardíaca patológica decorre de diversos estímulos como sobrecarga de pressão (ex. hipertensão) ou volume (ex. doença valvar) e outros. Sua característica morfológica se baseia no aumento no volume dos miócitos, formação de novos sarcômeros, fibrose intersticial, necrose e apoptose de miócitos. A função cardíaca geralmente está deprimida, expressando-se genes fetais e está associada com insuficiência cardíaca e aumento da mortalidade.

Aspecto importante a ser enfatizado refere-se ao fato de que algumas variáveis são comumente utilizadas para diferenciação entre alterações cardíacas fisiológicas ou patologias, entre as quais se destacam vias de sinalização celular, equilíbrio redox e característica do metabolismo energético.

Assim, o principal objetivo do nosso trabalho foi analisar o comportamento do complexo mTOR, por meio do estudo da AKT, NFκB e S6K, nos efeitos morfológicos e funcionais cardíacos de ratos suplementados com ácido retinóico.

Múltiplas vias que promovem crescimento celular convergem com a ativação da mTOR. O complexo mTOR é formado por dois complexos multiprotéicos distintos: mTORC1 e mTORC2. Em modelos de sobrecarga de

pressão^(20, 22, 49-59), mostrou-se que a ativação do complexo mTORC1 e do seu maior alvo, a S6K, é conhecida por promover a hipertrofia cardíaca, contribuindo para a remodelação patológica^(22, 50, 51, 60). Outros estudos têm mostrado que a mTORC2 media a fosforilação da Akt (s473)⁽⁶¹⁾ e regula o citoesqueleto de actina⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Portanto sugere-se que a mTORC1 promove tradução protéica em miócitos hipertrofiados e a mTORC2 parece ter papel protetor.

A Akt é uma molécula efetora bem caracterizada da mTORC2⁽⁶⁵⁾. Sugere-se que a ativação da via PI3K gera PIP3 na membrana plasmática, e subsequentemente recruta Akt⁽⁶⁶⁾. No coração, camundongos transgênicos com superexpressão da Akt apresentaram maior tamanho dos cardiomiócitos^(53, 67, 68) e demais estudos constataram a ativação da Akt em corações com hipertrofia fisiológica⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾. Outra possibilidade interessante é que a rapamicina promove ativação mTORC2, promovendo assim o crescimento e a proteção do miocárdio com hipertrofia fisiológica, por meio da Akt⁽⁷²⁾.

O complexo mTORC2 também é responsável pela ativação do NFκB. Foi estabelecido que o NFκB é necessário para o crescimento hipertrófico em ratos, no qual, inibindo-o por expressão cardíaca de um mutante não fosforilável do seu inibidor IκB, tem-se a hipertrofia atenuada⁽⁷³⁾. Inibindo mTORC1 com rapamicina, atenua-se parcialmente o crescimento hipertrófico, mas não afeta a atividade de NFκB, indicando o papel de mTORC2 na mediação da localização nuclear e ativação do NFκB. Embora a perda de atividade do NFκB resulte numa queda parcial de crescimento hipertrófico, a inibição de ambos: mTORC1 e NFκB resulta em perda máxima de hipertrofia cardíaca⁽⁷⁴⁾.

Além da via mTOR, a hipertrofia cardíaca pode estar associada com a ativação de outros fatores, incluindo os membros das MAPKs ^(75, 76). MAPKs são serinas/treoninas-kinases que podem ser divididas em três grandes famílias: as kinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), as kinases c-Jun N-terminais (JNK) e p38. Um grande número de estudos in vitro e in vivo identificaram um papel importante da rede de sinalização das MAPKs na hipertrofia de cardiomiócitos ^(77, 78) ⁽¹⁹⁻²⁴⁾

Em estudo realizado com hipertrofia cardíaca induzida pela angiotensina II (ang II), a suplementação de ácido retinóico por 24h mostrou efeitos inibitórios sobre a ativação das MAPKs e sobre a hipertrofia em cardiomiócitos. A estimulação com ang II induziu um aumento significativo do tamanho das células, o que foi inibido pelo ácido retinóico, que também inibiu a ativação da MAPKs que são importantes mediadores na hipertrofia cardíaca. Encontrou-se também que a ang II provoca fosforilação da ERK1/2e JNK1/2, e que isso pode ser inibido pelo ácido retinóico .

O principal resultado de nosso estudo foi que as proteínas da via mTOR não foram alteradas pelo nosso tratamento. Assim, pode-se sugerir que o complexo mTOR não participa do processo de remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico. Por outro lado, a não participação da via PI3K/Akt, associada com ativação da via JNK no grupo suplementado com a maior dose, sugere que a remodelação induzida pelo ácido retinóico apresenta características observadas em casos de hipertrofia cardíaca patológica ^(27, 28).

Outro resultado relevante se refere às proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco.

Em corações normais, os ácidos graxos por meio da β oxidação correspondem de 60 a 90% do substrato energético do músculo cardíaco, sendo a menor parte da energia proveniente da metabolização da glicose pela via glicolítica. No entanto, em situações de injúria, essa prevalência usualmente pode se inverter ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾, conjuntamente com outras alterações da homeostase energética.

Os ácidos graxos sofrem processo de β oxidação até a formação de acetil coenzima A que entrará no ciclo do citrato. Os carboidratos, pelo processo da glicólise, formam lactato, piruvato e depois acetil coenzima A para o ciclo do citrato. O ciclo do citrato resulta na formação de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) que entram em cadeia de transporte de elétrons gerando gradiente eletroquímico ao longo da membrana mitocondrial, permitindo a síntese de ATP. Este processo é denominado fosforilação oxidativa ⁽⁸²⁾.

Em processos patológicos, existe diminuição na utilização de ácidos graxos, com aumento na utilização da via glicolítica. Além da alteração no substrato energético, aceita-se que a citrato sintase, enzima inicial do ciclo do ácido cítrico, pode estar diminuída na insuficiência cardíaca por incapacidade da mitocôndria em transportar elétrons e realizar a fosforilação oxidativa. Adicionalmente, a fosfofrutoquinase é uma enzima extremamente importante na modulação do metabolismo energético. Ela é a responsável por catalisar a reação de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato, a terceira reação da via glicolítica. Finalmente, processos patológicos podem induzir diminuição da ATP sintase, com consequente diminuição na síntese de ATP ⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. Em nossos resultados, a suplementação com ácido retinóico foi associada com diminuição

das enzimas do metabolismo de ácidos graxos, associada com aumento de enzimas envolvidas na utilização de glicose. Adicionalmente, encontramos redução da citrato sintase e da ATP sintase nos animais que receberam a suplementação de ácido retinóico, o que indica redução na utilização do substrato energético. Portanto, as alterações no metabolismo energético encontradas com o tratamento são características de situações de remodelação deletéria.

Finalmente, o estresse oxidativo pode agir tanto na membrana celular causando a lipoperoxidação como no núcleo celular interferindo na síntese de DNA e RNA. Consequentemente atua como indutor dos danos celulares que alteram variáveis funcionais e estruturais cardíacas. Por essa razão, o estresse oxidativo é um dos principais moduladores do processo de remodelação cardíaca, pois pode atuar na síntese de colágeno, proliferação de fibroblastos, ativação das metaloproteases, apoptose, hipertrofia dos miócitos e expressão de genes do período fetal ^(83, 84).

Em situações normais, as células possuem sistemas antioxidantes para conter a acumulação de ERs. Fazem parte desses complexos, enzimas como catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, além de antioxidantes não enzimáticos como a vitamina E, vitamina C, beta caroteno e ácido úrico. A SOD converte o radical superóxido à peróxido de hidrogênio, e este, posteriormente é convertido em água pela catalase e glutathiona peroxidase ^(83, 84).

Em nosso estudo, os animais suplementados com ácido retinóico apresentaram alterações nos valores das enzimas antioxidantes. No entanto, podemos inferir que o tratamento induziu estresse oxidativo, pois os valores de

hidroperóxido de lipídeo foram aumentados nos animais suplementados, de modo dose dependente. Portanto, a remodelação cardíaca induzida pela suplementação de ácido retinóico foi acompanhada por estresse oxidativo, sugerindo adaptação deletéria.

Conclusão



8. Conclusão

Em ratos normais, o ácido retinóico induziu resposta hipertrófica cardíaca.

A via mTOR não participa do processo de remodelação cardíaca induzida pelo ácido retinóico.

A não participação da via da PI3k/Akt, associada à participação da JNK, estresse oxidativo e alterações do metabolismo energético, sugere que a remodelação cardíaca induzida pela suplementação de ácido retinóico é patológica.

Referências



Referências

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
2. 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.
3. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-72.
4. Cicogna AC, Okoshi MP, K KO. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000;1:8-16.
5. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med* 2001;110:37S-46S.
6. Gaudron P, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C, Ertl G. Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:33-40.
7. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215-62.
8. Zornoff LAMZ, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol* 1997;68:453-60.
9. Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of

RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*. 1994;78:987-1003.

10. Kastner P, Messaddeq N, M MM, Wendling O, Grondona JM, Ward S, et al. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development*. 1997;124:4749-58.

11. Wang HJ, Zhu YC, T TY. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy
J Appl Physiol 2002;92:2162-8.

12. Wu JM, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25 (OH)(2) vitamin D-3 and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1996;97:1577-88.

13. Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial-cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;73:91-5.

14. Subbarayan V, Mark M, Messadeq N, Rustin P, Chambon P, Kastner P. RXR alpha overexpression in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy but fails to rescue myocardial hypoplasia in RXR α -null fetuses. *J Clin Invest*. 2000;105:387-94.

15. Azevedo PS, Minicucci MF, Minicucci FC, Justulin LA, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by tissue vitamin A deficiency in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26:395-402.

16. Dyson E, Sucov HM, Kubalak SW, Schmid-Schönbein GW, DeLano FA, Evans RM, et al. Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular

failure in retinoid X receptor alpha $-/-$ mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7386-90.

17. Paiva SAR, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, et al. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr* 2005;135:2326-8.

18. Oliveira LC, Azevedo PS, Minicucci MF, Rafacho BP, Duarte DR, Matsubara LS, et al. Retinoic acid prevents ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Acta Cardiol*. 2011;66:3-7.

19. 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 Heart Circ Physiol*. 2003;284:H2242-6.

20. McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, T TS, et al. Inhibition of mtor signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. 2004;109:3050-5.

21. Shende P, Plaisance I, Morandi C, Pellieux C, Berthonneche C, Zorzato F, et al. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation*. 2011;123:1073-82.

22. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2003;107:1664-70.

23. Balasubramanian S, Johnston RK, Moschella PC, Mani SK, Tuxworth WJ, Kuppuswamy D. mTOR in growth and protection of hypertrophying myocardium. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2009;7:52-63.

24. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103:211-25.
25. Gutkind JS. Cell growth control by G protein-coupled receptors: From signal transduction to signal integration. *Oncogene*. 1998;17:1331-42.
26. Dorn GW. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2007;49:962-70.
27. Barry S, Davidson S, Townsend P. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell*. 2008;40:2023–39.
28. Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev*. 2010;90:1507–46.
29. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440-63.
30. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem and Biophysics*. 1996;328:309-16.
31. Bass A, Brdicka P, Eyer P, Hoefler S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem*. 1969;10:198-206.
32. Wilkinson JH. *Introducción al diagnóstico enzimático*. Buenos Aires: Ediciones Toray; 1965.

33. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333:145-51.
34. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and alphaslycerophosphate dehydrogenase. *Methods of Biochemical Analysis*. 1984;32(123-175).
35. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta*. 1985;153:23-36.
36. Jiang ZY, Woolard A, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidative of Fe³ in the presence of xylenol orange. *Lipids*. 1991;26:853-6.
37. Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 1974;358:251-61.
38. Ewing JF, Janero D. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Annal Chem*. 1995;232:243-8.
39. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. ed n, editor. New York: Verlag chemie Weinheim; 1974.
40. Pan J, Baker KM. Retinoic Acid and the heart. *Vitam Horm*. 2007;75:257-83.
41. Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:150-64.
42. Mein JE, Dolnikowski GG, Ernst H, Russell RM, Wang X-D. Enzymatic formation of apo-carotenoids from the xanthophyll carotenoids lutein,

zeaxanthin and beta-cryptoxanthin by ferret carotene-9',10'-monooxygenase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2011;506:109-21.

43. Gey KF, Moser UK, Jordan P, Stahelin HB, Eichholzer M, Ludin E. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: An epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. Am J Clin Nutr. 1993;57:787S–97S.

44. Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. Am J Epidemiol. 1994;139:1180–9.

45. Morris DL, Kritchevsky SB, Davis CE. Serum carotenoids and coronary heart disease. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial and Follow-up Study. J Am Med Assoc. 1994;272:1439–41.

46. Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Pais-Silva MD, et al. Beta-Carotene Supplementation Attenuates Cardiac Remodeling Induced by One-Month Tobacco-Smoke Exposure in Rats. Toxicol Sci. 2006;90:259-66.

47. Freire CMM, Azevedo PS, Minicucci MF, Oliveira-Júnior SA, Martinez PF, Novo R, et al. Influence of different doses of retinoic acid on cardiac remodeling. Nutrition. 2011;27:824-8.

48. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007;34:255-62.

49. Wang L, Gout I, Proud CG. Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. J Biol Chem. 2001;276:32670.

50. Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, Willey CD, Sundaravadivel B, Xu L, et al. c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J Biol Chem.* 2002;277:23065.
51. Laser M, Kasi VS, Hamawaki M, Cooper G, Kerr CM, Kuppuswamy D. Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *J Biol Chem.* 1988;273:24610.
52. Balasubramanian S, Kuppuswamy D. RGD-containing peptides activate S6K1 through beta3 integrin in adult cardiac muscle cells. *J Biol Chem.* 2003;278:42214.
53. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2799.
54. Sadoshima J, Izumo S. Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1995;77:1040.
55. Simm A, Schluter K, Diez C, Piper HM, Hoppe J. Activation of p70(S6) kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;30:2059.
56. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2004;64:403.
57. Moschella PC, Rao VU, McDermott PJ, Kuppuswamy D. Regulation of mTOR and S6K1 activation by the nPKC isoforms, PKCepsilon and PKCdelta, in adult cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:754.

58. Tuxworth WJ, Shiraishi H, Moschella PC, Yamane K, McDermott PJ, Kuppuswamy D. Translational activation of 5'-TOP mRNA in pressure overload myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2008;103:41.
59. Park IH, Erbay E, Nuzzi P, Chen J. Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase activity and S6K1. *Exp Cell Res*. 2005;309:211.
60. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest*. 2000;106:R25.
61. Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 2006;25:634.
62. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14:1296.
63. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307:1098.
64. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004;309:211.
65. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:729.
66. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphatedependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998;279:710.

67. Matsui T, Tao J, Monte Fd, Lee KH, Li L, Picard M, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation*. 2001;104:330.
68. Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, et al. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12333.
69. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006;113:2097.
70. Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev*. 2006;20:3347.
71. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2008;214:316.
72. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22:159.
73. Li Y, Ha T, Gao X, Kelley J, Williams DL, Browder IW, et al. NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol Rev*. 2004;287:H1712.
74. Ha T, Y Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:1570.
75. Clerk A, Pham FH, Fuller SJ, Sahai E, Aktories K, Marais R, et al. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Cardiac Myocytes through the Small G Protein Rac1. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1173–84.

76. Aikawa R, Komuro I, Nagai R, Yazaki Y. Rho plays an important role in angiotensin II-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem.* 2000;212:177–82.
77. Minamino T, Yujiri T, Terada N, Taffet GE, Michael LH, Johnson GL, et al. MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;19:3866-71.
78. Bueno OF, Windt LJD, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 2000;19:6341-50.
79. Bielsen MV, Nieuwenhoven FAv, Vusse GJvd. Metabolic remodeling of the heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res.* 2009;81:420-8.
80. Abel D, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy
Cardiovasc Res. 2011;90:234-42.
81. Lionetti V, Stanley WC, Recchia FA. Modulating fatty acid oxidation in heart failure *Cardiovasc Res.* 2011;90:202-9.
82. Stanley WC, Recchia FA, Iopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005;85:1093-129.
83. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Moll Cell Cardiol.* 2002;34:379-88.
84. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hipertension.* 2007;49:241-8.