# Isabel Barbara Lopes dos Santos Figueira

Efeitos da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas no remodelamento cardíaco, em ratos infartados

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Carmen Guilherme Christiano

de Matos Vinagre

São Paulo

2016

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Figueira, Isabel Barbara Lopes dos Santos

Efeitos da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas no remodelamento cardíaco, em ratos infartados / Isabel Barbara Lopes dos Santos Figueira. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cardiologia.

Orientadora: Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre.

Descritores: 1.Vitamina E 2.Infarto do miocárdio 3.Remodelação ventricular 4.Fibrose 5.Ecocardiografia 6.Ratos Wistar 7.Hipertrofia

USP/FM/DBD-024/16

# Dedicatória

Ao meu amado esposo Rodrigo, amigo, companheiro e meu porto seguro, que sempre me deu apoio e coragem para seguir em frente. A sua doação incondicional ao nosso relacionamento, dedico todo meu amor.

Aos meus amados pais Isabel e José Luis (in memorian), exemplos de dignidade e de vida. Agradeço por orientarem meu caminho e me fazerem chegar até aqui. Essa vitória é de vocês!

# Agradecimentos

A Deus por iluminar, guiar e abençoar cada instante de minha vida e pelas oportunidades proporcionadas nessa minha passagem.

Aos meus familiares, que caminharam comigo nessa longa e dura jornada, que me auxiliaram quando foi preciso e me deram apoio incondicional. Amo vocês.

A minha orientadora e amiga Prof. Dra. Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre, por acreditar, incentivar e sempre estar ao meu lado. Minha eterna gratidão e admiração.

Ao amigo, americano, William Andrew Presada, pelas aulas de inglês e revisão do abstract e artigo referente a tese. Obrigada por todo o suporte.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, por me acolher em seu laboratório.

A Prof<sup>a</sup> Dra Maria Cláudia Irigoyen, pela colaboração, atenção e dedicação e aos seus funcionários e alunos, em especial Leandro, Alexandre e Fernando pela grande ajuda, sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigada.

Ao Doutor Paulo Magno pela realização do estudo ecocardiográfico, pela sabedoria compartilhada, pela humildade e pelo exemplo de ser humano. Obrigada.

A Dra Marcia Kiyomi Koike, pela grande ajuda nas análises e interpretação dos dados. Sua participação foi fundamental, seus conhecimentos são admiráveis e sua didática, perfeita. Você fez a diferença.

Ao pessoal do laboratório de Lípides, Alekssandra, Débora, Ana Elisa, Sheila, Andréia, Bruna, Maria Augusta, Tauãne, Oscar e Dalila, pela disposição em sempre ajudar, e em especial a Fátima, pela amizade, carinho e ajuda na condução desse trabalho.

Ao laboratótio de Miocardiopatia sob supervisão do Prof. Dr. Félix José Alvarez Ramires, pela disponibilidade de seu laboratório para realização deste trabalho e aos colegas Fernanda, Keila e Orlando pelo auxílio na realização das análises.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro deste projeto, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo, que possibilitaram a execução dessa tese.

Ao pessoal da pós-graduação, em especial à Neusa e à Juliana por todo o auxílio e dedicação durante esse doutoramento.

Todos esses que aí estão

Atravancando meu caminho,

Eles passarão...

Eu passarinho!

Mario Quintana

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

# Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

AD Área diastólica

AE VE Área externa do ventrículo esquerdo

Al VE Área interna do ventrículo esquerdo

Anova Análise de variância

AOV Tempo de ejeção da aorta

Apo B Apolipoproteína B

Cappesq- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do

HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade

de São Paulo.

cavVE Cavidade ventricular esquerda

cm Centímetro

Dd Diâmetro diastólico

DESAC E Desaceleração da onda E

DM Diâmetro do miócito

Ds Diâmetro sistólico

ERP Espessura relativa da parede

ESId Espessura do septo interventricular na diástole

FC Frequência cardíaca

FE Fração de encurtamento

FVA Fração de variação da área

FVC NSE Fração de volume de colágeno não subendocárdica

FVC SE Fração de volume de colágeno subendocárdica

g Gramas

GMO Guanosina monofosfato

H<sup>3</sup> Trício

HE Hematoxilina Eosina

Hg Hemoglobina

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

Ht Hematócrito

IBR Índice de bradicardia reflexa

IDM Índice de desempenho miocárdico

IEVE Índice de expansão do ventrículo esquerdo

IM Infarto do miocárdio

Incor Instituto do Coração

ITR Índice de taquicardia reflexa

KCI Cloreto de potássio

kg Kilograma

LDL Lipoproteína de baixa densidade

Linfarto Espessura da parede com infarto

LP(a) Lipoproteína (a)

Lsepto Espessura do septo

μL Microlitro

μm Micrometro

mg Miligrama

mL Mililitro

mm Milímetro

mm<sup>2</sup> Milímetro quadrado

mmHg Milímetro de mercúrio

MVE Massa ventricular esquerda

nm Nanômetro

PA Pressão arterial

PAD Pressão arterial diastólica

PAM Pressão arterial média

PAS Pressão arterial sistólica

PE IAM Perímetro externo do infarto agudo do miocárdio

PI IAM Perímetro interno do infarto agudo do miocárdio

PPd Parede posterior na diástole

Resp Brad Resposta bradicárdica

Resp Taq Resposta taquicárdica

Sal Salina

TA Tamanho do átrio

TEP Taxa de estresse da parede

TFM Tempo de fechamento mitral

TI Tamanho do infarto

Total VE Área total do ventrículo esquerdo

TRIV Tempo de relaxamento isovolumétrico

VCM Volume corpuscular médio

Ve Vitamina E

VEPP Velocidade de encurtamento da parede posterior

Colab. Colaborador(es)

Dr(a) Doutor(a)

Ed. Edição

et al E outros

Prof Professor

rev Revista

v Volume

p Página

# Lista de gráficos e figuras

Figura 1 - Esquematização do protocolo experimental
Figura 2 - Pericardiotomia para visualização da artéria coronária 14
Figura 3 - Localização do infarto (seta)
Figura 4 - Miócito com disposição longitudinal, núcleo ovalado e centralizado.23
Figura 5 - Corte transversal médio do coração, na região equatorial, corado
com Picrosirius Red (setas indicando o colágeno intersticial, em vermelho) 23
Figura 6 - Fibrose não Subendocárdica (setas)
Figura 7 - Fibrose Subendocárdica (setas)
Figura 8 - Medida de tamanho do infarto: PE IAM (perímetro externo do infarto),
PI IAM (perímetro interno do infarto), AE VE (área externa do ventrículo
esquerdo), Al VE (área interna do ventrículo esquerdo)
Figura 9 - Fórmula para cálculo da área de infarto25
Figura 10 - Percentual de captação da nanopartícula lipídica marcada com H3
do coração de ratos controle e infartados
Figura 11 - Percentual de captação da nanopartícula lipídica marcada com H3
por órgão de ratos controle e infartados29
Figura 12 - Correlação das variáveis fração de encurtamento (FE%) e diâmetro
sistólico (Ds), entre os grupos controle, infarto salina e infarto vitamina E 33
Figura 13 - Tamanho do infarto pré e pós tratamento, obtido por
ecocardiograma34

# Lista de tabelas

Tabela 1 - Peso corporal e Peso relativo do coração	27
Tabela 2 - Avaliação morfológica obtida por ecocardiografia	31
Tabela 3 - Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo	31
Tabela 4 - Avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo	32
Tabela 5 - Dados morfométricos dos grupos controle, infarto salina e infarto	
vitamina E	35
Tabela 6 - Parâmetros hemodinâmicos	35
Tabela 7 - Perfil hematológico dos grupos controle, infarto salina e infarto	
vitamina E	36

# Resumo

Figueira IBLS. Efeitos da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas no remodelamento cardíaco, em ratos infartados [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Do ponto de vista clínico, o remodelamento ventricular está associado a um pior prognóstico. Pacientes com remodelamento já diagnosticado, ou com alto risco de desenvolvê-lo, devem ser tratados de forma intensiva, a fim de prevenir, atenuar ou mesmo reverter esse processo. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas no remodelamento cardíaco, em ratos. Medidas ecocardiográficas foram determinadas 24 horas pós infarto e seis semanas após tratamento. Cortes teciduais do coração foram submetidos a coloração com Hematoxilina eosina e Picrosirius red. Duas regiões distintas do ventrículo esquerdo remotas ao infarto foram examinadas: subendocárdica e não subendocárdica. A extensão do infarto, o diâmetro dos miócitos, a fração de variação da área e o índice de expansão do ventrículo esquerdo foram determinados. No ecocardiograma observamos que os grupos infartados apresentaram um aumento no diâmetro diastólico e sistólico, uma diminuição da fração de encurtamento e da fração de variação da área quando comparados ao grupo controle. Na análise morfométrica, foi observado que nos animais infartados houve um aumento do diâmetro dos miócitos, da expansão do ventrículo esquerdo e da fração de volume do colágeno, principalmente na região subendocárdica, quando comparado ao grupo controle. A vitamina E associada a nanopartículas lipídicas, não apresentou efeitos protetores e nem atenuantes no remodelamento cardíaco nesse modelo experimental.

Descritores: Vitamina E; Infarto do miocárdio; Remodelação ventricular; Fibrose; ecocardiografia; Ratos wistar; Hipertrofia.

# **Abstract**

Figueira IBLS. Effects of vitamin E associated to lipid nanoparticles in the cardiac remodeling, in infarcted rats [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

From a clinical point of view, the ventricular remodeling is associated with a worse prognosis. Patients already diagnosed remodeling or at high risk of developing it, should be treated intensively to prevent, attenuate or even reverse this process. The aim of this study was to investigate the effects of vitamin E associated with lipid nanoparticles on cardiac remodeling in rats. Echocardiographic measurements were determined 24 hours post infarction and six weeks after treatment. Heart tissue sections were stained with Hematoxylin eosin and Picrosirius red. Two distinct regions of the left ventricle, remote to infarction, were examined: subendocardial and not subendocardial. The extent of the infarction, the diameter myocytes, collagen volume fraction and expansion index of the left ventricle were determined. On echocardiogram we observed that infarcted groups showed an increase in diastolic and systolic diameter and decreased in fractional shortening and the area variation fraction when compared to the control group. In the morphometric analysis, was observed that in infarcted animals there was an increase in the diameter myocytes, the expansion of the left ventricle and collagen volume fraction, especially in the subendocardial region, when compared to the control group. Vitamin E associated to lipid nanoparticles, showed no protective nor attenuated effects on cardiac remodeling in this experimental model.

Descriptors: Vitamin E; Myocardial infarction; Ventricular remodeling; Fibrosis; Echocardiography; Wistar rats; Hypertrophy.

# Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de gráficos e figuras

Lista de tabelas

# Resumo

## Abstract

_	wsiiac		
1	Intr	odução	1
	1.1	Remodelamento Cardíaco	1
	1.2	Infarto do Miocárdio	2
	1.3	A nanopartícula lipídica artificial e o transporte direcionado de drog	jas 4
	1.4	Vitamina E	5
2	Ob	jetivo	9
	2.1	Objetivos Específicos	9
3	Ма	terial e Métodos	10
	3.1	Modelo Experimental	10
	3.2 Vitam	Preparo da nanopartícula lipídica artificial e incorporação da nina E	_ 11
	3.3 lipídio	Avaliação da taxa de incorporação da vitamina E à nanopartícula ca	12
	3.4	Indução do Infarto do Miocárdio	13
	3.5	Canulação	15
	3.6	Avaliação do Reflexo Barorreceptor	16
	3.7 Arteri	Medida de Pressão Arterial, Intervalo de Pulso, Labilidade da Pres al e do Intervalo de Pulso.	
	3.8 Mode	Variabilidade no Domínio da Frequência (Análise Espectral elamento Auto-Regressivo)	18
	3.9	Administração da Nanopartícula Lipídica com Vitamina E	15
	3.10	Ecocardiograma	18
	3.11	Processamento das amostras	21
	3.12	Perfil hematológico	22

3.13	Determinação da biodistribuição da nanopartícula lipídica.	12
3.14	Histologia	22
3.15	Análise morfométrica	22
3.16	Análise estatística	26
4 Re	esultados	27
4.1	Peso corporal e peso relativo do coração	27
4.2	Mortalidade	28
4.3	Ecocardiograma	30
4.4	Tamanho do Infarto	33
4.5	Análise morfométrica	34
4.6	Hemodinâmica	35
4.7	Perfil Hematológico	36
4.8	Biodistribuição	28
5 Di	scussão	37
6 Cc	onclusão	42
7 Re	eferências Bibliográficas	43

## 1 Introdução

#### 1.1 Remodelamento Cardíaco

O processo de remodelamento cardíaco tem como finalidade principal a manutenção da função cardíaca estável frente a determinada injúria como, por exemplo, isquemia, inflamação, alterações genéticas e sobrecarga volumétrica ou de pressão. A princípio, esse processo pode ser adaptativo, mas, a longo prazo, uma das consequências do remodelamento seria o aparecimento de disfunção ventricular progressiva com dilatação do ventrículo esquerdo, piora da função sistólica e potencialmente o desenvolvimento de arritmias ventriculares, insuficiência cardíaca e subsequente mortalidade cardiovascular (Zornoff & Spadaro, 1997; Bolognese et al, 2002).

O remodelamento cardíaco compreende variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar macroscopicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função cardíaca, que irão repercutir em manifestações clínicas (Bettencourt et al, 1999). As alterações celulares e moleculares associadas ao remodelamento ventricular afetam a área necrótica e também segmentos não infartados dos ventrículos. E como manifestação clínica, além das alterações na geometria do ventrículo, pode ocorrer comprometimento da função e desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Rocha, 2013).

Clinicamente, o remodelamento cardíaco é caracterizado por aumento da cavidade ventricular, que pode ocorrer tanto na fase aguda quanto na fase crônica do infarto (Zornoff & Spadaro, 1997). Na fase aguda, pode ocorrer o afilamento e aumento da extensão da parede infartada, caracterizando o processo de expansão do infarto (Hutchins & Bulkley,1978). Esse fenômeno predispõe à rotura ventricular, bem como propicia a formação de aneurismas (Francis, 2001). Na fase crônica, o processo de remodelamento cardíaco se

caracteriza pela hipertrofia da região não infartada e desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular, após infarto (Cohn et al, 2000). Inicialmente haveria manutenção da função ventricular e cronicamente, com a continuidade e/ou com a progressão do processo, ocorreriam diversas alterações que resultariam em disfunção ventricular progressiva (Grieve et al, 2004).

Em corações infartados, consequentemente à expansão, o ventrículo perde sua forma elíptica normal, assumindo configuração esférica. Nesse novo formato, há aumento importante da tensão parietal no ápice, de forma a igualála aos valores da região medial. Além dessa redistribuição de forças, verifica-se aumento significativamente maior da tensão parietal na diástole que na sístole. Acredita-se que o aumento desse estresse estimularia a replicação dos sarcômeros, preferencialmente em série. Comumente, em função da interação relação dilatação/espessura da desses fatores, а parede caracterizando hipertrofia ventricular do tipo excêntrico. Assim, essa dilatação ventricular crônica, secundária à hipertrofia excêntrica, seria uma adaptação que permitiria a manutenção da função ventricular, em contraposição ao aumento do estresse parietal (Ashrafian et al, 2007).

Assim, a extensão do remodelamento depende da área infartada, mas também é afetada pelas alterações estruturais decorrentes da cicatrização (Anzai, 2013). Portanto, o tamanho do infarto determina o grau de disfunção do ventrículo (Opie et al,2006).

#### 1.2 Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio é o principal causador de insuficiência cardíaca que leva a morbimortalidade, constituindo um dos mais custosos problemas de saúde pública, sua prevalência tende a subir por conta do envelhecimento populacional. Apesar dos avanços na terapêutica, o prognóstico ainda é ruim

podendo levar a óbito em curto prazo, metade dos pacientes diagnosticados com insuficiência cardíaca. A identificação de intervenções terapêuticas e modificação no estilo de vida são de fundamental importância para auxiliar na prevenção primária da insuficiência cardíaca (Chae et al, 2012).

O infarto do miocárdio é um processo que pode levar à necrose de parte do músculo cardíaco por falta de aporte adequado de nutrientes e oxigênio, consequente à obstrução do fluxo coronariano, transitória ou permanentemente, de magnitude e duração suficiente para não ser compensado pelas reservas orgânicas (Kanaan & Horstmann, 2006).

A causa habitual da morte celular é uma isquemia no músculo cardíaco por oclusão de uma artéria coronária. A oclusão se dá em geral pela formação de um coágulo sobre uma área previamente comprometida por aterosclerose causando estreitamentos luminais de dimensões variadas. Abaixo de um determinado nível de fluxo sanguíneo para a musculatura cardíaca surge um quadro isquêmico. Quando esta isquemia se prolonga, danos irreversíveis ocorrem, configurando uma área de infarto na musculatura do miocárdio (Gutterman, 2009).

A capacidade de adaptação do miocárdio ao estresse externo, seja ele resultante de sobrecarga hemodinâmica ou de isquemia e/ou infarto do miocárdio, determina se o coração irá descompensar ou manter sua função preservada (Mann, 2003).

Blankesteijn et al (2001), relacionaram o processo de restabelecimento cardíaco em quatro fases: de 6 horas a 4 dias ocorre a morte dos cardiomiócitos (fase1). Em 12 a 16 horas após o início da isquemia começa uma resposta inflamatória aguda (fase 2), com migração de neutrófilos granulócitos para a área infartada, atingindo um pico em 24 a 48 horas após o infarto. A principal função dos granulócitos é fagocitar e remover os cardiomiócitos mortos. Em seguida, os macrófagos e linfócitos acompanham os granulócitos para dentro da área infartada e ajudam na limpeza das células debrís. Dois ou três dias após o infarto do miocárdio, inicia-se a formação de tecido de granulação na margem da área infartada (fase 3). Finalmente, o remodelamento e cicatrização da área infartada inicia-se de 2 a 3 semanas e continua por 1 ano após o infarto do miocárdio (fase 4).

A limpeza dos debrís celulares pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos é fundamental na cicatrização do infarto, no entanto, a modulação desta resposta inflamatória é importante para prevenir excessiva degradação tecidual levando à expansão do infarto e insuficiência cardíaca. O desenvolvimento de insuficiência cardíaca após o infarto é determinado pelo tamanho da área necrótica, resposta cicatricial que ocorre nos dias e semanas após o evento e o remodelamento crônico da cicatriz do infarto, região peri-infarto e não infartada do ventrículo esquerdo (Kempf et al, 2012).

A terapia antioxidante tem sido apontada como promissora na redução do risco de insuficiência cardíaca, baseado em dados experimentais que mostram que o estresse oxidativo tem fundamental importância na patofisiologia da insuficiência cardíaca e que os riscos podem ser amenizados por terapias antioxidantes (Chae et al, 2012).

# 1.3 A nanopartícula lipídica artificial e o transporte direcionado de drogas

Na década de 80, Maranhão et al, desenvolveram uma emulsão lipídica destituída de proteínas e com conteúdo lipídico semelhante ao da lipoproteína de baixa densidade (LDL) natural. A nanopartícula lipídica adquire apolipoproteína E na circulação sanguínea e dessa maneira se liga aos receptores da LDL. (Hirata et al, 1999). A emulsão lipídica tem sido utilizada em estudos que avaliam o metabolismo da LDL (Maranhão et al, 1997).

Os primeiros estudos com a nanopartícula lipídica demonstraram, em animais de experimentação e posteriormente em seres humanos, que ela apresenta cinética de remoção plasmática semelhante à da lipoproteína natural (Maranhão et al, 1993; Maranhão et al, 1994). Em algumas neoplasias, a sua remoção plasmática encontra-se acelerada, devido ao aumento de receptores de LDL nas células tumorais, provavelmente pela necessidade de colesterol

nas células proliferativas. A nanopartícula tem a capacidade de se concentrar em tecidos que sofrem proliferação como ocorre, no câncer de mama (Graziane et al, 2002) e de ovário (Graziane et al, 2002; Ades et al, 2001), na leucemia mielóide aguda (Maranhão et al, 1994) e no mieloma múltiplo (Maranhão et al, 1994; Hungria et al, 2004).

Quando agentes antiproliferativos, como paclitaxel, carmustina ou etoposídeo são associados com a nanopartícula lipídica, eles inibem o crescimento tumoral em camundongos e o desenvolvimento de lesões ateromatosas em coelhos (Maranhão et al, 2002). A associação da nanopartícula com essas drogas reduz notavelmente a toxicidade das mesmas, preservando ou até mesmo aumentando sua atividade antineoplásica, como demonstrado por Teixeira et al, 2004 e Rodrigues et al, 2005. Essa redução de toxicidade a agentes quimioterápicos foi confirmada em testes clínicos (Pinheiro et al, 2006; Pires et al, 2009).

Maranhão et al, 2008 mostraram que a nanopartícula lipídica também pode se concentrar em aortas lesionadas de coelhos tratados com dieta rica em colesterol. O tratamento de coelhos com placas ateroscleróticas com a associação de nanopartícula ao paclitaxel reduziu significativamente essas lesões ateroscleróticas (Tavares et al, 2011).

#### 1.4 Vitamina E

A vitamina E é um termo genérico utilizado para descrever um grupo de moléculas lipossolúveis estruturalmente relacionadas, os tocoferóis e tocotrienóis. A vitamina E é um dos mais importantes antioxidantes conhecidos e tem sido investigada na inflamação (Silva, 2007).

Bell (1987) demonstrou a proteção conferida pela vitamina E contra o dano oxidativo aos ácidos graxos insaturados teciduais. Quatro tocoferóis são conhecidos, porém o alfa-tocoferol é o mais importante biologicamente, e as

denominações alfa-tocoferol e vitamina E são intercambiáveis na literatura (Halliwell et al, 1988).

O alfa-tocoferol é o componente mais importante da vitamina E sendo considerado o mais eficaz antioxidante lipossolúvel encontrado no nosso sistema biológico. Ao interagir com radicais livres, interrompe a cadeia de reações destes e previne a peroxidação dos lipídios, processo que gera produtos nocivos às células (Lehr & Messmer, 1996).

A vitamina E atua como *scavenger* (varredor) de radicais livres, pois possui em sua molécula um grupo hidroxila, do qual o átomo de hidrogênio é facilmente removido. Após sua atividade antioxidante, o alfa tocoferol torna-se alfa-tocoferil, um radical livre de baixa reatividade que pode reagir com outros antioxidantes, como a vitamina c, para ser regenerada ao seu estado original. A vitamina E preserva a integridade das membranas biológicas, estabiliza sua permeabilidade e fluidez e previne a apoptose induzida por estresse oxidativo. Além disso, o alfa-tocoferol é capaz de prender óxidos de nitrogênio na membrana solúvel eletrofílica e, assim, de forma eficiente inibir danos derivados de espécies reativas de nitrogênio (Cohen, 2011).

Os tocotrienóis são potentes antioxidantes presentes em todas as membranas celulares tendo efeito sobre os lípides, atuando na proteção contra lipoperoxidação (Pelaquim et al, 2008), diminuindo o colesterol total, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a apolipoproteína B (apoB) e a lipoproteína a (Lpa). Possuem também efeitos anticoagulantes e antiagregantes, efeito hipoglicemiante além de efeito anti-proliferativo e apoptótico sobre diversos tipos de câncer (Kenneth, 1995). A vitamina E pode reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o superóxido e a hidroxila, e também com o oxigênio singlet (Machlin & Bendich, 1987).

Em um estudo caso-controle, conduzido por kardinaal et al (1993), não foram observados efeitos do alfa-tocoferol sobre o risco cardiovascular, sugerindo os autores, que este fato se deva, provavelmente, a maior parte do alfa-tocoferol ter sido obtida da dieta e os níveis sanguíneos de alfa-tocoferol não serem suficientemente elevados para a redução do risco.

Queshi et al (1995), observaram que o número de mortes por causas cardíacas foi significativamente menor em pacientes portadores de insuficiência

renal crônica ao ser administrado altas doses de Vitamina E, apesar de não ter sido observada mudança significativa da incidência de doenças cardiovasculares.

Nos estudos de caso, muitos trabalhos avaliaram a razão infarto do miocárdio e as concentrações plasmáticas de vitamina E. Alguns estudos mostram que baixas doses de vitamina podem ser um fator de risco para doenças cardiovasculares, enquanto, que altos níveis não oferecem proteção (Gey et al, 1993; Hense et al, 1993). Elevadas concentrações plasmáticas de colesterol e baixas concentrações de alfa-tocoferol foram associadas com o aumento do risco de infarto do miocárdio (Street et al, 1994).

Enquanto o alfa-tocoferol é bem conhecido por suas propriedades antioxidantes, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação do tocotrienol. Contudo, estudos recentes sobre tocotrienol sugerem que este possa melhorar a função imunológica *in vitro* e confere efeito neuroprotetor em modelo animal (Sen et al, 2006). Curiosamente, o alfa-tocoferol sozinho não foi capaz de prevenir a formação de aterosclerose em camundongos, enquanto que uma mistura de alfa-tocoferol e tocotrienol reduziram os níveis de colesterol hepático e a formação de ateroma (Black et al, 2000).

Li et al (2010) mostraram que o tocotrienol suprimiu o sinal inflamatório induzido pelo óxido nítrico produzido pelos macrófagos e dessa forma, agindo como modulador inflamatório. Mais estudos são necessários para analisar se o tocotrienol pode impedir a formação de aterosclerose e reduzir riscos cardiovasculares.

Shargorodsky et al, 2010 mostraram efeitos vasculares benéficos do tratamento com antioxidantes combinados como, a vitamina E, vitamina C, selênio e coenzima Q10 no metabolismo lipídico, na pressão sanguínea e na glicemia de pacientes com múltiplos fatores de risco cardiovascular.

Bitu-Moreno et al (2001) e Bozkurt (2002), observaram que o uso do alfa-tocoferol após isquemia e reperfusão em animais de experimentação, atenuou a lesão oxidativa das células musculares e também diminuiu a formação de edema destas células, tendo assim uma ação protetora e parcial.

O uso preventivo da vitamina E reduziu significativamente o risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca em mulheres saudáveis com fração

de ejeção normal, maior ou igual a 50% (Chae et al, 2012). O mesmo não foi observado por Marchioli et al (2006) e Lonn et al (2005) que observaram que a vitamina E aumentou o risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca em pacientes com doença cardiovascular preexistente.

Pinho (2011), sugeriu que carotenóides e tocoferóis possuem propriedades antioxidantes efetivas capazes de amenizar os efeitos oxidativos no músculo cardíaco. Pelo exposto, a vitamina E pode ter papel nos mecanismos fisiopatológicos associados ao processo de remodelamento cardíaco. Contudo, seus efeitos em coração de ratos infartados ainda não são conhecidos.

# 2 Objetivo

Avaliar os efeitos da Vitamina E associada à nanopartículas lipídicas no remodelamento cardíaco, em ratos infartados.

# 2.1 Objetivo Específicos

Avaliar os efeitos da Vitamina E associada à nanopartículas lipídicas, em ratos infartados:

- Na morfologia cardíaca;
- Na função ventricular;
- Na extensão do infarto;
- No diâmetro dos miócitos;
- No processo de fibrose;
- No perfil hemodinâmico.

#### 3 Material e Métodos

## 3.1 Modelo Experimental

Foram utilizados 53 ratos machos Wistar com peso inicial entre 250 a 350g, provenientes do Biotério do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC-FMUSP).

Os animais foram divididos em 3 grupos:

- **Grupo Infarto Ve**: 17 animais infartados que receberam a Vitamina E associada a nanopartícula lipídica.
- Grupo Infarto SAL: 15 animais infartados que receberam solução salina 0,9%.
- **Grupo Controle**: 21 animais não infartados que receberam solução salina 0,9%.

O exame de ecodopplercardiograma foi realizado 24 horas após a indução do infarto. O tratamento com Vitamina E associada a nanopartícula lipídica, do grupo Ve e o tratamento com salina do grupo SAL iniciou-se imediatamente após a recuperação dos animais da anestesia para o ecocardiograma. O tratamento do grupo controle foi iniciado juntamente com os demais grupos. Após seis semanas de tratamento, os animais foram submetidos a novos exames de ecocardiograma para avaliação morfológica e funcional cardíaca. Em seguida foi realizada a eutanásia para coleta do material a ser analisado.

Os animais foram acondicionados em grupos de cinco, em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha, com tampa de arame cromado, ambiente com temperatura (22 - 26°C) e luminosidade (ciclo claro e escuro – 12h) controlados. A mortalidade dos animais foi observada diariamente desde o início do tratamento até o momento do sacrifício. O consumo de ração e água foi *ad libitum*, o peso corporal dos animais foi aferido utilizando-se uma balança

digital, duas vezes por semana antes de cada aplicação, para ajuste da dosagem de vitamina E a ser injetada. O esquema do protocolo experimental está representado na figura 1.

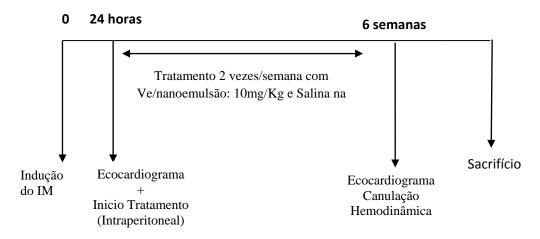


Figura 1 - Esquematização do protocolo experimental.

# 3.2 Preparo da nanopartícula lipídica artificial e incorporação da Vitamina E

A nanopartícula lipídica artificial foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg et al (1982), modificada por Maranhão et al (1993). A associação da nanopartícula lipídica artificial ao alfa-tocoferol, foi realizada por irradiação ultrassônica.

Em um frasco, foram pipetados 20 mg de fosfatidilcolina, 10 mg de oleato de colesterol e 0,25 mg de colesterol (Sigma Chemical Co – St. Louis, EUA), a partir de estoques preparados em clorofórmio/metanol (2:1) (Merck – Darmstadt, Alemanha). Em seguida, a mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas, a 4°C, para remoção dos solventes residuais. Foi adicionado à mistura de lípides tampão Tris-HCl pH 8,0 e emulsificada por irradiação ultra-sônica de 125 watts de potência, durante 2

horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando de 51 e 55°C. Após a sonicação foram adicionados 10 mg/mL de α-tocoferol (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A.) e a mistura foi sonicada por mais 1 hora.

A emulsão foi purificada por centrifugação e esterilizada através de passagem em filtro Millipore 0,22 µm de diâmetro.

A emulsão radioativa foi preparada pela mesma técnica descrita anteriormente, porém ao invés da associação da vitamina E, foi associado o radioisótopo trício (H³)-colesterol éter.

# 3.3 Avaliação da taxa de incorporação da vitamina E à nanopartícula lipídica

A taxa de incorporação do alfa-tocoferol à nanopartícula lipídica artificial foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O diâmetro de partícula foi determinado por espalhamento de luz (light scattering), utilizando o equipamento Laser Light Scattering ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp., em um ângulo de 90° e 658 nm e expressos pelo resultado médio obtido em 5 corridas.

### 3.4 Determinação da biodistribuição da nanopartícula lipídica.

Aproximadamente 100 µL da nanopartícula lipídica, sem a vitamina E, foi marcada radioativamente com trício (H³)-colesterol éter, que fixa no tecido, e injetada por via intraperitoneal em um grupo, de 10 ratos, sendo 5 infartados e 5 controles no dia prévio à eutanásia. Os animais foram sacrificados após 24 horas da injeção. Amostras com cerca de 1g foram retiradas dos seguintes órgãos: fígado, pâncreas, pulmão, rins, adrenais, gordura retroperitoneal

esquerda, intestino delgado (duodeno), intestino grosso (reto), testículo, gastrocnêmio, quadríceps esquerdo, cérebro, cerebelo, tronco encefálico, sangue, pele do tórax, baço, aorta e coração. Os lípides foram extraídos das amostras de tecidos coletados seguindo o método convencional descrito por Folch et al, 1957. Os fragmentos foram limpos em condições adequadas sob placa de gelo, em seguida pesados e então macerados de forma que ficassem com o aspecto pastoso. Os fragmentos foram transferidos para tubos grandes (20x160) onde se adicionaram 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio. As amostras ficaram em repouso overnight a 4 °C. Depois, por duas vezes foram filtradas, lavadas com 2,5 mL de clorofórmio e adicionados 7mL de água destilada. A fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e descartada. Adicionaram-se 4mL de "Clear Folch" (CHCl3/ MEOH/ H2O, 3:48:47) e a amostra ficou mais uma vez em repouso de um dia para o outro à temperatura ambiente e novamente o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio (N2), dissolvidas em solução de Folch e transferidas para tubos menores, lavando-se várias vezes e foram mais uma vez secas sob fluxo de nitrogênio e reconstituídas em 500 µL de solução de Folch em gelo. Foram então adicionados 4mL de solução cintiladora e mediu-se a radioatividade com um espectrômetro de cintilação líquida (Packard 1600 TR, Palo Alto, CA). O perfil de biodistribuição ou captação da nanopartícula lipídica foi obtido em amostra dos animais, por marcação com radioisótopo (3H)-Colesterol Éter da nanopartícula, e analisado em contador de radiação beta.

## 3.5 Indução do Infarto do Miocárdio

A indução do infarto do miocárdio foi realizada de acordo com a técnica de Johns & Olson, 1954, com algumas adaptações. Os animais foram anestesiados com mistura de ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) via

intraperitoneal, entubados e ventilados com pressão positiva em ventilador apropriado. Após tricotomia do tórax, foi feita a toracotomia lateral no local onde o coração causa impacto à palpação e em seguida, com o animal em posição supina, foi feita incisão de pele, divulsão dos músculos peitorais e intercostais, e afastamento das costelas. A pericardiotomia foi produzida e a artéria coronária descendente anterior esquerda foi ligada, a aproximadamente 3 mm da origem, com fio de nylon 6.0. A isquemia resultante foi visualizada pelo descoramento muscular da parede do ventrículo esquerdo. Em seguida, o tórax foi fechado por meio de sutura com fio de polipropileno 3.0 e o ar do espaço pleural foi drenado. Os músculos peitorais foram reposicionados e os animais foram mantidos em mesa cirúrgica aquecida até o retorno da anestesia. A extubação foi feita apenas quando o animal se mostrou estável.

Esse procedimento foi realizado nos grupos Vitamina E e Salina com a colaboração do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor-HC-FMUSP, sendo o procedimento cirúrgico realizado por um único profissional.

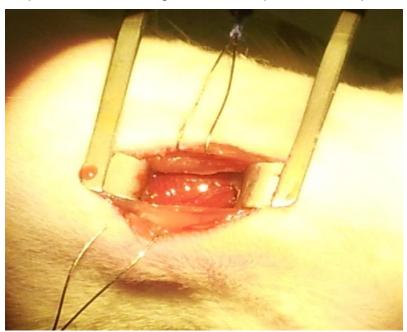


Figura 2 - Pericardiotomia para visualização da artéria coronária.

## 3.6 Administração da Nanopartícula Lipídica com Vitamina E

A administração da vitamina E veiculada pela nanopartícula lipídica foi realizada por injeção intraperitoneal (Pace et al, 2006) no grupo Vitamina E. Foram injetados 10 mg/kg de peso corpóreo de vitamina E (α-tocoferol - Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A), (Antoniades et al, 2003; Ficker et al, 2010). O tratamento foi realizado duas vezes por semana, durante seis semanas, iniciando-se imediatamente após a realização do ecocardiograma (Antoniades et al, 2003; Ficker et al, 2010).

O tratamento dos Grupo Salina e Controle foi feito com administração de solução salina 0,9% duas vezes por semana, durante seis semanas, iniciandose imediatamente após a realização do ecocardiograma, pela mesma via de acesso descrita e em volume equivalente ao do grupo Vitamina E.

### 3.7 Canulação

Após a 6ª semana de tratamento, os animais foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) para colocação de cânulas de polietileno (P-100, com 1,5 mm de diâmetro externo e 0,80 mm de diâmetro interno, conectada a 3cm de P-50, com 0,80 mm de diâmetro externo e 0,50 mm de diâmetro interno, para colocação de cânula na veia femural e P-100 conectada a 5cm de P-10, com 0,61 mm de diâmetro externo e 0,28 mm de diâmetro interno, para colocação da cânula na artéria femural).

As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica a 0,9% para registro da pressão e frequência cardíaca. A extremidade da cânula exteriorizada no dorso foi ocluída por um pino de aço inoxidável.

Após, as extremidades da P-10 e P-50 posicionadas na artéria e veia foram fixadas com fios de algodão e as extremidades do P-100 mais calibrosas foram passadas subcutaneamente até a região dorsal da coluna cervical, onde foram exteriorizadas e fixadas na pele também com fios de algodão.

## 3.8 Avaliação do Reflexo Barorreceptor

Para aferir a sensibilidade dos pressoreceptores foram feitas infusões de fenilefrina seguida da administração de nitroprussiato de sódio.

A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), um potente estimulador alfa-1, cuja ação predominante é a vasoconstrição das arteríolas periféricas, foi administrada em doses crescentes pela cânula da veia femural. Esse fármaco foi escolhido por aumentar a pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa gerenciada pelos pressoreceptores. O efeito oposto, redução da pressão arterial com resposta taquicárdica, também comandada pelos pressoreceptores, foi provocado pela infusão de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como veias, cuja ação ocorre por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3´, 5`- guanosina monofosfato (GMO cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos.

Na avaliação da sensibilidade dos pressoreceptores, o pico máximo ou o mínimo da pressão arterial média (PAM) deverá reduzir dos valores que foram obtidos no período controle. Espera-se a mesma redução quanto à frequência cardíaca (FC), imediatamente antes da infusão das drogas para posterior quantificação de respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada por meio da divisão do delta de frequência cardíaca (variação da frequência cardíaca pré e pós droga) pelo delta de pressão arterial média (variação da pressão arterial

pré e pós droga), onde chegamos a um índice de taquicardia reflexa (ITR) e índice de bradicardia reflexa (IBR).

# 3.9 Medida de Pressão Arterial, Intervalo de Pulso, Labilidade da Pressão Arterial e do Intervalo de Pulso.

Após o tratamento com vitamina E associada a nanopartículas lipídicas, os registros de pressão pulsátil contínuo forneceram os valores diretos da pressão arterial de todos os grupos experimentais. A cânula da artéria femural exteriorizada no dorso do animal, foi conectada a um tubo de polietileno P-100 e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db; Gould-Statham) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador de sinal (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.). O sinal analógico de pressão arterial foi convertido para digital (Stemtech, Inc.) e registrado em tempo real por um microcomputador com sistema CODAS, com frequência de amostragem de 2000 Hz por canal.

A análise dos sinais da pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição. O referido software permite a detecção de picos máximos e mínimos da curva da pressão de cada batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A FC no intervalo de pulso (IP) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos, os resultados foram apresentados em valores médios e desvio padrões dos períodos em que os dados foram analisados para FC e PA. As planilhas de dados foram obtidas e analisadas por um programa comercial de análise Excel 5.0, onde foi calculada a média, desvio padrão da PAM, PAS e PAD de cada animal. A labilidade da PA de cada animal foi calculada, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal.

# 3.10 Variabilidade no Domínio da Frequência (Análise Espectral Modelamento Auto-Regressivo)

Cada batimento cardíaco foi identificado através de um algoritmo implementado no Windaq/DATAQ, que automaticamente realiza a detecção dos intervalos de pulso, do evento sistólico da onda do sinal de pressão arterial. Após a leitura automática foi realizada uma inspeção visual para identificar e/ou corrigir alguma marcação incorreta. Posteriormente foi gerada a série temporal de cada sinal a ser estudado, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Quando necessário, utilizou-se a interpolação linear 24 horas, o qual detecta a frequência central, número e potência de cada componente (Pagani M, 1986; Pagani M,1987). A faixa de frequência de interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 a 3 Hz.

A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse: altas frequências (HF), entre 0,75 e 3 Hz; baixas frequências (LF), entre 0,2 e 0,75 Hz e muito baixas frequências (VLF), menores que 0,2 Hz.

## 3.11 Ecocardiograma

Foi realizado o ecocardiograma para a quantificação da área infartada e avaliação da função ventricular seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Utilizou-se o aparelho Acuson, modelo Sequóia 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor linear multifrequencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensional e monodimensional simultâneas. O padrão de contração regional e global foi avaliado, em tempo real, nos cortes paraesternal longitudinal e transverso do

ventrículo esquerdo. Os exames foram realizados por um único observador e as imagens foram gravadas em fitas VHS.

Os animais foram submetidos a este exame 24 horas após a indução do infarto e ao final de seis semanas, sendo previamente pesados e submetidos à tricotomia de tórax e sedação com o mesmo anestésico e dose utilizados na cirurgia de oclusão coronariana. Para obtenção das imagens ecocardiográficas, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Os registros dos traçados do modo M tiveram velocidade de 100 mm/s.

As medidas das estruturas cardíacas foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo M, conforme Schiller et al (1979), com as seguintes medidas e cálculos: tamanho de átrio, espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPd), espessura diastólica do septo interventricular (ESId), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (Dd) e diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (Ds).

A massa ventricular esquerda (MVE) foi então obtida a partir da fórmula: 1,047 x [(ESId+ Dd+PPd)³- Dd³] x 0,8 + 0,6 onde: 1,047 representa a densidade do miocárdio, validada em ratos (Fard et al,2000) e os índices 0,8 e 0,6, fatores de correção (Watson et al, 2004). Para caracterização da hipertrofia foi utilizado a espessura relativa da parede (ERP), obtida pela fórmula: (ESId + PPd)/Dd (Qu et al, 2000).

As estruturas cardíacas foram avaliadas seguindo as recomendações da American Society of Echocardiography/European Association of Echocardiography (Lang et al, 2005) e já validadas em modelo de ratos infartados (Solomon et al, 1999).

A função ventricular sistólica foi analisada pela fração de encurtamento (FE%), pela fração de variação da área (FVA%) (Solomon et al, 1999) e pela velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), obtidas pelas fórmulas:

 $FE\% = (Dd-Ds/Dd) \times 100$ 

FVA = AD-AS/AD x 100, sendo: AD área diastólica e AS área sistólica

VEPP = (Dd-Ds)/(Dd x AOV), sendo: AOV, tempo de ejeção da aorta.

A função ventricular diastólica foi calculada pela relação E/A – razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A; pela

obtenção do tempo de desaceleração da onda E (DESAC E) – medido entre o pico da onda E e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral e também pela análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) - medido entre o final do fluxo sistólico na via de saída do VE e o início do fluxo diastólico mitral. Esse índice analisa basicamente a fase de relaxamento do miocárdio, que ocorre após o pico sistólico, no período entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral, no qual o ventrículo esquerdo não altera seu volume. Esse parâmetro pode ser obtido tanto por meio do modo M quanto pelo Doppler, com a aquisição simultânea das curvas de fluxo mitral e aórtico. Usualmente, quando o relaxamento torna-se prejudicado, o TRIV está prolongado, sendo o valor normal em humanos de aproximadamente 65 + 20 ms, com alguma variação conforme diferentes autores. O DESAC E e o TRIV foram corrigidos pela raiz quadrada do intervalo R-R.

Para análise de função global foi usado o índice de desempenho miocárdico (IDM), validado em camundongos por Broberg et al (2003), e que representa a razão do tempo total gasto na atividade isovolumétrica (contração e relaxamento isovolumétrico) pelo tempo de ejeção. Dessa maneira, obtém-se o IDM por meio da fórmula (TFM-AOV)/AOV sendo TFM, tempo de fechamento mitral.

Utilizamos como prognóstico independente do processo de remodelamento ventricular a taxa de estresse da parede do VE (TEP). A mesma foi determinada pela fórmula: (AD/2xESId), onde AD, área diastólica e ESId, espessura do septo interventricular (Minicucci et al,2011).

O tamanho do infarto também foi avaliado pela ecocardiografia, sendo obtido pela razão percentual entre a área total do infarto e área diastólica.

Foi considerado infarto à ecocardiografia regiões hipocinéticas (baixa contratilidade da musculatura), acinéticas (ausência de contratilidade) e discinéticas (contrações irregulares). Sendo classificado infarto pequeno quando menor que 20%, moderado entre 20 e 40% e grande quando maior que 40% (Santos, 2009).

#### 3.12 Processamento das amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia após seis semanas do início do tratamento, sob anestesia, com ketamina 50mg/kg e xylazina 10mg/kg. Foi realizada laparotomia mediana, com dissecção e punção da veia cava para coleta de sangue e administração de solução de cloreto de potássio (soro fisiológico 0,9% 80mL + KCl 19,1% 20mL), até a parada cardíaca. Após a remoção do coração, o mesmo foi pesado e em seguida dividido em base, 1/3 médio e ápice, sendo o 1/3 médio fixado em formol 10% e emblocado em parafina. A base e o ápice foram congelados em nitrogênio líquido. O peso relativo do coração foi normalizado pelo peso corporal do animal obtido ao final do experimento (g/kg).

Os animais foram então armazenados em sacos brancos, identificados e refrigerados, para serem encaminhados posteriormente à incineração.



Figura 3 - Localização do infarto (seta).

## 3.13 Perfil hematológico

A análise do perfil hematológico dos ratos foi realizada ao final do tratamento, após coleta de sangue em tubos com anticoagulante EDTA. A contagem de leucócitos totais, hemácias, hemoglobina, plaquetas e a contagem diferencial dos leucócitos foi feita por meio do aparelho Poch 100iV Diff (Roche).

### 3.14 Histologia

Uma fatia transversal do miocárdio na porção equatorial dos ventrículos foi processada, embebida e emblocada em parafina e dela foram obtidos cortes histológicos de 5 micra de espessura.

#### 3.15 Análise morfométrica

Para a avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizados cortes histológicos corados com solução Hematoxilina-Eosina (HE), sob aumento de 40x. As medidas foram realizadas por meio do programa QWIN *Image Processing and Analysis Software* (Leica Microsystems Cambridge Ltd.), acoplado à microscopia ótica. Foram selecionados os miócitos de toda a parede ventricular da região remota ao infarto, com núcleo ovalado e centralizado, localizados na região instersticial do ventrículo esquerdo. A hipertrofia foi então obtida pelo diâmetro dos miócitos em torno do núcleo (μm),

(Figura 4) e as médias das áreas seccionais obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular (Koike et al, 2007).

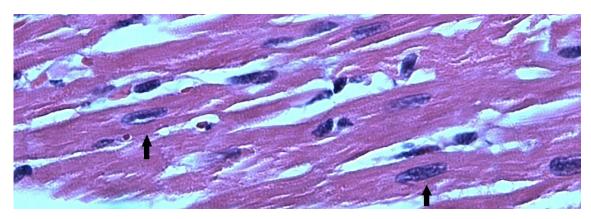


Figura 4 - Miócito com disposição longitudinal, núcleo ovalado e centralizado.

A avaliação da fibrose miocárdica foi feita em cortes histológicos corados com *Picrosirius red* (figura 5), coloração específica para o colágeno, por meio do programa QWIN Image Processing and Analysis Software (Leica Microsystems Cambridge Ltd.), acoplado à microscopia ótica, utilizando-se a objetiva de 40x. Foi analisada toda a parede do ventrículo esquerdo, de duas regiões distintas, não subendocárdica (figura 6) e subendocárdica (figura 7), na área remota ao infarto. A fibrose foi estimada pela fração de volume do colágeno (FVC%), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em vermelho, e a área total do miocárdio (Piedade, 2006).



Figura 5 - Corte transversal médio do coração, na região equatorial, corado com Picrosirius Red (setas indicando o colágeno intersticial, em vermelho).

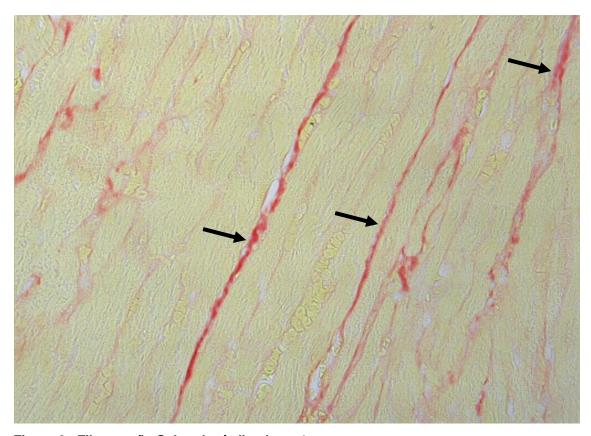


Figura 6 - Fibrose não Subendocárdica (setas).

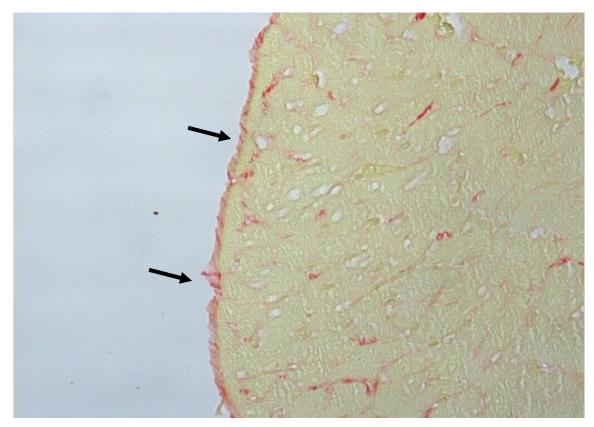


Figura 7 - Fibrose Subendocárdica (setas).

Para estimativa da área infartada foram utilizados os mesmos cortes e a mesma coloração feita para a quantificação da fração do volume de colágeno. As lâminas foram escaneadas e as medidas foram realizadas por meio do programa Image J, com as devidas calibrações. O infarto foi definido como correspondendo à região da parede ventricular esquerda, entre as bordas exteriores, onde foi identificado tecido de cicatrização. O tamanho do infarto (%) foi estimado calculando-se a média dos tamanhos do infarto externo e interno. O infarto externo foi calculado pela razão percentual entre o comprimento da superfície epicárdica com infarto e o comprimento total da superfície epicárdica do ventrículo esquerdo. O infarto interno foi calculado pela razão percentual entre o comprimento da superfície endocárdica com infarto e o comprimento total da superfície endocárdica do ventrículo esquerdo (Koike et al, 2007) (figuras 8 e 9).

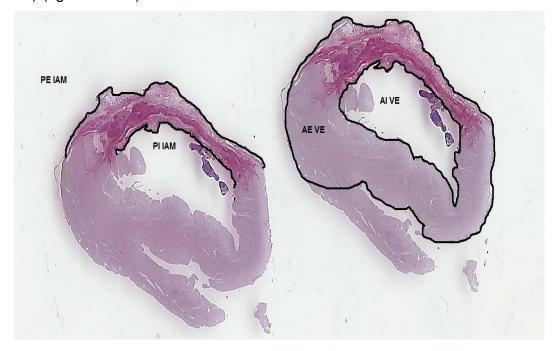


Figura 8 - Medida de tamanho do infarto: PE IAM (perímetro externo do infarto), PI IAM (perímetro interno do infarto), AE VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI VE (área interna do ventrículo esquerdo).

Figura 9 - Fórmula para cálculo da área de infarto.

A dilatação do ventrículo esquerdo foi estimada pelo índice de expansão do ventrículo esquerdo, calculado pela razão entre a área da cavidade ventricular esquerda (cavVE) e a área total do ventrículo esquerdo (totalVE) multiplicada pela razão entre a espessura do septo (Lsepto) e a espessura da parede com infarto (Linfarto) ou da parede livre, no grupo controle (Koike et al, 2007).

Índice de expansão= (cavVE/totalVE) x (Lsepto/Linfarto)

#### 3.16 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. O tipo de distribuição das variáveis e a hipótese de igualdade das variâncias foram testados em todos os casos.

A análise de variância (ANOVA) de um fator, com o pós-teste de Student Newmann Keuls foi realizada para comparação entre os grupos pelo software *SigmaStat*® versão 3.1. O nível de significância estatística foi estabelecido pelo valor P < 0,05.

#### 4 Resultados

## 4.1 Peso corporal e peso relativo do coração

O peso corporal médio ao final do tratamento dos animais do grupo controle foi de 443 ± 46g, enquanto que o grupo infarto vitamina E foi de 442 ± 39g e do grupo infarto salina foi de 425 ± 28g, sem diferença estatística significativa entre os grupos. Houve um ganho de peso proporcional entre os grupos desde o início do tratamento.

O peso relativo do coração foi calculado pela razão entre o peso do coração (g) e peso corporal do animal (g), multiplicado por 1000, sendo o resultado obtido em g/Kg. O coração dos animais dos grupos infartados apresentou um peso maior quando comparado ao dos animais do grupo controle (P<0,05). Não havendo diferença estatística entre os grupos infartados (Tabela 1).

Tabela 1 - Peso corporal e Peso relativo do coração

	Controle		Infarto Sal		Infarto VE	
	24h 6 sem		24h 6 sem		24h 6 sem	
Peso corporal	301±57 443±46+++		282±40	425±28+++	297±51	442±39+++
(g)						
Peso relativo do coração (g/kg)	-	2,9±0,1	-	3,4±0,3*	-	3,4±0,2*

Valores expressos como média  $\pm$  DP. \* P<0,05 vs Controle no mesmo tempo; +++P<0,001 vs 24h do mesmo grupo.

### 4.2 Mortalidade

A mortalidade foi de 22% no grupo infarto vitamina E e 52% no grupo infarto salina. Essa mortalidade ocorreu principalmente entre a 3ª e 4ª semana de tratamento.

# 4.3 Biodistribuição

Como apresentado na figura 10 não houve diferença na captação da nanopartícula marcada com radioisótopo (H³) pelo coração de ratos controles e ratos infartados.

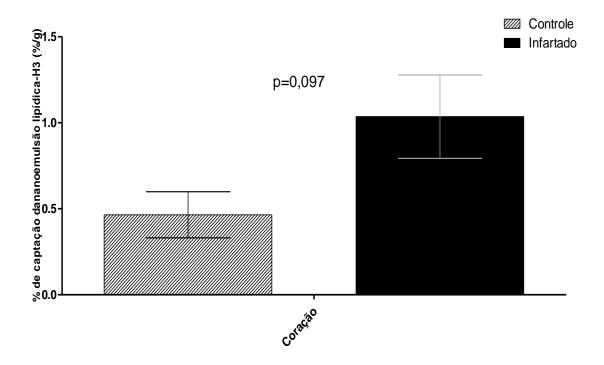
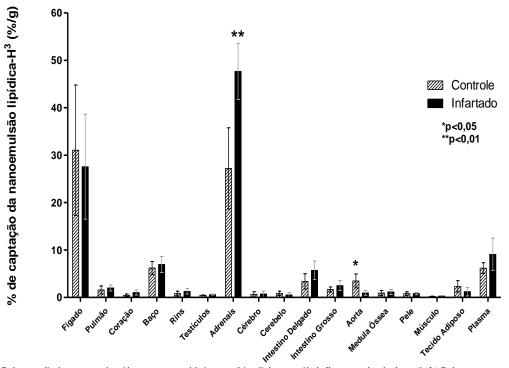


Figura 10 - Percentual de captação da nanopartícula lipídica marcada com H3 do coração de ratos controle e infartados.



Dados normalizados por grama de tecido, exceto para medula óssea, que foi avaliado o conteúdo do fêmur esquerdo e do plasma (1mL). Dados expressos em média±DP.

Figura 11 - Percentual de captação da nanopartícula lipídica marcada com H3 por órgão de ratos controle e infartados.

A figura 11 mostra o percentual de captação da nanopartícula marcada com radioisótopo (H³) por órgão estudado de ratos controles e infartados, sendo observado que a captação é maior pelas glândulas adrenais dos infartados quando comparado ao grupo controle (p<0,01).

A aorta dos ratos controle mostrou uma maior captação da nanopartícula marcada com radioisótopo (H³) quando comparado ao grupo infartado (p< 0,05).

### 4.4 Ecocardiograma

Os resultados obtidos na avaliação morfológica feita pelo ecocardiograma estão apresentados na tabela 2.

Como observado, o tamanho do átrio (TA) foi maior no grupo infarto vitamina E tanto pré quanto pós tratamento, quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo. Esse aumento também foi observado no grupo salina 6 semanas quando comparado a ele mesmo ao início do tratamento e ao grupo controle pós tratamento. Não foi observada diferença estatística entre os grupos infartados em nenhum momento. O grupo infarto salina apresentou uma diminuição na espessura do septo interventricular na diástole (ESId) após seis semanas quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo. O diâmetro diastólico (Dd) e o diâmetro sistólico (Ds) dos grupos infartados foram maiores após seis semanas quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo e quando comparado a 24 horas pós infarto. Houve um aumento da massa do ventrículo esquerdo (MVE) após seis semanas em cada grupo quando comparado ao início do tratamento, sendo que nos grupos infartados esse aumento foi mais expressivo. Não houve diferença estatística entre os grupos.

A espessura relativa de parede (ERP), nos mostra a proporção hipertrofia/dilatação e pode-se observar que há uma diminuição dessa proporção nos grupos infartados, quando comparado ao início do tratamento.

Não foi observada nenhuma diferença estatística após o tratamento, nos parâmetros morfológicos entre os grupos infartados.

Tabela 2 - Avaliação morfológica obtida por ecocardiografia

	Controle		Infart	o Sal	Infarto VE		
	24h	6 sem	24h	6 sem	24h	6 sem	
	0,34±0,05	0,41±0,06 +++	0,41±0,08	0,53±0,13** ++	0,42±0,10**	0,52±0,07** ++	
TA (cm)							
ESId (cm)	0,15±0,04	0,16±0,05	0,14±0,05	0,12±0,03*	0,16±0,04	0,15±0,04	
PPd (cm)	0,16±0,04	0,17±0,04	0,14±0,04	0,15±0,03	0,17±0,05	0,18±0,05	
	0,72±0,05	0,74±0,06	0,70±0,10	0,89±0,09*** +++	0,67±0,08	0,89±0,09*** +++	
Dd (cm)							
Ds(cm)	0,42±0,08	0,44±0,08	0,54±0,11**	0,70±0,14*** ++	0,48±0,08	0,64±0,12*** +++	
MVE (g)	1,2±0,2	1,4±0,3	1,1±0,2	1,3±0,2++	1,2±0,3	1,5±0,3++	
ERP(cm)	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,2	0,3±0,1*+	0,5±0,2	0,4±0,1+	

TA(cm), tamanho de átrio em centímetros; ESId(cm), espessura do septo interventricular na diástole em centímetros; PPd(cm), parede posterior na diástole em centímetros; Dd(cm), diâmetro diastólico em centímetros; Ds(cm), diâmetro sistólico em centímetros; MVE(g), massa ventricular esquerda em gramas; ERP(cm), espessura relativa da parede em centímetros. Valores expressos como média ± desvio padrão. \*,P<0,05; \*\*,P<0,01; \*\*\*,P<0,001 vs Controle no mesmo tempo. +, P<0,05; ++,P<0,01; +++,P<0,001 vs 24h do mesmo grupo.

Tabela 3 - Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo

	Controle		Infarto Sal		Infarto VE	
	24h	6 sem	24h	24h	6 sem	24h
E/A (cm/s)	2,2±0,7	2±0,5	2,9±0,4	2,6±1,4	2,6±1,1	2,8±1,6
DESAC E (ms)	4±0,9	4±0,8	4±0,8	4±0,6	4±1,1	4±1,3
TRIV (ms)	2±0,5	2±0,5	2±0,7	2±0,6	2±0,8	2±0,7

E/A(cm/s), relação Onda E/onda A em centímetros por segundo; DESAC E (ms), tempo de desaceleração da onda E em milissegundos; TRIV (ms), tempo de relaxamento isovolumétrico em milissegundos. Valores expressos como média ± desvio padrão.

Não houve diferença quanto à função diastólica do ventrículo esquerdo entre os grupos após tratamento com a vitamina E associada à nanopartícula lipídica, como demonstrado na tabela .3

Tabela 4 - Avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo

	Controle		Infarto	Sal	Infarto VE		
	24h	6 sem	24h	24h	6 sem	24h	
FE (%)	44±8	45±9	25±13**	26±12**	29±7**	28±9**	
TEP	1,0±0,2	1,1±0,3	0,8±0,3	1,6±0,4* +++	0,8±0,3	1,7±0,5* +++	
VEPP(ms)	0,0047±0,0012	0,0048±0,009	0,0035±0,0019*	0,0032±0,0014 ***	0,0064±0,0015*	0,0061±0,0011 ***	
FVA (%)	49±8	44±9	21±10**	26±8**	23±11**	29±10**	
IDM	0,3±0,2	0,4±0,2	0,6±0,2**	0,5±0,2	0,4±0,2	0,7±1,1	

FE, fração de encurtamento; TEP,taxa de estresse da parede; VEPP, velocidade de encurtamento da parede posterior; FVA, fração de variação da área e IDM, índice de desempenho miocárdico. Valores expressos como média ± desvio padrão. \*,P<0,05; \*\*,P0,001; \*\*\*,P<0,001 vs controle no mesmo tempo. #P<0,05, vs infarto salina no mesmo tempo.

Como apresentado na tabela 4, a fração de encurtamento (FE), foi menor nos grupos infartados quando comparada ao grupo controle nos dois tempos, não havendo diferença estatística entre os grupos. Já a Taxa de estresse da parede (TEP) foi maior nos grupos infartados após 6 semanas quando comparada ao início do tratamento, e no grupo infarto vitamina E, a TEP foi maior quando comparada ao do grupo controle após o tratamento. Com relação à velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), o grupo infarto vitamina E obteve valor maior quando comparado ao grupo controle, nos dois tempos. Já no grupo infarto salina esse valor foi menor em comparação ao grupo controle, porém sem diferença estatística entre os grupos infartados e após o tratamento. A fração de variação da área (FVA) foi menor nos grupos infartados pré e pós tratamento, quando comparado ao grupo controle nos mesmos tempos.

O índice de desempenho miocárdico (IDM) mostrou-se maior no grupo infarto salina em relação ao grupo controle e ao grupo infarto vitamina E, em 24 horas. Esse aumento não foi observado após seis semanas de tratamento em nenhum dos grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos.

A figura 12 mostra um gráfico de correlação entre as variáveis fração de encurtamento e diâmetro sistólico. Observamos que o grupo infarto vitamina E, obteve valores intermediários aos grupos controle e infarto salina.

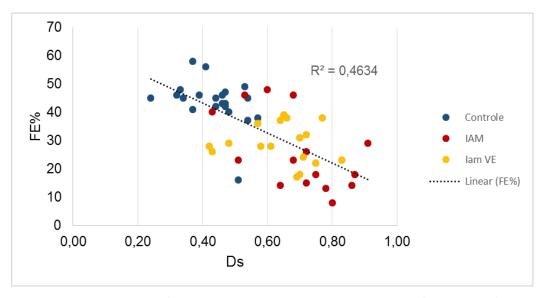


Figura 12 - Correlação das variáveis fração de encurtamento (FE%) e diâmetro sistólico (Ds), entre os grupos controle, infarto salina e infarto vitamina E.

### 4.5 Tamanho do Infarto

O resultado obtido pelo ecocardiograma, mostrou que no grupo infarto salina, houve um aumento significativo do tamanho do infarto após 6 semanas. O mesmo não foi observado no grupo infarto vitamina E, como representado na figura 13. Não houve diferença estatística entre os grupos em 24 horas e em 6 semanas.

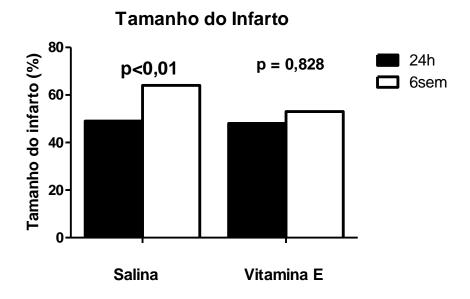


Figura 13 - Tamanho do infarto pré e pós tratamento, obtido por ecocardiograma.

#### 4.6 Análise morfométrica

Os resultados estão apresentados na tabela 5. Não houve diferença estatística entre os grupos infartados com relação ao tamanho do infarto após seis semanas, o que condiz com os resultados obtidos pelo ecocardiograma. Os grupos infarto salina e infarto vitamina E, apresentaram um diâmetro maior em comparação ao grupo controle. A fração de volume de colágeno do ventrículo esquerdo mostrou um aumento da fibrose não subendocárdica e da subendocárdica em áreas remotas ao infarto nos grupos infartados, em relação ao grupo controle. A expansão do ventrículo esquerdo ocorreu, expressivamente, nos grupos infartados quando comparado ao grupo controle.

Tabela 5 - Dados morfométricos dos grupos controle, infarto salina e Infarto vitamina E

	Controle	Infarto Sal	Infarto VE
TI (%)	0	41±6	40±6
DM (μm)	24±3	37±3***	32±4***
FVC NSE (%)	3±1	5±1**	5±2**
FVC SE (%)	4±1	11±4***	7±3***
IEVE	0,15±0,04	0,78±0,32***	0,55±0,18***

TI, tamanho do infarto; DM, diâmetro dos miócitos; FVC, fração de volume de colágeno; NSE, não subendocárdica; SE, subendocárdica; IEVE, índice de expansão do ventrículo esquerdo. Valores expressos como média ± desvio padrão, \*\*,P<0,01, \*\*\*,P<0,001 vs. Controle.

#### 4.7 Hemodinâmica

Como apresentado na tabela 6, não foi observado diferença estatística nas variáveis hemodinâmicas entre os grupos.

Tabela 6 - Parâmetros hemodinâmicos

Parâmetro	Controle	Infarto Sal	Infarto VE
PAS(mmHg)	136±8	130±11	130±10
PAD(mmHg)	94±6	91±5	91±6
PAM(mmHg)	112±7	108±8	107±7
FC (bpm)	347±18	349±31	358±22
RESP TAQ (NITRO)	1,6±0,4	2,6±1,0	1,8±0,7
RESP BRAD (FENIL)	1,1±1,0	1,0±0,5	1,6±1,1

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; RESP TAQ, resposta taquicárdica; RESP BRAD, resposta bradicárdica. Valores expressos como média ± desvio padrão.

# 4.8 Perfil Hematológico

A tabela 7 mostra um valor maior nos leucócitos totais no grupo infarto vitamina E quando comparado ao grupo controle e ao grupo infarto salina.

Tabela 7 - Perfil hematológico dos grupos controle, infarto salina e infarto vitamina E

	Controle	Infarto Sal	Infarto VE	Р	VR1
Eritrócitos (milhões/mm3)	8,2 ± 1,0	$8,0 \pm 1,3$	$7,9 \pm 0,5$	0,81	5,4-10
Hg (g/dL)	18,1 ± 2,2	18,1±2,3	17,3 ± 1,2	0,72	11-18
Ht (%)	$44.7 \pm 4.9$	$44 \pm 5,3$	$42,6 \pm 2,5$	0,66	35-49
VCM (fL)	54,7 ± 1,2	$55,3 \pm 3,5$	54,3 ± 1	0,67	49-64
Leucócitos totais					
(mil/mm3)	5,7 ± 1,8	$6,0 \pm 2,3$	9,7 ± 3,0*#	0,02	4-17
Neutrófilos (%)	$30,7 \pm 8,2$	$31,6 \pm 9,2$	$25,9 \pm 7,8$	0,43	9-50
Eosinófilos (%)	1,9 ± 2,0	1,6 ± 1,5	$1,1 \pm 0,7$	0,66	0-6
Basófilos (%)	0,1±0,4	0	0	0,45	0-1.5
Linfócitos (%)	64 ± 9	64 ± 10	70 ± 8	0,33	50-85
Monócitos (%)	3,6 ± 1,1	$3.0 \pm 1.0$	$2,6 \pm 0,8$	0,19	0-5
Plaquetas (fL)	$7,4 \pm 1,3$	$7,7 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,5$	0,54	4.5-8,8

¹Cubas et. al; 2007. Valores expressos como média ± desvio padrão. \*P<0,05 vs Controle e #P<0,05 vs infarto salina.

#### 5 Discussão

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da administração de vitamina E associada a nanopartículas lipídicas no remodelamento ventricular após o infarto do miocárdio em ratos, por meio de análise de sobrevida e de variáveis morfológicas, funcionais e intersticiais.

O primeiro aspecto a ser ressaltado refere-se ao uso da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas. Nosso estudo utilizou protocolo já validado na literatura, com a administração de injeção intraperitoneal de vitamina E, como α-tocoferol, na dose de 10mg/Kg de peso corporal (Antoniades et al, 2003; Ficker et al, 2010) e um modelo experimental bem estabelecido, de injúria miocárdica e fibrose intersticial que é o infarto agudo do miocárdio (Minicucci, 2011; Ardisson, 2012).

A nanopartícula lipídica faz o direcionamento de drogas a tecidos específicos (Redgrave & Maranhão, 1985; Maranhão et al, 1986). Sua capacidade de se concentrar em tecidos que sofrem processos proliferativos, já foi demonstrada anteriormente (Ades et al, 2001; Padoveze et al, 2009). Em nosso estudo pudemos observar que a captação da nanopartícula foi maior pelas glândulas adrenais dos infartados quando comparado ao grupo não infartado. Isso se deve ao fato de que a adrenal produz aldosterona, que participa do sistema renina-angiotensina, que por sua vez é precoce e intensamente ativado em insuficiência cardíaca, mesmo na presença apenas de disfunção ventricular. Assim sendo ocorre uma maior atividade da glândula adrenal e consequentemente um aumento de aldosterona na presença de qualquer injúria cardíaca, como no caso desse modelo experimental. Além disso, observamos uma maior captação da nanopartícula pela aorta dos ratos controle, quando comparado ao grupo infartado, esse achado precisa ser melhor investigado.

Para avaliarmos a presença ou não de efeitos secundários decorrentes do uso da nanopartícula lipídica e excluir a possibilidade de uma toxicidade, realizamos a determinação do perfil hematológico desses animais.

Observamos um valor maior nos leucócitos totais no grupo infartado tratado com a vitamina E associada a nanopartícula lipídica, quando comparado ao grupo sem infarto e ao grupo infartado sem tratamento, porém esse aumento permaneceu dentro dos valores de referência para o modelo experimental (Cubas et al, 2007). Essa diferença não se manteve nos demais dados do leucograma, não podendo ser considerado como indicativo de toxicidade.

Verificou-se também, uma mortalidade maior no grupo infartado sem tratamento, quando comparado ao grupo infartado tratado com a vitamina E associada a nanopartícula lipídica. Essa mortalidade ocorreu principalmente entre a 3ª e 4ª semana pós oclusão coronariana, provavelmente, por insuficiência cardíaca crônica. A vitamina E parece ter atenuado a mortalidade nesse modelo experimental, porém mais estudos são necessários para afirmar esse achado.

A avaliação da atividade do sistema nervoso autônomo pelo uso de diferentes técnicas nos permite estimar a contribuição desse sistema nas respostas alteradas, associadas a doença cardiovascular. A redução da função parassimpática parece contribuir para o aumento da variabilidade da pressão arterial e, consequentemente, para as lesões do órgão alvo observadas na doença cardiovascular (Angelis et al, 2004). Respostas reflexas do simpático e do parassimpático permitem ajustes do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, contribuindo para a estabilização e manutenção da pressão arterial sistêmica durante diferentes situações fisiológicas (Cowley 1996).

Em modelos animais, a sensibilidade barorreflexa pode ser avaliada pela infusão de drogas vasoativas, fenilefrina e nitroprussiato de sódio, as quais induzem aumentos e quedas da pressão arterial que promovem respostas bradicárdicas e taquicárdicas, respectivamente (Angelis et al, 2004). No presente trabalho, diferentemente do esperado, não foram observadas diferenças nas variáveis hemodinâmicas entre os grupos infartados, com relação ao grupo controle.

Como já esperado, o peso relativo do coração dos animais infartados, foi maior quando comparado ao dos animais do grupo controle, isso se deve ao processo de remodelamento. Não houve diferença entre os grupos infartados.

É importante ter em mente, que o remodelamento ventricular é caracterizado por variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que irão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração, em resposta a uma determinada injúria (Pfeffer et al; 1985,1990). Dessa forma, o estudo de estratégias que interfiram positivamente nesse processo torna-se necessário.

Com relação a morfologia, o infarto leva a alterações complexas da estrutura cardíaca. A dilatação do ventrículo esquerdo e o afilamento da parede, em consequência do processo de expansão, são características da região infartada (Hutchins & Bulkley, 1978). Por essa razão, esse fenômeno, clinicamente, é diagnosticado por alterações do diâmetro da cavidade, da massa ou da espessura ventricular esquerda (Matsubara et al, 2000). Isso foi observado em nosso estudo, pois a espessura relativa da parede (ERP) após a 6ª semana diminuiu, tanto no grupo tratado quanto no grupo não tratado, indicando um aumento da cavidade e um afilamento da espessura da parede do coração desses animais.

No presente estudo, considerando os efeitos da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas nas variáveis morfológicas, os animais infartados tratados ou não, não apresentaram diferenças no diâmetro da cavidade ventricular esquerda, na massa ventricular e na espessura da parede. Assim, podemos concluir que o uso da vitamina E associada a nanopartículas lipídicas não atenuou essa variável que também caracteriza o remodelamento pós infarto.

O remodelamento ventricular pós infarto está associado à disfunção ventricular progressiva, arritmias complexas e maior mortalidade (Francis 2001). No presente estudo conforme esperado, observou-se que o infarto resultou em comprometimento da função sistólica, o mesmo não foi observado no que se refere a função diastólica. Deve-se considerar que a disfunção sistólica é uma das principais características do processo de remodelamento pós infarto (Zornoff, 1997). Porém, contrariamente ao esperado, não observamos diferença na fração de encurtamento (FE), na taxa de estresse da parede (TEP), na velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e na fração de variação da área (FVA), avaliadas pelo ecocardiograma, entre os

animais infartados tratados com a vitamina E, em relação aos animais infartados não tratados. Assim sendo, a vitamina E associada a nanopartículas lipídicas não apresentou efeito benéfico nas variáveis funcionais, nesse modelo experimental.

Já está bem elucidado na literatura a importância do colágeno no interstício do miocárdio, tanto para a manutenção quanto para a estrutura e função do músculo cardíaco. De acordo com Segura et al (2014), essa proteína é a responsável pelo alinhamento dos miócitos, pela transmissão de força entre as unidades contráteis, além da transferência de sinais célula à célula. A deposição inadequada de colágeno leva, portanto a uma desorganização da estrutura miocárdica que, ocasiona uma alteração da estrutura celular, por meio de vias de sinalização, e, macroscopicamente, a uma alteração da geometria e função cardíaca. No presente estudo, como esperado, observouse um aumento da fibrose não subendocárdica e, principalmente, da subendocárdica, em áreas remotas ao infarto nos grupos infartados, em relação ao grupo controle. Não havendo diferença entre os grupos infartados. Dessa forma, intervenções que possam modular a deposição desorganizada do colágeno no interstício miocárdico, ou seja, a fibrose, podem promover a proteção das alterações da geometria e da função cardíaca (Frantz, 2009). Não foi observada atenuação na extensão do infarto, visto que o tamanho da região infartada, obtido por ecocardiografia e confirmado por morfometria, foi semelhante entre os grupos tratado e não tratado com vitamina E associada a nanopartícula lipídica. Porém, o ecocardiograma mostrou que, no grupo não tratado a extensão do infarto foi maior após 6 semanas, quando comparado ao grupo tratado com a vitamina E associada a nanopartícula lipídica.

Como esperado, os grupos infartados apresentaram um diâmetro maior em comparação ao grupo não infartado, indicando a hipertrofia dos miócitos. A expansão do ventrículo esquerdo ocorreu, expressivamente, nos grupos infartados quando comparado ao grupo controle. O grupo infartado tratado com a vitamina E associada a nanopartículas lipídicas obteve valores intermediários, embora sem diferença estatística, entre o grupo não infartado e o grupo infartado sem tratamento. Esse fato em conjunto com o dado mostrado pelo ecocardiograma, quanto a extensão do infarto após o tratamento, podem

ser um indicativo de que, de alguma forma, a vitamina E interfira positivamente no processo de remodelamento. Cabe ressaltar que existem outros mecanismos que podem participar do processo de remodelamento ventricular que não foram avaliados neste trabalho. Neste sentido, são necessários mais estudos sobre a ação da vitamina E no modelo do infarto para melhor entendimento de seu papel nessa agressão e talvez, em tempos diferentes de tratamento, ou até mesmo em uma fase antecedente ao infarto, com a hipótese de minimizar os possíveis danos causados pelo remodelamento.

## 6 Conclusão

No presente estudo, não foram evidenciados efeitos protetores ou atenuantes da vitamina E associada à nanopartículas lipídicas, quanto à morfologia cardíaca, função ventricular, extensão do infarto, hipertrofia dos miócitos, fibrose e perfil hemodinâmico pós infarto do miocárdio, neste modelo experimental.

### 7 Referências Bibliográficas

Ades A; Carvalho JP; Graziani SR. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol.* 82(1):84–87, 2001.

Angelis, K; Santos, MSB; Irigoyen, MC. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. Revisão. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* - Ano XIII nº 03 Set/Out/Nov/Dez 2004.

Antoniades, C; Tousoulis, D; Tentolouris, C; Toutouzas, P; Stefanadis, C. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. Herz. v.28(7), p.628-638, 2003.

Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling. Review. *Circ J.*77:580-7, 2013.

Ardisson LP, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, Santos PP, Assalin HB, Novo R, Novelli EL, Sant'ana LS, Paiva SA, Zornoff LA. Influence of AIN-93 diet on mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*.156(3):265-9,2012.

Ashrafian, H; Frenneaux, MP; Opie, LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*. v.116, p.434-448, Jul, 2007.

Bettencourt, P; Ferreira, A; Sousa, T; Ribeiro, L; Brandão, F; Polónia, J. Brain natriuretic peptide as a marker of cardiac involvement in hypertension. *J Cardiol*, v. 69, p.169-177, Mai. 1999.

Bitu-Moreno J; Gregório Ea; Maffei FH. Effect of alpha-tocopherol on the ischemia/reperfusion lesions induced in the hind limb of rats. *Acta Cir Bras*;16:68-74, 2001.

Black, TM; Wang, P; Maeda, N; Coleman, RA. Palm tocotrienols protect ApoE+/- mice from diet-induced atheroma formation. *Journal of Nutrition*. v.130, p.2420–2426, Out. 2000.

Blankesteijn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutiens JP, Daemen MJ, Smits JF. Dynamic of cardiac wound healing following myocardial infartion: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*.173:75-82, 2001.

Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation*. 106:2351-57, 2002.

Bozkurt, B; Kribbs, SB; Clubb, FJ; Michael, LH; Didenke, VV; Hornsby, PJ. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97, 1382–1391, 1998.

Broberg CS; Pantely GA; Barber BJ. Validation of the myocardial performance index by echocardiography in mice: a noninvasive measure of left ventricular function. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 16:814-823, 2003.

Chae, CU; Albert, CM; Moorthy MV; Lee, I-MIN; Buring JE. Vitamin E Supplementation and the Risk of Heart Failure in Women. *Circ Heart Fail.* 5:176-182, 2012.

Cohen CR. Papel das espécies reativas de oxigênio na hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Hospital das clínicas de Porto Alegre. 2011.

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*. 35: 569-82, 2000.

Cowley Jr AC, Franchini KG. Autonomic control of blood vessels. In: Robertson D, ed. Primer on the Autonomic Nervous System. San Diego, CA: Academic Press, Inc. pp.49-55, 1996.

Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens medicina veterinária. São Paulo: Roca. Seção 5: p.432-474, (ed.) 2007.

Fard, A; Wang CY; Takuma S; Skopicki HA; Pinsk DJ; Di Tullio MR; Homma S. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 13:582-587, 2000.

Ficker, ES, et al. Use of cholesterol-rich nanoemulsions as vehicles for alphatocopherol reduces atherosclerotic lesion in the rabbit. In: European Society Cardiology Congress. Estocolmo. European Heart Journal, 2010. v. 31. p. 1025, 2010.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1):497-509, 1957.

Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med*.110:37S-46S, 2001.

Frantz S Bauersachs J, Ertl G. Post -infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res.*81(3):474-81, 2009.

Gey, K.F.; Moser, U.K.; Jordan, P. 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.* v.57,p.787S,1993.

Ginsburg, GS; Small, DM; Atkinson, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, v. n.14, p.8216-8227, Jul. 1982.

Graziani SR, Maranhão RC, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49(6):487-98. Jun. 2002.

Grieve, DJ; Byrne, JA; Cave, AC; Shah, AM. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart Lung Circ*. V.13, p.132-138, Jun. 2004.

Gutterman, DD. Silent myocardial ischemia. *Circ. J.* v. 73, p. 785-797, Mai. 2009.

Halliwell B, Aruoma OI, Wasil M, Gutteridge JM. The resistance of transferrin, lactoferrin and caeruloplasmin to oxidative damage. Biochem J. 256(1):311-2, 1988.

Hense, HW.; Stender, M.; Bors, WL. Lack of an association between serum vitamin E and myocardial infarction in a population with high vitamin E levels. *Atherosclerosis*,v.103,p.21-28,1993.

Hirata RD; Hirata MH; Mesquita CH; Cesar TB; Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta.* v.29, p.1437(1):53-62, 1999.

Hungria VT; Latrilha MC; Rodrigues DG; Bydlowski SP; Chiattone CS; Maranhão RC. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for treatment of the disease. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53:51–60, 2004.

Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*.41:1127-32, 1978.

Johns, TN; Olson, BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*, v.140, n.5, p.675-682, 1954.

Kanaan, S; Horstmann, B. **Infarto Agudo do Miocárdio**. 1ª edição. Editora Rubio; n.p. 78, 2006.

Kardinaal, A.F.M.; Kok, F.J.; Ringstad, J. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *Lancet*, v.342, p.1379–1384, 1993.

Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med.* 90:361-69, 2012.

Kenneth, L. J. Antioxidant effects of tocotrienols in patients with hyperlipidemia and carotid stenosis. **Lipids**, v.30(12), p.1179-1183, 1995.

Koike, MK; Frimm CC; Cúri, M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction. *Int J Exp Pathol*; 88(4):279-90, 2007.

Lang RM, Bierig M, Devereaux RB, 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.* 18: 1440-63, 2005.

Lehr, HA; Messmer, K. Rationale for the use of antioxidant vitamins in clinical organ transplantation. **Transplantation.** V.62, n.9, 1996.

Li, F; Tan, W; Kang, Z; Wong, CW. Tocotrienol enriched palm oil prevents atherosclerosis through modulating the activities of peroxisome proliferators-activated receptors. *Atherosclerosis*, 2010.

Lonn E; Bosch J; Yusuf S; Sheridan P; Pogue J; Arnold JM; Ross C; Arnold A; Sleight P; Probstfield J; Dagenais GR; Hope and Hope-too Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*.293:1338 –1347, 2005.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrientes. *Clinical Nutrition*, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey USA. 1(6):441-5, 1987.

Mann, DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol*, v.65, p.81-101, 2003.

Maranhão RC; Tercyak AM; Redgrave TG. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. V.12, p.875(2):247-55, 1986.

Maranhão, RC; Cesar, TB; Pedroso-Mariani, S; Hirata, MH; Mesquita, CH. Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*, v.28, p.691-6, 1993.

Maranhão RC; Garicochea B; Silva EL; Dorlhiac-Llacer P; Cadena SM; Coelho IJ; Meneghetti JC; Pileggi FJ; Chamone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Research* 54:4660-4666, 1994.

Maranhão RC; Roland IA; Toffoletto O; Ramires JA; Goncalves RP; Mesquita CH; Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. *Lipids* 32:627-633, 1997.

Maranhão RC; Graziani SR; Yamaguchi N. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49(6):487–498, 2002.

Maranhão, RC; Tavares, ER; Padoveze, AF; Valduga, CJ; Rodrigues, DG.; Pereira, MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis*. v.197, p. 959–966, 2008.

Marchioli R; Levantesi G; Macchia A; Marfisi RM; Nicolosi GL; Tavazzi L; Tognoni G; Valugussa F; GISSI-Prevenzione Investigators. Vitamin E increases the risk of developing heart failure after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *J Cardiovasc Med(Hagerstown)*.7:347–350, 2006.

Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, et al. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol.* 279: 1534-9, 2000.

Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima AR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SA, Zornoff LA. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol.* 151(2):242-3; 2011.

Opie LH; Commerford PJ; Gersh BJ; Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*.367:356–367, 2006.

Pace D; Campos AC; Graf R. Effect of antioxidants (vitamin C, vitamin E and Gingko biloba) on the viability of dorsal skin flaps in rats. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.*; 21(2): 77-81, 2006.

Padoveze AF; Maniero F; Oliveira TV; Vitorio TS; Couto RD; Maranhão RC. Effect of a cholesterol-rich diet on the metabolism of the free and esterified cholesterol components of a nanoemulsion that resembles LDL in rabbits. *Braz J Med Biol Res.* 42(2):172–178, 2009.

Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.* (2):178-93, 1986.

Pagani M, Pizzinelli P, Furlan R, Guzzetti S, Rimoldi O, Sandrone G. Effects of verapamil, nifedipine, and dilazep on left ventricular relaxation in the conscious dog. *Cardiovasc Res.* 21(1):55-64, 1987.

Pelaquim H; Bezerra ES; Amstalden A; Chiarelli L; Ferreira FT; Dambros M; Bisogni S. Baixos níveis de testosterona induzem a geração de radicais livres e apoptose no esfíncter anal - Estudo experimental em ratos machos. Serviço de Urologia, Hospital Municipal Dr. Mario Gatti, Campina/SP, Brasil. *UROD A*; 21(3):169-178,2008.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*; 81:1161-72, 1990.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* 57: 84-95, 1985.

Piedade, MCB. Avaliação histopatológica dos efeitos da terapia ultra-sônica pulsada na reparação de lesão por laceração em músculo gastrocnêmio de rato. [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. 81p; 2006.

Pinheiro KV; Hungria VT; Ficker ES; Valduga CJ; Mesquita CH; Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol*.57(5):624–630, 2006.

Pinho, CA. Efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico sobre metabolismo oxidativo ventricular em ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio. [Dissertação]. Universidade do estado de Santa Catarina – UDESC centro de educação física, fisioterapia e desportos – CEFID programa de pósgraduação em ciências do movimento humano, 2011.

Pires LA; Hegg R; Valduga CJ; Graziani SR; Rodrigues DG; Maranhão RC. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 63(2):281–287, 2009.

Qu P; Hamada M; Ikeda S; Hiasa G; Shigematsu Y; Hiwada K. Time-course changes in left ventricular geometry and function during the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research*. 23:613-623, 2000.

Queshi, A. Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids*, v.30(12), p.1171-1177, 1995.

Redgrave TG; Maranhao RC. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochim Biophys Acta.* v.14, p.835(1):104-12, 1985.

Rocha JA. Interação da atividade autonômica e resposta imunomoduladora na fase aguda do infarto do miocárdio experimental. São Paulo, 2013.

Rodrigues DG; Maria DA; Fernandes DC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 55(6):565–576, 2005.

Santos MHH. O processo inflamatório após indução de infarto agudo do miocárdio é atenuado por treinamento físico prévio em ratos: análise dos mecanismos de cardioproteção induzida com o exercício. [Tese]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2009.

Schiller NB; Acquatella H; Ports TA; Drew D; Goerke J; Ringertz H; Silverman NH; Brundage B; Botvinick EH; Boswell R; Carlsson E; Parmley WW. Left ventricular volume from paired biplane two-dimensional echocardiography. *Circulation*.60:547-555,1979.

Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev.*;19(2):173-82,2014.

Sen, CK; Khanna. S; Roy, S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols, life sciences natureceuticals (natural products), nutraceuticals, herbal botanicals, and psychoactives: drug discovery and drug–drug interactions. *Nutraceuticals Herbals and Related Products*. v.78, p.2088–2098, 2006.

Shargorodsky, M; Debby, O; Matas, Z; Zimlichman, R. Effect of long-term treatment with antioxidants (vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10 and selenium) on arterial compliance, humoral factors and inflammatory markers in patients with multiple cardiovascular risk factors. *Nutrition & Metabolism.* v.7, p.55, 2010.

Silva, BDA. Vitamin E: characterization of the biological activity and relation with the nuclear receptor PPARy. p.94 Rio de jan. 2007.

Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, et al. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. J Card Fail. 5: 213-23, 1999.

Street, D.A.; Comstock, G.W.; Salkeld, R.M.. Serum antioxidants and myocardial infarction: are low levels of carotenoids and alpha tocopherol risk factors for myocardial infarction? Circulation, v.90, p.1154–61, 1994.

Tavares ER; Freitas FR; Diament J; Maranhão RC. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. *Int J Nanomedicine*. 6: 2297–2304, 2011.

Teixeira RS; Curi R; Maranhão RC. Effects on Walker 256 tumor of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). *J Pharm Pharmacol*. 56(7):909–914, 2004.

Watson LE; Sheth M; Denyer R; Dostal DE. Baseline echocardiographic Values for adult male rats. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 17:161-167, 2004.

Zornoff, L; Spadaro, J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol.* v.68, p.453-460, 1997.