

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu**

INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE CHÁ VERDE NA REMODELAÇÃO CARDÍACA APÓS O
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.

Beatriz Helena Borges Lustosa

**BOTUCATU
2013**

Beatriz Helena Borges Lustosa

INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE CHÁ VERDE NA REMODELAÇÃO CARDÍACA APÓS O
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em “Fisiopatologia em Clínica Médica” da
Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Co-orientador: Prof. Adj. Dr. Leonardo A. M. Zornoff

BOTUCATU
2013

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

*Aos meus pais, **Divanildo e Maria de Lourdes**,
primeiros a lançarem as sementes do respeito e da
educação, sempre me ensinando os valores e os princípios
que conduzem a minha vida. O amor de vocês me
fortalece e me dá segurança para seguir em frente! Tudo
o que sou e conquisto, devo a vocês!*

*A minha irmã, **Rachel**, companheira e cúmplice,
que sempre está ao meu lado, me apoiando com
muito amor e carinho. Você é essencial na minha
vida!*

*Ao meu noivo, **Cristiano**, “... luz aos meus olhos e chão
aos meus pés...” pela nobreza de caráter, sempre
companheiro e compreensivo. Te amo!*

*Aos meus queridos avôs, **Antônio e Virgília** (in
memoriam) e **Assú e Irene** (in memoriam),
sinônimos de amor, dedicação e saudade.*

*Aos meus queridos amigos e conselheiros, **Maíu e Seu
Antônio**, pelo amor e luz além dos tempos. Obrigada!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao mestre Jesus por me dar força interior para superar as dificuldades da vida, mostrando sempre os melhores caminhos a seguir nas horas incertas.

Ao Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla, pela competência na orientação, respeito, dedicação, paciência, por acreditar na minha capacidade e pelos valiosos ensinamentos. A senhora foi fundamental no meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao Prof. Adj. Dr. Leonardo A. M. Zornoff, pela competência e incentivo. Muito obrigada pela atenção e auxílio nos momentos necessários.

Aos queridos amigos Elenize e Corina, sempre dispostos e prontos a ajudar no que fosse preciso. Vocês foram essenciais na finalização deste trabalho. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna e companheiros do seu grupo, Loreta, Dijon, Adriana, Carlos, Paulinha, Dani Vileigas, Carol Adorni, Carol Mazeto, André, Ana Paula, Nascimento, Sílvio, pelos auxílios e esclarecimentos. Obrigada!

A amiga Danielle, “companheira de biotério”, pela amizade construída e por sempre me ouvir com o coração. Períodos difíceis vividos com muita alegria.

Aos companheiros do Laboratório de Eletroforese, Diego, Priscila, Andrea e Bruna pelos ensinamentos e auxílios nas técnicas necessárias.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, Maria Teresa, Regiane, Miriane, Renata, Sandro, Aline, Camila Bonomo, Paula, Luana, Camila Moreno, Rodrigo, Marcelo e Ricardo. Obrigada pelos momentos de descontração vividos dia a dia.

A Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes e ao Prof. Dr. Marcos Minicucci, pela atenção e valiosas sugestões prestadas na qualificação.

Aos amigos e funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica, José Carlos Georgette, Marcelle, Elizete, Mário, Sueli, Camila, Paulo, Renata, José Aparecido, Ângelo, Rogério, De Lalla, Diego, Eduardo, pela agradável convivência, colaboração e amizade conquistada.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, Ana Maria Mengue, Mario Augusto Dallaqua, Bruno José Fajiolli, Alexandre Luis Loureiro, Laura Andrade Câmara, Renato Borges Pereira, Elisângela Aparecida da Silva Pílan, por todos os auxílios prestados.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação, Regina Célia Spadin, Andrea P. Longo Devidé, Diego C. Bovolim de Oliveira, Lillian C. Nadal Bianchi, Janete Ap. Herculano Nunes Sieva, Márcia Ferreira de Freitas Quadros, pela paciência e eficiência nas soluções de problemas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Mestrado e por viabilizar a realização deste estudo. Muito obrigada!

A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

*“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo...
Qualquer um pode recomeçar agora e
fazer um novo fim!”*

(Chico Xavier)

RESUMO

Um dos mecanismos que explica como o infarto agudo do miocárdio (IAM) evolui para insuficiência cardíaca é denominado de remodelação ventricular. Dentre as inúmeras alterações bioquímicas associadas ao processo destaca-se o estresse oxidativo.

O consumo habitual do chá verde (CV) é associado a benefícios à saúde, devido às suas propriedades, antioxidante, antiinflamatória, antiapoptótica, antiproliferativa, antimutagênica. Estas são atribuídas às catequinas, seu composto bioativo. Portanto, é possível que o extrato de chá verde atenuar alguns parâmetros envolvidos na remodelação cardíaca. O objetivo do trabalho foi avaliar se o extrato de chá verde atenua a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio.

Para tanto foram utilizados ratos Wistar machos divididos em quatro grupos: controle padrão (CP) (28-sham); extrato do CV (CV) (32-sham e extrato de chá verde); infarto padrão (IP) (25-animais infartados controles); infarto e extrato do CV (ICV) (26-animais infartados e extrato do CV). Ecocardiografia inicial foi realizada após cinco dias ao IAM. A partir de uma divisão homogênea dos animais, considerando o tamanho do infarto maior a 35%, iniciou-se o tratamento. Ao final de três meses estes animais foram estudados por meio de ecocardiografia, morfometria, dosagens bioquímicas de enzimas do estresse oxidativo, metabolismo energético, perfil lipídico sérico, inibidor tecidual de metaloprotease (TIMP-1) e zimografia para atividade das metaloproteases (MMP-2 e MMP-9).

Nos resultados, observou-se aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo peso corporal, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo pelo peso corporal e diâmetro do átrio esquerdo pelo peso corporal nos grupos com IAM, mas houve atenuação nos ICV. O tempo de desaceleração da onda E foi reduzido no IP, o que não foi observado no ICV, tendo valor similar ao CV. O extrato de CV também

normalizou as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no grupo ICV, quando comparado ao IP. Em relação ao metabolismo energético, o grupo ICV apresentou aumento da atividade das enzimas da via glicolítica: fosfofrutoquinase e piruvato desidrogenase, comparado ao grupo IP. Sendo assim, é possível que no grupo ICV, a via glicolítica tenha fornecido quantidade adequada de prótons para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, reduzindo o estresse oxidativo gerado na mitocôndria, pelo IAM. Houve melhora de todas as variáveis do perfil lipídico nos grupos tratados. O estudo não mostrou diferença significativa das MMPs, contudo o TIMP-1 aumentou no ICV. Portanto, o extrato de chá verde atenuou alguns parâmetros da remodelação cardíaca e melhoraram a função ventricular, após o IAM em ratos. Neste estudo, os mecanismos do processo de remodelação, que sofreram influência benéfica do extrato do CV foram estresse oxidativo, metabolismo energético, hipertrofia excêntrica e TIMP-1.

Palavras chave: Infarto agudo do miocárdio, remodelação cardíaca, extrato de chá verde, rato.

ABSTRACT

One mechanism that explains how acute myocardial infarction develops into heart failure is called ventricular remodeling. Among the many biochemical changes associated with the process stands oxidative stress.

The regular consumption of green tea (GT) is associated with health benefits due to its properties such as antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic, antiproliferative, antimutagenic. These are attributed to catechins, its bioactive compound. Therefore, it is possible that GT extract mitigate some parameters involved in cardiac remodeling. The objective of this study was to assess whether the green tea extract attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction.

For both, male Wistar rats were allocated in 4 groups: control (C-28 sham); green tea extract (GT-32 sham and GT); infarction group (MI-25 infarcted animals controls); infarction and green tea extract (IGT-26 infarcted animals and GT). To start the treatment an initial echocardiography was performed five days after the myocardial infarction, from a homogeneous division of the animals, considering the size of the infarction greater than 35%. At the end of three months these animals were studied by echocardiography, morphometry, biochemical enzyme of the oxidative stress, energy metabolism, lipid profile, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) and zymography for activity of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9).

The results showed an increase in left ventricular diastolic diameter by body weight, left ventricular systolic diameter by body weight and left atrial diameter by body weight in groups with MI, but there was attenuation in IGT. The deceleration time of the E wave was reduced in MI, which was not observed in IGT, with a value similar to GT group. GT extract also normalized the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in the IGT group, when compared to MI. Regarding

energy metabolism, the IGT group showed increased activity of enzymes of the glycolytic pathway: phosphofruktokinase and pyruvate dehydrogenase, compared to MI group. Therefore, it is possible that in the IGT group, the glycolytic pathway has provided appropriate amount of protons to the electron transport chain in mitochondria, reducing the oxidative stress generated in the mitochondria, by myocardial infarction. There was improvement in all lipid profile in the treated groups. The study showed no significant difference of MMPs, however TIMP-1 increased in IGT. Therefore, the green tea extract eased some parameters of cardiac remodeling and improved left ventricle function after myocardial infarction in rats. In this study, the mechanisms of the remodeling process, which suffered beneficial influence of green tea extract were oxidative stress, energy metabolism, eccentric hypertrophy and TIMP-1.

Keywords: myocardial infarction, ventricular remodeling, green tea extract, rat.

SUMÁRIO

1-) Introdução.....	12
2-) Objetivo.....	22
3-) Material e Métodos.....	24
3.1.) Delineamento.....	25
3.2.) Infarto Experimental.....	26
3.3.) Avaliação Funcional “ <i>in vivo</i> ”	27
3.4.) Pressão Arterial Caudal.....	28
3.5.) Parâmetro Morfométrico.....	28
3.6.) Estresse Oxidativo e Metabolismo Energético.....	28
3.6.1.) Estresse oxidativo.....	29
3.6.2.) Metabolismo Energético.....	29
3.7.) Perfil Lipídico Sérico.....	31
3.7.1.) Determinação da Concentração de Triacilgliceróis.....	31
3.7.2.) Determinação da Concentração do Colesterol Total.....	31
3.7.3.) Determinação da Concentração de HDL Colesterol.....	31
3.7.4.) Determinação da Concentração de LDL e VLDL Colesterol.....	31
3.8.) Dosagem do TIMP-1.....	31
3.9.) Avaliação da atividade de Metaloproteases.....	32
4-) Forma de Análise dos Resultados.....	33
5-) Resultados.....	34
6-) Discussão.....	49
7-) Conclusão.....	57
8-) Referências.....	59

INTRODUÇÃO

1-) INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma das síndromes mais prevalentes no mundo. Estima-se que 1 a 2% da população mundial seja portadora deste distúrbio. Aproximadamente 2/3 das IC são causadas pela doença arterial coronariana (DAC) (MC MURRAY, 2010), sendo o IAM a forma mais grave da DAC (LAMAS, 2010).

Após o IAM ocorrem alterações complexas na arquitetura ventricular, envolvendo tanto a região infartada quanto a não infartada. Na fase aguda, a região infartada caracteriza-se por necrose de miócitos, resposta inflamatória para reparar o dano, ativação de metaloproteases (MMPs) e deposição de colágeno rígido, formando então a fibrose. A região não infartada é caracterizada principalmente, pelo alongamento e deslizamento dos miócitos remanescentes.

Na fase crônica, o coração continua a sofrer alterações bioquímicas, celulares, intersticiais e moleculares, que mudam as características das cavidades cardíacas resultando em disfunção ventricular. Estas adaptações, aguda ou crônica, são chamadas de processo de remodelação cardíaca (COHN *et al*, 2000).

Dentre as alterações bioquímicas que acompanham o IAM, o aumento do estresse oxidativo e mudanças no metabolismo energético são de grande importância. O insulto isquêmico tem um grande impacto sobre a remodelação do coração, devido à falta de oxigênio que favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e menor transporte de energia para a contração miocárdica (GIORDANO, 2005). O oxigênio é o receptor final no transporte de elétrons. Quando não há oxigênio suficiente, a doação de elétrons fica prejudicada, favorecendo seu desemparelhamento e consequentemente a formação de EROS. Além disso, na ausência de transporte de elétrons adequado, a demanda de energia cardíaca não é suprida (GIORDANO, 2005).

Em relação ao estresse oxidativo, o equilíbrio entre a formação de EROS e sua remoção por sistemas antioxidantes acontece em situações normais e é chamado de estado de oxi-redução. O aumento do estresse oxidativo ocorre quando existe excesso de produção de EROS em relação à atividade dos antioxidantes (TSUITSUI *et al*, 2011). As EROS são átomos ou moléculas com elétrons desemparelhados, altamente reativas e que podem facilmente participar de uma variedade de reações bioquímicas.

Cada átomo de oxigênio contém dois elétrons desemparelhados em sua camada mais externa. A doação de um único elétron para o oxigênio molecular (O_2) resulta na formação de superóxido O_2^- . A doação do próximo elétron proveniente do hidrogênio forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode ser neutralizado em $H_2O + O_2$, pela ação da enzima antioxidante catalase, ou ainda, pode continuar a produzir EROS participando da reação de Fenton formando assim, radical hidroxila ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$), o qual é altamente reativo. Por fim, a doação de outro elétron na reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2 \bullet^- \rightarrow \bullet OH + OH^- + {}^1O_2$) forma o oxigênio singlete (1O_2), uma forma de vida muito curta e reativa de oxigênio molecular, em que os elétrons exteriores são elevados a um alto estado de energia (GIORDANO, 2005).

As EROS participam do processo de remodelação cardíaca de diversas maneiras. Uma delas é pelo dano à membrana plasmática, formando hidroperóxidos de lipídeos (HP). Outras maneiras são participando das vias de sinalização da hipertrofia cardíaca, apoptose, ativação de MMPs, entre outros.

Quanto à hipertrofia e apoptose, as EROS modulam a atividade de fatores transcricionais, como o NF- κ B. Em vigência ao aumento do estresse oxidativo existe uma degradação maior do fator inibitório (I κ B), favorecendo as ativações do NF- κ B e

da fosforilação da MAPKinase p38, o que leva à apoptose e à hipertrofia dos miócitos (GIORDANO, 2005; FERRARI, 2009).

As MMPs são enzimas com propriedades proteolíticas secretadas nas formas inativas e ativadas no tecido após a transcrição. Tanto a expressão quanto a ativação das MMPs, são em grande parte, dependentes das EROS. A participação dessas enzimas na remodelação da matriz extracelular se dá na degradação do colágeno mais elástico e no favorecimento da formação do colágeno mais rígido, o que forma a fibrose. Além disso, as MMPs participam da migração, ativação e proliferação celular e também podem induzir a apoptose (GIORDANO, 2005; TSUTSUI *et al*, 2011).

Quanto ao metabolismo energético cardíaco, são evidentes as alterações na utilização de substratos, na geração e no transporte de energia para os tecidos. O coração normal utiliza principalmente ácidos graxos como fonte energética para a contração dos miócitos, de 60 a 90%. (LOPASCHUK *et al*, 2010).

Várias reações enzimáticas configuram o metabolismo energético cardíaco normal. A figura 1 mostra que os ácidos graxos sofrem beta-oxidação pela ação de quatro enzimas, dentre elas a 3-hidróxiacil coenzima A desidrogenase, gerando a acetil-Coenzima A (acetil Co-A), NADH^+ e FADH_2 . A glicose é convertida em glicose 6-fosfato, em seguida em frutose 6-fosfato, que por ação da fosfofrutoquinase é convertida em frutose 1,6-difosfato, a qual em seguida gera piruvato. Este pode formar acetil-CoA por ação da piruvato desidrogenase, mas também pode ser convertido em lactato pela lactato desidrogenase. A acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico e sofre ação inicialmente da citrato sintase. As reações deste ciclo geram mais NADH^+ e FADH_2 . Estas transportam elétrons, por meio dos complexos I ao IV, na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (LOPASCHUK *et al*, 2010).

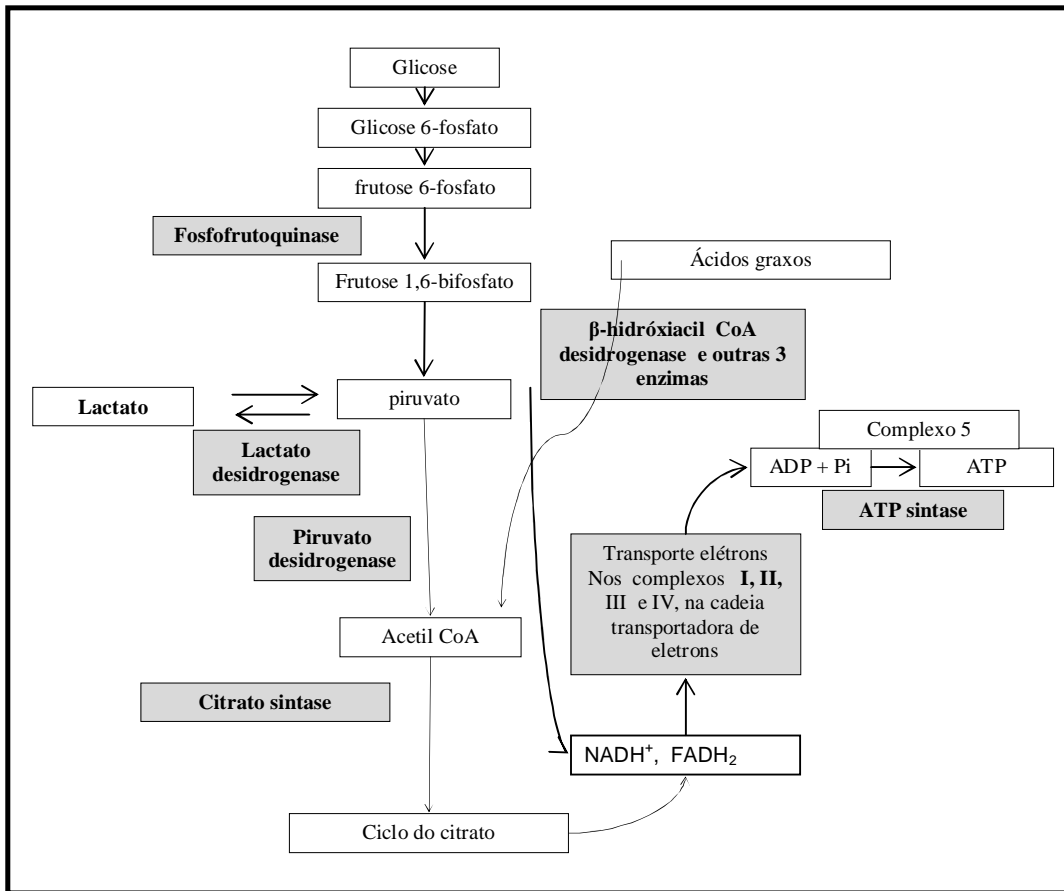


Figura 1. Reações enzimáticas e transporte de elétrons em condições cardíacas normais.

Este fluxo de elétrons gera gradiente de prótons necessários para que a adenosina difosfato (ADP) + fósforo inorgânico (Pi) formem ATP através da atividade da ATP sintase, no complexo 5. Os receptores finais dos elétrons são moléculas de oxigênio que vão ser convertidas em H₂O. A ATP é transferida para a creatinaquinase formando fosfo-creatinoquinase (CK-PCr), o qual é o transportador de energia para as células, como por exemplo, os miócitos. Neles, a ATP é clivada em ADP + Pi pela ATPase liberando energia necessária para contração (LOPASCHUK *et al*, 2010).

Durante o início do processo de remodelação, para se proteger, o coração passa a utilizar mais glicose e menos ácidos graxos. Entretanto, estes quando não são oxidados, são estocados no coração na forma de triacilgliceróis. Este processo é denominado lipotoxicidade, fazendo parte da disfunção miocárdica, que se desenvolve com o

decorrer do processo de remodelação. Além da mudança na utilização dos substratos, outro ponto importante no metabolismo energético cardíaco refere-se à mitocôndria. Durante o processo de remodelação ocorre redução da função e da massa mitocondrial, que resultam em alteração no transporte de elétrons. Esse transporte inadequado favorece o desemparelhamento de elétrons, com consequente formação de EROS, levando a uma menor geração de energia para a contração dos miócitos (LOPASCHUK *et al*, 2010; VENTURA-CLAPIER *et al*, 2011).

Assim, o estresse oxidativo participa da remodelação ativando algumas vias de sinalização, como, a hipertrofia, a apoptose e a fibrose. A hipertrofia de alguns miócitos e perda de outros por apoptose, associados ao aumento de fibrose, resultam em alterações no tamanho, forma, massa e geometria ventricular. Esse coração remodelado caracteriza-se, então, por ser dilatado, mais pesado e esférico, por apresentar produção de energia insuficiente, e consequentemente, por menor capacidade de relaxar e contrair, configurando a disfunção ventricular diastólica e sistólica, respectivamente (ZORNOFF *et al*, 2002; FERRARI *et al* 2009).

Nos últimos anos, muitos foram os avanços terapêuticos objetivando a contenção do processo de remodelação e o tratamento da IC. Entretanto a mortalidade por esta causa é de aproximadamente 30%, considerada ainda bastante elevada (MC MURRAY, 2010). Portanto, é importante o estudo de compostos medicamentosos e nutricionais, potencialmente benéficos ao coração que possam melhorar o prognóstico da doença cardiovascular atenuando o processo de remodelação.

O chá verde (*Camellia sinensis*), uma das bebidas mais populares no mundo, tem seu consumo habitual associado a benefícios à saúde, principalmente em relação às doenças cardiovasculares e ao câncer. Nos países asiáticos, onde beber o chá é um hábito cultural de quatro mil anos, estudos epidemiológicos mostram menor incidência

de certos tipos de cânceres e doenças cardiovasculares. Muitas destas doenças estão associadas ao estilo de vida ocidental, especialmente quando relacionadas à dieta (ZIEGLER *et al*, 1993; KOLONEL *et al*, 2004).

A maior parte dos efeitos benéficos do chá verde é atribuída aos seus flavonóides polifenólicos, conhecidos como catequinas (GRAHAM, 1992). Os compostos polifenólicos são metabólitos secundários presentes em várias plantas e são considerados componentes importantes na dieta de humanos e outros animais (BRAVO, 1998; CHUNG *et al*, 1998; CROZIER *et al*, 2000).

Quimicamente, as catequinas são polihidroxiadas, solúveis em água com características que diferem no número e posição na molécula quanto aos grupos hidroxila (HARBORNE, 1999).

As principais catequinas do chá verde são epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina 3-galato (ECG) e epigalocatequina 3-galato (EGCG), sendo que esses polifenóis são responsáveis por até 40% do peso seco no chá verde (GRAHAN, 1992).

A biodisponibilidade das catequinas do chá verde, em seres humanos, é uma variável importante para a avaliação da sua atividade biológica nos tecidos alvo. A concentração de catequina no plasma aumenta de duas a quatro horas após o consumo do chá (HIGDON & FREI, 2003). No entanto, a biodisponibilidade foi relativamente baixa, sendo que as concentrações de EGCG e EGC representaram apenas 0,2% a 2% da quantidade ingerida pelos indivíduos saudáveis (NAKAGAWA *et al*, 1997).

Há evidências sugerindo que a absorção desses compostos é submetida à biotransformação extensa, incluindo metilação, glicuronidação, sulfatação e cisão do anel flavonoídico (KHAN & MUKHTAR, 2007). Mais de 80% das principais catequinas do chá são encontradas como conjugados no plasma e urina. Entretanto, estes

conjugados ainda contêm catecol e galato intactos, capazes de neutralizar superóxidos com a mesma eficácia de seus compostos originários (HARADA *et al*, 1999), sugerindo haver capacidade antioxidante de alguns metabólitos das catequinas (HIGDON & FREI, 2003). Além disso, mesmo a biodisponibilidade sendo considerada baixa, observou-se *in vivo* que a quantidade absorvida ainda foi suficiente para exercer efeitos benéficos quanto aos parâmetros cardiovasculares (ERDMAN *et al*, 2007).

Estes efeitos atribuídos ao chá verde devem-se, em grande parte, por sua ação antioxidante. Os compostos polifenólicos têm estrutura ideal para combater os radicais livres e têm se mostrado antioxidantes mais eficazes *in vitro* do que as vitaminas E e C (RICE *et al*, 1996).

Dentre as propriedades antioxidantes das catequinas destacam-se: a detoxificação de espécies reativas de oxigênio, a inibição de fatores de transcrição redoxi sensíveis, o efeito quelante de atividade redoxi, a inibição de enzimas pró-oxidantes e a indução de produção de enzimas antioxidantes (VELAYUTHAM *et al*, 2008). Estudos prévios mostraram que o chá verde aumentou as defesas antioxidantes e reduziu formação de lipoperóxidos (RIETVELD & WISEMAN, 2003; CLEMENT, 2009). Há ainda, estudos *in vitro* e *in vivo*, que evidenciaram que as catequinas elevam os níveis das enzimas de fase dois, cuja expressão é regulada pelo Nrf2. Estas enzimas, por sua vez, protegem o organismo contra substâncias pró-oxidantes (AKHLAGHI & BANDY, 2010; NA & SURH, 2008).

Outras propriedades características das catequinas são atribuídas à sua ação antiinflamatória, por reduzir algumas citocinas e por modular a expressão do NFκB, bem como às ações, antitrombótica, antiapoptótica, antiproliferativa e antimutagênica, além de reduzir a oxidação e os níveis de LDL e a expressão de metaloproteases. (MADHAN *et al*, 2007, VELAYUTHAM *et al*, 2008).

Clinicamente, estudos observacionais mostram a possibilidade de que, os consumidores de chá verde, se beneficiem de seus efeitos contra alguns tipos de cânceres, obesidade e contra doenças cardiovasculares, reduzindo hipercolesterolemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (VELAYUTHAM *et al*, 2008; CLEMENT, 2009, JOCHMANN *et al*, 2008).

O impacto favorável do chá verde nas doenças cardiovasculares parece estar relacionado à ação das catequinas sobre o sistema vascular. As propriedades antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica, antiproliferativa e redutoras de LDL-colesterol conferidas ao chá verde, atenuam a aterogênese e melhoram a função endotelial (JOCHMANN *et al*, 2008).

Estudos observacionais sugerem que os chineses consumidores de 120ml/dia ou mais de chá verde por um ano, apresentam proteção contra desenvolvimento de hipertensão arterial (YANG *et al*, 2004, JOCHMANN *et al*, 2008). Observou-se ainda que os antioxidantes do chá verde inibem a oxidação do LDL-colesterol, contribuindo para a redução do risco de doença cardíaca em consumidores desse produto (HERTOG *et al*, 1995; IMAI & NAKACHI, 1995).

Apesar dos estudos apontarem para os potenciais efeitos benéficos do chá verde no sistema vascular, pouco se sabe sobre as ações deste composto diretamente sobre o miocárdio (JOCHMANN *et al*, 2008).

Dentre os poucos estudos que avaliaram o papel do chá verde no miocárdio podemos destacar modelos de isquemia-reperfusão, miocardite e insuficiência renal crônica. Nestes observou-se que o chá verde melhorou o inotropismo, diminuiu inflamação e reduziu hipertrofia cardíaca, respectivamente (HSIEH *et al*, 2009; SUZUKI *et al*, 2007; PRYADARSHI *et al*, 2003).

Dessa forma, é possível observar que muitas das alterações bioquímicas que ocorrem no processo de remodelação, são potenciais sítios de ação das catequinas do extrato de chá verde. Considerando que esta erva exibe propriedades antioxidante, antiinflamatória, antiapoptótica e inibitória de metaloproteases, é possível então, que também atenuem o processo de remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio.

Considerando a alta prevalência e alta mortalidade atribuída à IC, o papel do IAM como uma das principais causas dessa síndrome, a necessidade de se estudar mecanismos e compostos nutracêuticos que possam conter o processo de remodelação cardíaca, atenuando assim, a evolução do IAM para IC, bem como, algumas das alterações decorrentes desse processo como sendo potenciais sítios de ação das catequinas do extrato de chá verde, exercendo então, papel benéfico ao coração, por atenuar o processo de remodelação, torna esse trabalho relevante.

OBJETIVO

2-) OBJETIVO

Avaliar se o extrato de chá verde atenua a remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio, por meio da avaliação de alguns parâmetros cardíacos envolvidos no processo de remodelação, por exemplo, alterações bioquímicas (estresse oxidativo e metabolismo energético), intersticiais (metaloproteases e inibidor tecidual de metaloprotease), morfométricas e funcionais.

MATERIAL E MÉTODOS

3-) MATERIAL E MÉTODOS

3.1.) Delineamento

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu (protocolo FMB-PE-73/2010).

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água, em ambiente climatizado, controle de luz (ciclos de 12 horas) e de temperatura (aproximadamente 25° C).

Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controle padrão: CP (28-sham), formado por animais não infartados e alimentados com ração comercial padrão; grupo controle extrato do CV: CV (32-sham), formado por animais não infartados e alimentados com ração comercial padrão acrescida de extrato de CV; grupo infarto padrão: IP (25-animais infartados controles), formado por animais infartados e alimentados com ração comercial padrão; grupo infarto extrato do CV: ICV (26-animais infartados e extrato de CV), formado por animais infartados alimentados com ração comercial padrão acrescida de extrato do extrato de CV. Os animais sobreviventes ao IAM começaram a receber a ração comercial padrão 48 horas após o procedimento, e, o estudo ecocardiográfico inicial foi realizado após cinco dias ao IAM. A partir de uma divisão homogênea dos animais, considerando o tamanho do infarto maior a 35% (MINICUCCI *et al*, 2011), iniciou-se a administração da ração acrescida do extrato de chá verde.

O extrato de chá verde utilizado foi o Polyphenon 60 (Sigma-Aldrich Canadá, Oakville, ON, Canadá) composto por 65,4% de catequinas, das quais 29,2% correspondem a galato de epigallocatequina, 21% epigallocatequina, 7,9% galato de

epicatequina e 7,3% epicatequina. A concentração utilizada foi de 0,25%, isto é, 2,5g de extrato de CV por quilo de ração. Considerando o consumo de ração do rato Wistar macho em torno de 30g/dia, cada animal teve uma ingestão equivalente de seis a sete copos de chá verde/dia em humanos de 60 kg (AKHALAGHI & BANDY, 2010).

Após três meses de observação os animais foram submetidos ao estudo morfométrico e funcional do coração, por meio de ecocardiografia. Em seguida, o sangue foi coletado e centrifugado para armazenamento do soro, no qual determinou-se o perfil lipídico, os corações foram dissecados e estudados quanto às variáveis morfométricas e bioquímicas, de estresse oxidativo, inflamação, apoptose e metaloproteases.

O tempo de observação e tamanho amostral foram definidos baseados em trabalhos anteriores (ZORNOFF *et al*, 2000). As descrições detalhadas destes processos seguem abaixo.

3.2.) Infarto Experimental

O IAM foi induzido de acordo com método descrito inicialmente por Heimburger e modificado por Pfeffer e colaboradores (HEIMBURGER, 1946; PFEFFER, 1979). Após anestesia com cloridrato de cetamina (70mg/kg) e xilazina 10 mg/kg, por via intramuscular, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e o 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado por compressão lateral do tórax e a artéria coronária esquerda ligada a, aproximadamente, 2 mm da origem, com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. Em seguida, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado. O pneumotórax foi aspirado com agulha de insulina. Utilizaram-se apenas os ratos com infarto maior que 35%.

3.3.) Avaliação Funcional “in vivo”

Depois de três meses de tratamento após o IAM, os animais dos quatro grupos foram submetidos ao estudo ecocardiográfico, segundo método descrito previamente (SAHN, 1978; SOLOMON, 1999; SJAASTAD, 2000). Resumidamente, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg), por via intramuscular, e após tricotomia da região anterior do tórax, foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. O ecocardiograma foi realizado com equipamento da Philips (modelo HDI 5000), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. O registro da imagem monodimensional, ajustada para a velocidade de 100 mm/s, foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co.

Todas as medidas foram efetuadas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography (LANG & BIERING, 2005) e já validadas no modelo de ratos infartados (SOLOMON, 1999). O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do VE (VEPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede posterior da cavidade. As áreas diastólicas (AD) e sistólicas (AS) do VE foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo longo e eixo menor. A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a fração de variação de área [$FVA=(AD-AS)/AD \times 100$], obtida pela média dos valores dos dois eixos (LANG *et al*, 2005). A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a fração de variação de área [$FVA=(AD-AS)/AD \times 100$] obtidas pela média dos valores dos dois eixos e pela porcentagem de encurtamento endocárdico ($\%Enc= [(DDVE - DSVE) / DDVE \times 100]$) (LANG *et al*, 2005).

3.4.) Pressão Arterial Caudal

Após o estudo ecocardiográfico, os animais foram submetidos à aferição da pressão arterial caudal. Para a medida da pressão arterial foi utilizado o sistema CODA 2, Multi-Channel, Computerized, Non Invasive Blood Pressure System for Mice and Rats (Software version: 1.4.0.2/Firmware version: 170). Os animais foram aquecidos e por meio de sensores posicionados na região proximal da cauda, foi possível obter o fluxo sanguíneo arterial. Este aparelho fornece automaticamente valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média.

3.5.) Parâmetro Morfométrico

Após o estudo funcional, foi realizado o estudo morfométrico, segundo técnica já padronizada (DOERING, 1998; MATSUBARA, 2000). Em seguida os corações que não foram utilizados no estudo funcional *in vitro* tiveram o VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice, em fragmento de 3 mm de espessura, que junto com a base e a ponta do VE foram congeladas a -80° C para as dosagens bioquímicas.

3.6.) Estresse Oxidativo e Metabolismo Energético

Amostras de aproximadamente 200 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 15 minutos a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, hidroperóxido de lipídios, atividade das enzimas antioxidantes e as do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial foi determinada após ressuspensão do *pellet* com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA e, centrifugação (10 000 rpm; 5 minutos), de acordo com técnica adaptada dos autores Cassina e Radi (1996). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca

(μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes são procedência da Sigma (St. Louis, USA).

Para determinar as proteínas totais empregou-se o método de Biureto, em que as ligações peptídicas das proteínas reagiram com íon cúprico, em meio alcalino, resultando em um complexo cor de violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteínas totais presentes na amostra (MOURA, 1982).

3.6.1.) Estresse Oxidativo

A atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathiona reduzida, azida sódica, EDTA, glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada, de acordo com Nakamura *et al* (1974). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH₂ e fenazina metassulfato (EWING & JANERO, 1995). A atividade enzimática da catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%) (AEBI, 1974). Leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca a 560nm. O hidroperóxido de lipídio (HP) foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe²⁺) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90%, segundo método descrito por (JIANG *et al*, 1991).

3.6.2.) Metabolismo Energético

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada de acordo com Wilkinson *et al* (1965) com a utilização do método UV otimizado, em que foi medido o consumo de NADH₂, que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra. A

atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂, segundo método descrito por Bass *et al* (1969). Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) determinou-se a atividade da piruvato desidrogenase (PI-DH), em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotretol, MgCl₂, NBT, piruvato de sódio e fenazina metassulfato, em que mediu-se a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD (BASS *et al*, 1969). A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase (CS), cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0 (BASS *et al*, 1969). A atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH) foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (BASS *et al*, 1969). A atividade da NADH-desidrogenase (complexo I) foi determinada pelo método de Singer (1984) em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, em que se monitorou a velocidade de oxidação do NADH. A atividade enzimática da succinato desidrogenase (complexo II) foi medida pelo método descrito por Fischer *et al* (1985) em meio a tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenazina metassulfato e DPIP, o qual teve absorbância a 600nm diminuída. A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase, segundo método (DESAI *et al*, 1996).

3.7.) Perfil Lipídico Sérico

3.7.1.) Determinação da Concentração de Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo Soloni (1971), o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

3.7.2.) Determinação da Concentração do Colesterol Total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colesterol-oxidase com hidrólise enzimática prévia dos ésteres mediante uma lipase. A água oxigenada liberada na oxidação produz fenol oxidado e 4-aminofenazona, catalisada pela peroxidase, com formação de quinonimina vermelha (MOURA, 1982).

3.7.3.) Determinação da Concentração de HDL Colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, encontram-se as lipoproteínas de alta densidade (HDL), onde se determinou o colesterol incorporado as mesmas (LOPES-VIRELLA *et al*, 1977).

3.7.4.) Determinação da Concentração de LDL e VLDL Colesterol

Os valores de LDL e VLDL-colesterol foram obtidos pela equação de Friedewald (COHN & ROTH, 1996).

3.8.) Dosagem do TIMP-1

Para extração da proteína do tecido cardíaco foi adicionado 1,5ml de tampão de extração (50mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3M sucrose; 0,5mM de DTT; 1mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3mM; NaF 10mM; e inibidor de protease 1:100) a 60mg de tecido cardíaco proveniente do septo interventricular. O material foi

homogeneizado por 10 segundos, duas vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 minutos a 4° C com 12.000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1mg/ml. Nesse extrato protéico foi avaliada a produção de inibidor tecidual de metaloprotease 1 (TIMP-1). Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-TIMP-1 de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS na concentração 2 g/mL e 4 g/mL respectivamente. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionado 300µL da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por duas horas, à temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por duas horas, à temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de TIMPs, diluídas na base dois em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-TIMP-1 de rato biotinizados na concentração 150ng/mL e 100ng/mL, durante duas horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluído 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492nm.

3.9.) Avaliação da Atividade de Metaloproteases

A atividade das metaloproteases dois e nove (MMPs) foram obtidas por zimografia, como descrito por Tyagi *et al*, (1993). Aproximadamente 30mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50mM Tris, pH 7,4; 0,2M NaCl; 0,1% Triton X and 10mM CaCl₂. Para cada 30mg de tecido foram adicionados 1,5ml deste tampão. As amostras foram diluídas em tampão

da amostra contendo 0,5M Tris, pH 6,8; 100% glycerol, and 0,05% bromophenol blue. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 8% e 1% de gelatina e a corrida foi feita utilizando aparato Bio-Rad mini-protean, a 80 V por 2 horas.

Após a corrida o gel foi lavado em 2,5% triton X-100, e então, lavado em tampão trisHCL 50mM pH 8,4 por 10 minutos. Em seguida o gel foi incubado *overnight* em tampão trisHCL 50mM pH 8,4 com 500mM de CaCl₂. Logo após o gel foi corado com coumassie blue 2,5% e descorado com solução 30% metanol e 10% ácido acético. As densidades ópticas das bandas, que indicam atividade das metaloproteases dois e nove, foram analisadas após os géis serem fotografados em UVP, UV, White Darkhon, pelo programa Gel-Pro 3.1 (TYAGI, *et al* 1993).

4-) Forma de Análise dos Resultados

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão, em relação às não paramétricas, os dados foram apresentados em mediana e percentis 25% e 75%. As comparações entre os grupos foram feitas pelo teste ANOVA de duas vias com complementação pelo teste de Tukey ou Holme-Sidak. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados não paramétricos foram normalizados para poderem ser comparados por ANOVA de duas vias.

RESULTADOS

5-) RESULTADOS

No presente estudo observou-se aumento do DDVE/PC e DSVE/PC nos grupos com infarto, porém houve uma atenuação naquele que ingeriu as o extrato de chá verde. O mesmo pôde ser observado quanto à AE/PC. Os dados das variáveis ecocardiográficas morfométricas estão presentes na tabela 1, gráficos 1 e 2.

Com relação às variáveis ecocardiográficas funcionais, o TDE diminuiu no IP e foi recuperado no ICV. A fração de variação de área foi reduzida nos grupos infartados. A porcentagem de encurtamento subendocárdico também diminuiu nos grupos infartados, apresentando contudo, recuperação no ICV. Os dados se encontram na tabela 2 e no gráfico 3.

No presente estudo observou-se aumento da atividade da SOD no grupo IP e redução no grupo ICV. Em relação à atividade da catalase houve redução no grupo IP, com recuperação da mesma no grupo ICV. Não houve diferenças na atividade da GSH-PX e na formação de HP. Os dados do estresse oxidativo estão presentes na tabela 3 e nos gráficos 4 e 5.

Quanto ao metabolismo energético, a PFK apresentou valor mais baixo no grupo IP, entretanto no grupo ICV foi recuperada. Com relação à LDH não houve mudanças. A PIDH apresentou valores aumentados somente nos grupos com ingestão das do extrato de chá verde. Observa-se que a ATP sintase teve sua atividade reduzida nos grupos infartados, contudo numericamente essa redução foi menor no grupo ICV. Com relação à CS, observa-se uma redução de atividade nos grupos com infarto, sendo recuperada no grupo ICV. A β -OH-acil-CoA-DH apresentou valores reduzidos nos grupos IP e ICV. O complexo I teve sua atividade diminuída nos grupos com infarto. Quanto ao complexo II não houve mudanças estatisticamente significantes. Os dados do metabolismo energético estão na tabela 4, gráficos 6, 7 e 8.

No presente estudo, ao analisarmos o perfil lipídico, observamos que o colesterol total aumentou nos grupos infartados sendo, porém, atenuado pela presença do extrato de chá verde na dieta do grupo ICV. Isto também foi observado entre os grupos CP e CV. O HDL diminuiu nos grupos com infarto, contudo essa queda foi atenuada no grupo tratado. Quanto ao LDL, observou-se valores elevados tanto no IP quanto no ICV, todavia a presença do extrato seco de chá verde atenuou este aumento. Observou-se também que a concentração de VLDL aumentou somente no grupo IP, uma vez que, a presença do extrato de chá verde manteve sua concentração no grupo ICV, próximo aos dados dos grupos CP e CV. Quanto aos triacilgliceróis, houve aumento nos grupos infartados, contudo este dado foi atenuado no grupo ICV. As informações sobre o perfil lipídico estão na tabela 5.

No presente estudo, observou-se que na matriz extracelular a atividade do TIMP-1 aumentou no grupo ICV. Com relação aos outros dados, não houve diferença estatística significativa. As informações da matriz extracelular se encontram na tabela 6, gráficos 9 e 10.

TABELA 1: Variáveis ecocardiográficas morfométricas

Variável	CP (21)	CV (20)	IP (9)	ICV (10)	P INT	P CV	P IAM
DDVE/PC (mm/kg)	17,14±1,28	17,59±1,95	25,16±2,28	22,67±1,67	0,004	0,039	<0,001
DSVE/PC (mm/kg)	0,82±0,04	0,82±0,04	2,00±0,06	1,72±0,06	0,009	0,008	<0,001
VEPP (mm/s)	39,28±1,01	37,91±1,03	26,07±1,55	28,12±1,47	0,191	0,792	<0,001
PP/PC (mm/kg)	0,29±0,008	0,31±0,008	0,38±0,013	0,37±0,011	0,379	0,557	<0,001
2*PP/DDVE	0,34±0,005	0,35±0,005	0,30±0,008	0,32±0,007	0,581	0,064	<0,001
AE/PC (mm/kg)	11,09±1,72	12,26±2,00	17,49±3,57	16,03±2,10	0,037	0,818	<0,001
Área AE/PC (cm ² / kg)*	0,1±0,07	0,1±0,07	0,22±0,01	0,21±0,01	0,580	0,894	<0,001
Índice de massa VE (g/kg)	0,53±0,03	0,53±0,05	1,19±0,05	1,07±0,05	0,175	0,156	<0,001
Área AE/AD**	3,83±0,12	3,8±0,1	1,49±0,2	0,15±0,16	0,901	0,955	<0,001

CP: sham, CV: sham+chá verde, IP: infartado, ICV: infartado+chá verde, PC: peso corporal, DDVE: diâmetro diastólico ventrículo esquerdo, DSVE: diâmetro sistólico ventrículo esquerdo, VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo, PP: espessura da parede posterior do VE, AE: diâmetro do átrio esquerdo, área AD: área do átrio direito, área AE: área do átrio esquerdo. * log nep, **log10

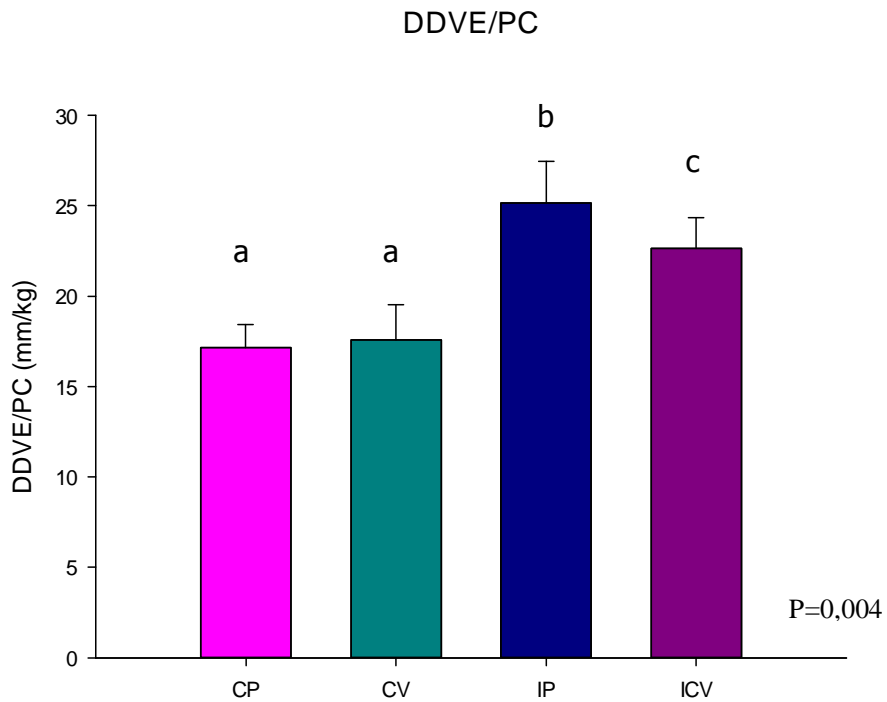


Gráfico 1: Média e desvio padrão do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo peso corporal avaliado por ecocardiografia (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

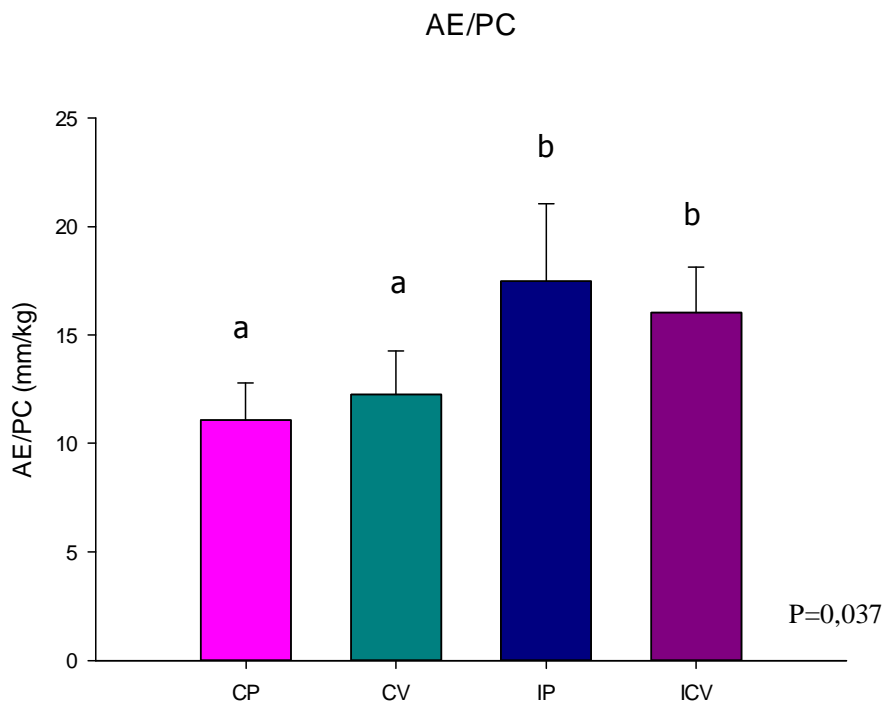


Gráfico 2: Média e desvio padrão do diâmetro do átrio esquerdo pelo peso corporal avaliado por ecocardiografia (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

TABELA 2: Variáveis ecocardiográficas funcionais

Variável Unidade	CP (21)	CV (20)	IP (9)	ICV (10)	P INT	P CV	P IAM
TDE (ms)	47,05±1,86	46,85±1,91	34,35±3,02	44,22±2,85	0,046	0,055	0,003
Fração Δ área	73,33±1,13	73,19±1,16	32,59±1,73	33,50±1,64	0,712	0,789	<0,001
% Enc sub- end.	52,33±1,1	53,59±1,1	20,66±1,68	28,43±1,59	0,024	0,002	<0,001

CP: sham, CV: sham+chá verde, IP: infartado, ICV: infartado+chá verde, TDE: tempo de desaceleração da onda E, Fração Δ área: fração de variação de área, % Enc sub- end.: porcentagem de encurtamento subendocárdico.

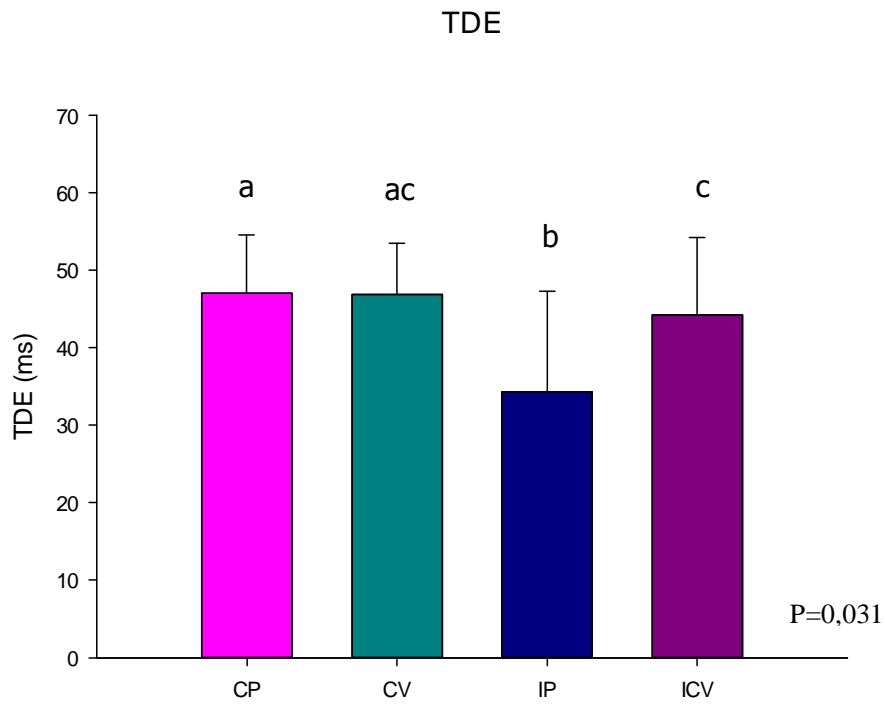


Gráfico 3: Média e desvio padrão do tempo de desaceleração da onda E avaliado por ecocardiografia (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

TABELA 3 – Estresse oxidativo do Ventrículo Esquerdo

Variável	CP (6)	CV (6)	IP (6)	ICV (6)	P INT	P CV	P IAM
HP	169,69±24,27	160,99±20,92	220,32±29,46	187,67±20,06	0,277	0,068	0,002
SOD	4,36±0,39	5,86±0,74	11,26±2,96	7,83±1,96	0,002	0,672	<0,001
Catalase	67,96±11,41	45,82±6,83	35,11±6,72	52,30±3,56	<0,001	0,478	<0,001
GSH-PX	34,44±6,17	35,11±2,94	32,18±5,48	41,44±7,23	0,107	0,065	0,433

CP: sham, CV: sham+chá verde, IP: infartado, ICV: infartado+chá verde, HP: hidroperóxido de lipídeo; SOD: superóxido dismutase; GSH-PX: glutatona peroxidase.

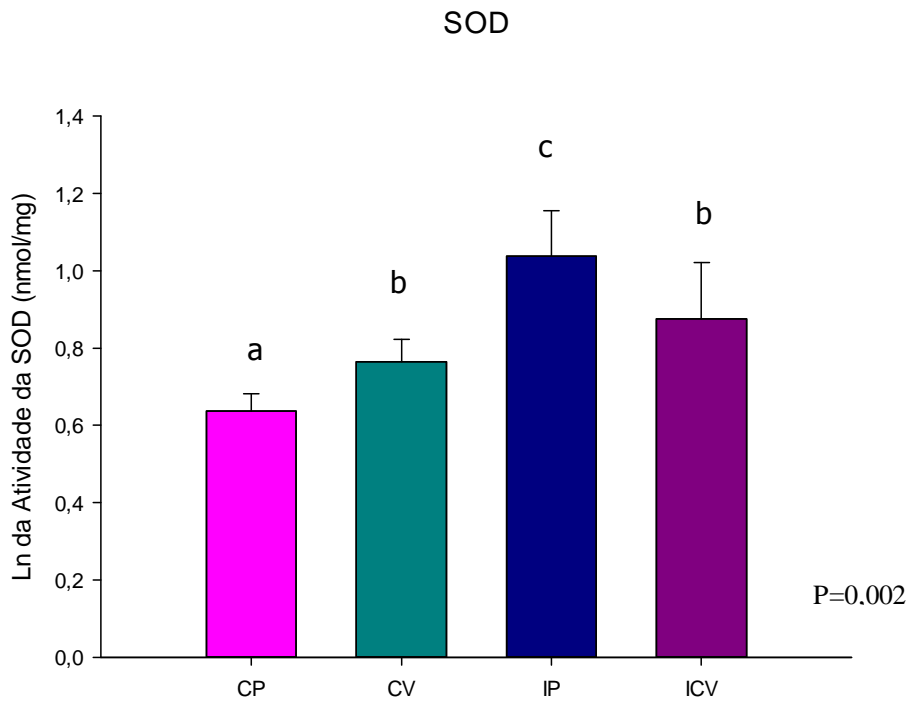


Gráfico 4: Média e desvio padrão do logaritmo neperiano da atividade da superóxido dismutase avaliada por espectrofotometria (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

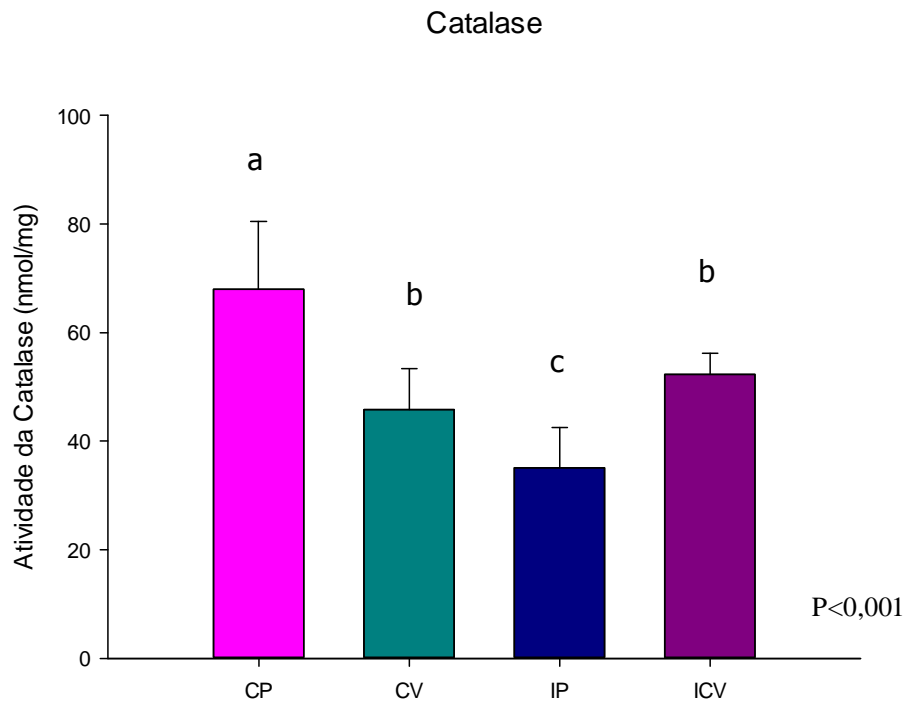


Gráfico 5: Média e desvio padrão da atividade da catalase avaliada por espectrofotometria (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

TABELA 4 – Metabolismo Energético do Ventrículo Esquerdo

Variável	CP (6)	CV (6)	IP (6)	ICV (6)	P INT	P CV	P IAM
PFK (nmol/g tecido)	94,99±22,65	117,58±28,55	166,70±30,29	126,34±32,42	0,024	0,497	0,005
LDH (nmol/mg tecido)	159,99±20,28	149,25±30,40	170,03±32,99	164,17±27,49	0,849	0,518	0,334
PIDH (nmol/g tecido)	251,55±36,66	284,28±42,57	209,55±8,95	283,74±30,88	0,168	0,001	0,157
β-OH-acil-CoA-DH (nmol/mg tecido)	50,01±9,32	46,99±9,49	30,21±6,77	32,61±1,03	0,434	0,928	<0,001
ATP sintase (nmol/mg tecido)	81,29±9,64	83,71±9,40	59,27±13,36	71,24±12,48	0,383	0,194	0,004
CS (nmol/mg tecido)	35,34±3,25	29,63±8,94	16,46±10,47	19,96±9,71	0,015	0,529	<0,001
Complexo I (nmol/mg tecido)	6,57±0,68	6,07±0,49	5,40±0,47	5,73±0,79	0,154	0,766	0,014
Complexo II (nmol/mg tecido)	6,65±1,28	5,65±1,00	4,91±2,59	5,38±1,35	0,179	0,620	0,072

CP: sham, CV: sham+chá verde, IP: infartado, ICV: infartado+chá verde, Complexo I: NADH desidrogenase, Complexo II: Succinato óxido redutase.

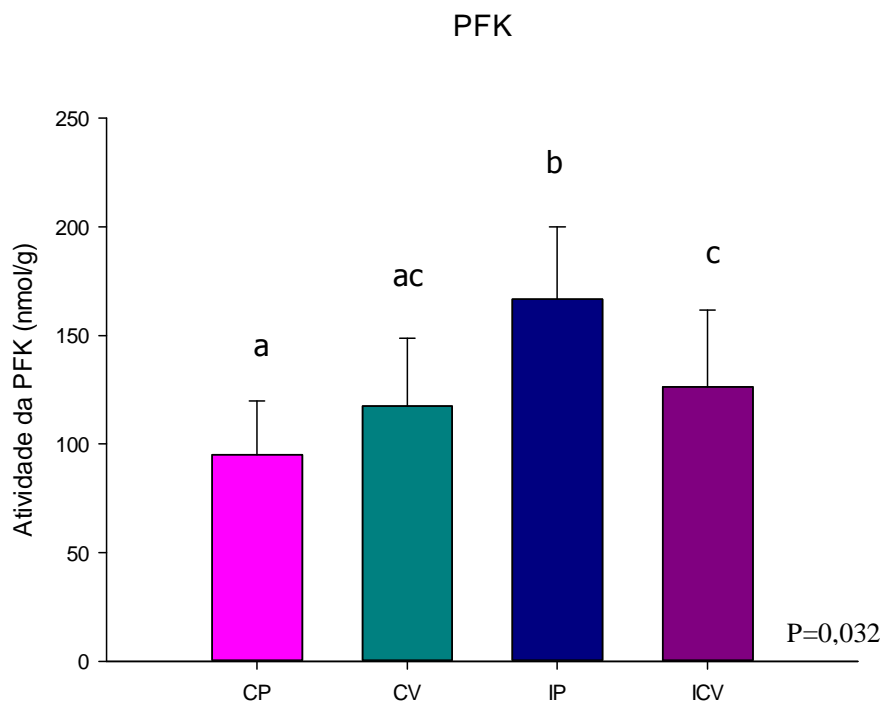


Gráfico 6: Média e desvio padrão da atividade da fosfofrutoquinase avaliada por espectofotometria (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

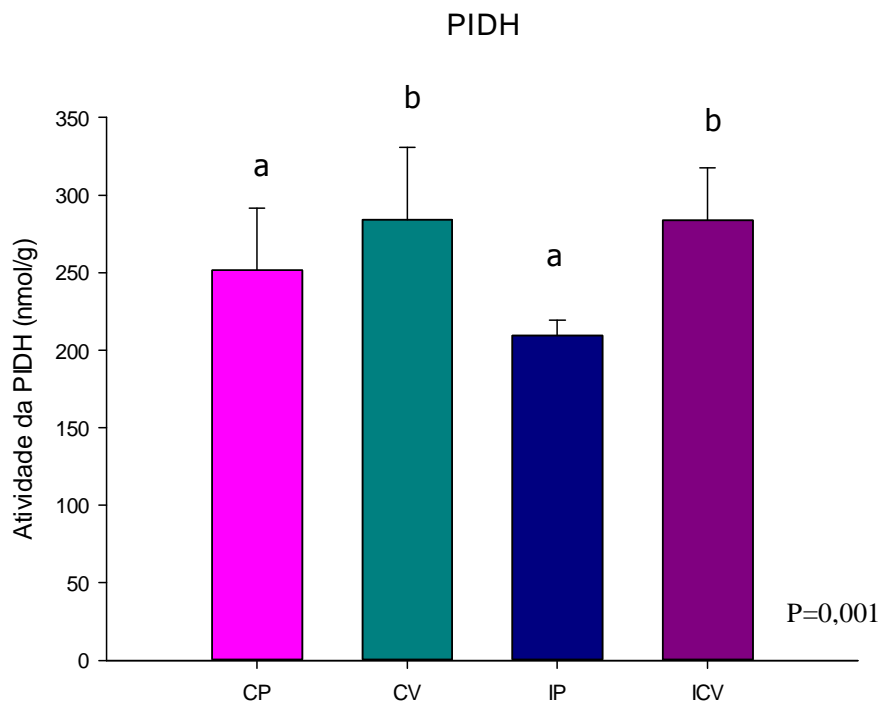


Gráfico 7: Média e desvio padrão da atividade da piruvato desidrogenase avaliada por espectofotometria (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

CS

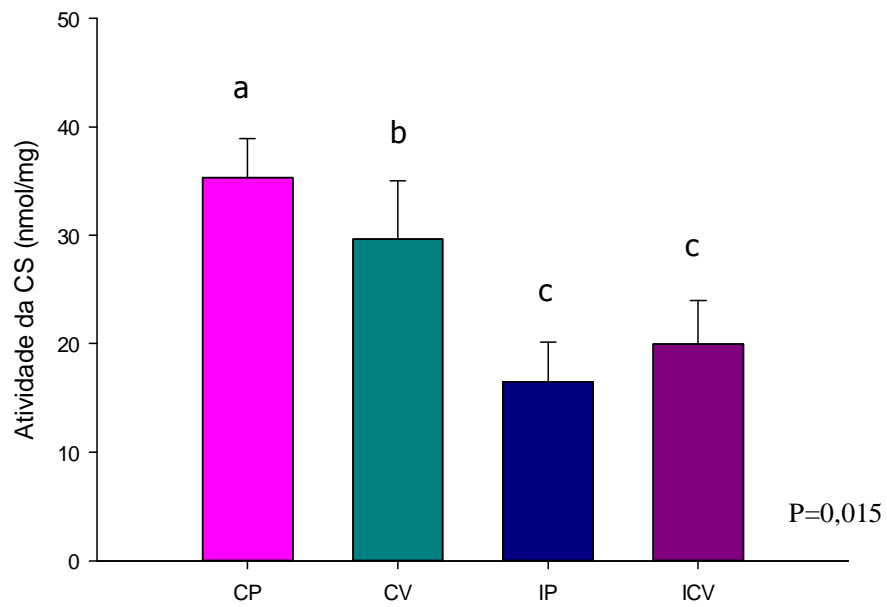


Gráfico 8: Média e desvio padrão da atividade da citrato sintase avaliada por espectofotometria (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

TABELA 5 – Perfil Lipídico do Soro

Variável (mg/dl)	CP (6)	CV (6)	IP (6)	ICV (6)	P INT	P CV	P IAM
Colesterol Total	96,15±9,57	89,71±6,32	158,58±13,35	112,37±10,85	<0,001	<0,001	<0,001
HDL	56,54±4,22	50,11±4,61	29,74±2,72	38,11±6,08	0,002	0,640	<0,001
LDL (log10)	2,80±0,13	2,73±0,17	4,60±0,07	3,90±0,09	0,013	0,003	<0,001
VLDL	22,51±2,23	23,22±2,40	28,81±2,54	24,01±1,74	0,013	0,056	0,002
Triacilgliceróis	112,55±11,16	116,12±12,01	144,03±12,69	120,04±8,69	0,013	0,056	0,002

CP: sham, CV: sham+chá verde, IP: infartado, ICV: infartado+chá verde, HDL: lipoproteína de alta densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

TABELA 6 – Matriz Extracelular do Ventrículo Esquerdo

Variável	CP (4)	CV (4)	IP (4)	ICV (4)	P INT	P CV	P IAM
TIMP	42,61±2,98	44,73±3,26	37,63±2,76	54,74±2,43	0,016	0,003	0,390
MMP2 A/I	0,52±0,09	0,60±0,09	0,59±0,10	0,59±0,09	0,66	0,70	0,65
MMP2 A+ Aint/I	5,40±1,36	4,80±1,36	8,80±1,52	4,20±1,23	0,17	0,08	0,33
MMP2 A _c	2,04±0,39	2,33±0,39	1,86±0,43	2,24±0,35	0,90	0,40	0,74
MMP2 Aint _c	0,41±0,21	0,27±0,20	0,50±0,20	0,17±0,20	0,67	0,28	0,97
MMP9 A/I	0,81±0,29	0,52±0,25	0,94±0,30	1,60±0,30	0,12	0,50	0,06

CP: sham, CV: sham+chá verde, IP: infartado, ICV: infartado+chá verde, TIMP: inibidor tecidual de metaloprotease; MMP2: metaloprotease 2; MMP9: metaloprotease 9; A: ativa; Aint: ativa intermediária; I: inativa; A_c: ativa corrigida por um controle; Aint_c: ativa intermediária corrigida por um controle.

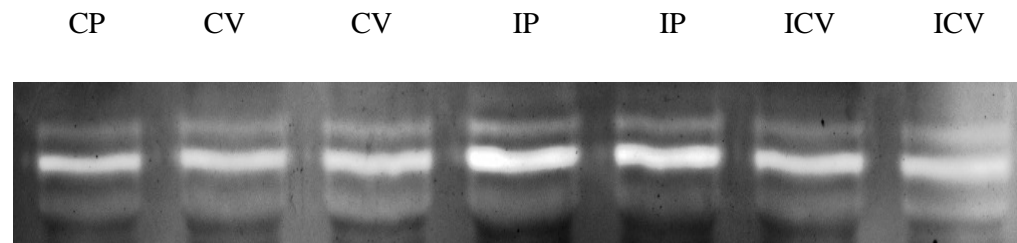


Figura 2. Bandas da concentração de MMP-2 analisada por zimografia.

TIMP-1

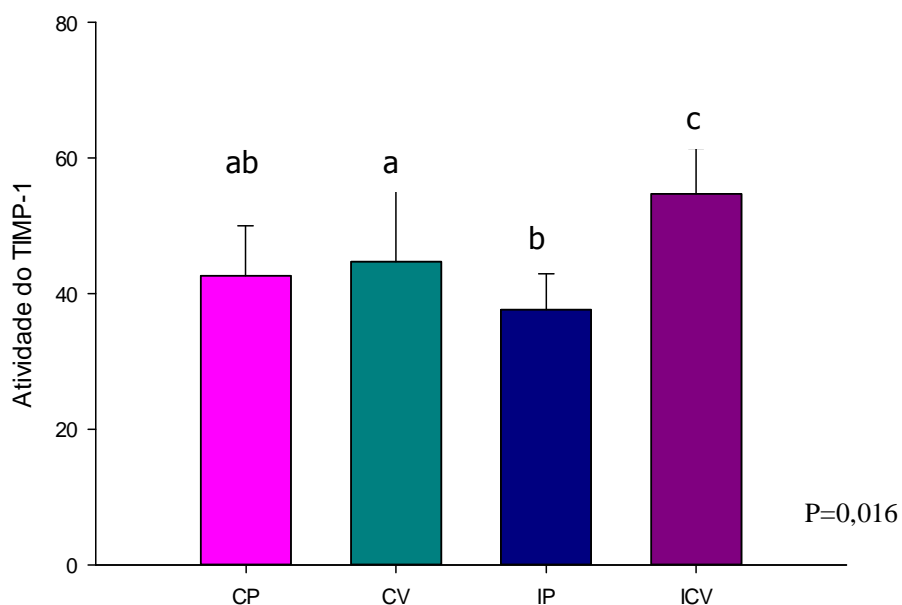


Gráfico 9: Média e desvio padrão da atividade do inibidor tecidual de metaloprotease 1 (TIMP-1), avaliado por Elisa (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

MMP

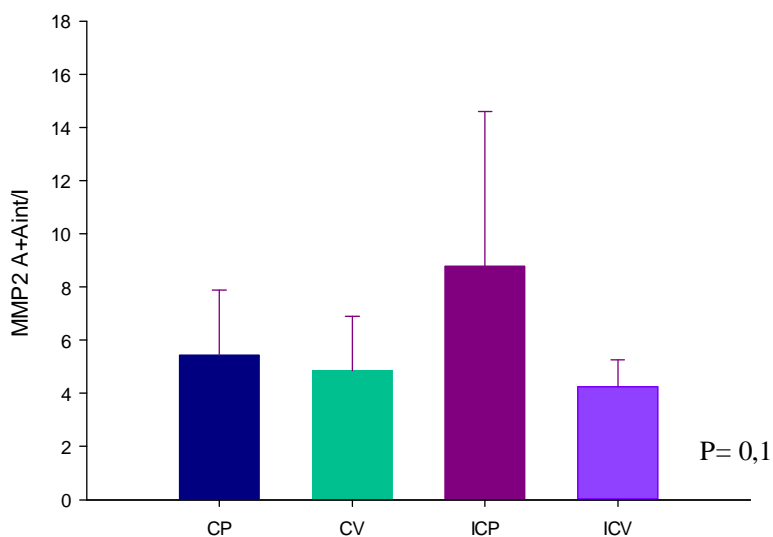


Gráfico 10: Média e desvio padrão da razão das concentração de metaloprotease 2 ativa (MMP2 A) + MMP2 ativa intermediária (MMP2 Aint) pela concentração da MMP2 inativa avaliadas por zimografia e quantificadas por densidade óptica das bandas de proteínas (letras diferentes representam significância estatística e letras iguais representam similaridade, para comparações entre CPxCV; CPxIP; CVxICV; IPxICV).

DISCUSSÃO

6-) DISCUSSÃO

A passagem de nutrientes e oxigênio fica comprometida na fase aguda da obstrução da artéria coronária, levando à morte de miócitos (apoptose e necrose), à inflamação, à degradação e à deposição de colágeno. Na fase crônica do IAM, o coração continua a sofrer alterações que configuram o processo de remodelação. Este estudo avaliou algumas variáveis bioquímicas, celulares, intersticiais, morfométricas e funcionais cardíacas após três meses do evento isquêmico. Os animais apresentaram mesmo tamanho de IAM antes de começarem a receber extrato de chá verde. Após o período de observação, os tamanhos de IAM permaneceram semelhantes entre os grupos, assim como a pressão arterial. Os valores são IP 42,98% e ICV 42,76% e CP 108mmHg, CV 120mmHg, IP 114mmHg, ICV 125mmHg, respectivamente. O peso corporal dos animais foi discretamente menor naqueles com infarto, portanto as variáveis morfométricas foram corrigidas pelo peso corporal.

Em relação ao estresse oxidativo, as EROS são produzidas após o IAM principalmente por ativação de enzimas como a NADH oxidase, xantina oxidase e por disfunção da mitocôndria (GIORDANO, 2005; TSUTSUI *et al*, 2011). As EROS modulam a atividade de fatores transcricionais como NF- κ B, a qual participa de uma importante via indutora de hipertrofia e apoptose (GIORDANO, 2005; FERRARI, 2009). O presente estudo mostrou que o IAM aumentou o estresse oxidativo cardíaco, sendo possível que este aumento se deva à produção de superóxido O_2^- e H_2O_2 , o qual consequentemente, elevou a atividade da SOD. Entretanto, a atividade da catalase estava diminuída nos animais infartados, sugerindo que o H_2O_2 não tenha sido neutralizado em H_2O e O_2 . Existe, então, a possibilidade de que o H_2O_2 tenha continuado a formar EROS, como o radical hidroxila, por meio da reação de Fenton (GIORDANO, 2005). O extrato de chá verde, por sua vez, normalizaram a atividade das

enzimas antioxidantes SOD e catalase após o IAM, melhorando o estresse oxidativo cardíaco. De fato, é descrito na literatura que as catequinas do chá verde exercem efeito antioxidante de forma direta e indireta, por induzirem a atividade de enzimas antioxidantes, reduzirem as enzimas pró-oxidantes, por removerem EROS, por inibirem fatores de transcrição redoxi-sensíveis e por quelar íons como o ferro e o cobre, prevenindo as reações de Fenton e Haber-Weiss (VELAYUTAN et al, 2008).

Apesar de não haver diferenças na formação de HP, pode-se dizer que o IAM aumentou o estresse oxidativo, bem como, o extrato de chá verde o atenuou, já que a formação de HP reflete a lipoperoxidação, a qual ocorre na membrana plasmática refletindo apenas uma parte da lesão induzida pelo estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio podem lesar o miocárdio de outras maneiras, como participar em vias de sinalização da remodelação cardíaca e na ativação de genes redoxi-sensíveis, os quais ocorrem, por exemplo, nas vias de hipertrofia e na ativação de metaloproteases.

Quanto à hipertrofia, após o IAM houve aumento da cavidade ventricular, a qual regrediu com a administração do extrato de chá verde. Apesar de não observarmos diminuição da massa do VE no grupo ICV, é possível que haja hipertrofia excêntrica. Em estudo prévio, o chá verde reduziu a hipertrofia cardíaca, muito embora, induzida por modelo de insuficiência renal crônica (PRYADARSHI *et al*, 2003).

Em relação à ativação das MMPs, estas degradam a matriz extracelular favorecendo o deslizamento dos miócitos. A redução da dilatação ventricular no grupo ICP também poderia ser explicada por, por ativação de metaloproteases degradando o colágeno da matriz extracelular, favorecendo o deslizamento dos miócitos. Este estudo não conseguiu mostrar diferença na concentração cardíaca de MMP-2 e MMP-9. No entanto, os valores da razão entre as metaloproteases ativas/inativas dos animais infartados é quase o dobro dos outros grupos. Este dado é corroborado pelo fato do

peptídeo inibidor tecidual das metaloproteases (TIMP-1) estar aumentado no grupo ICV. Outro ponto importante é que o TIMP-1 pode estar relacionado com a inibição de outras MMPs, diferentes destas que foram estudadas. De fato, em estudos prévios, as MMPs se mostraram aumentadas nos corações com insuficiência cardíaca e os TIMPs limitaram a dilatação ventricular após o IAM (CREEMERS *et al*, 2001; RHODE *et al*, 1999).

Além disso, estudos mostram que o chá verde reduz a expressão das metaloproteases em algumas neoplasias (DENG & LIN, 2011; ROOMI *et al*, 2010). Outro estudo mostrou que o chá verde reduziu a metaloprotease-2 e seu efeito pró-angiogênico (OAK *et al*, 2005). Assim, é possível que um dos mecanismos de proteção do extrato de chá verde, após o IAM seja através da inibição das MMPs.

Sobre o metabolismo energético, sabe-se que o coração é um órgão de alta demanda de ATP tanto para seu relaxamento quanto para contração adequados. A ATP é proveniente, principalmente, da oxidação de ácidos graxos (AG) de 60 a 90% e também de carboidratos. Após o IAM, a resposta humoral leva ao aumento de catecolaminas e cortisol, que dentre suas ações aumentam a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres para o coração. De fato, existe maior captação de ácidos graxos pelo coração, entretanto essa oxidação não é benéfica em situações de hipoxemia. Por isso, inicialmente, o coração aumenta a utilização de glicose e reduz a utilização de ácidos graxos. Este processo é fundamental para proteger o coração, pois apesar da oxidação da glicose ser menos eficaz, em termos de geração de energia, consome menos oxigênio quando comparada à oxidação de ácidos graxos. Além disso, na falta de oxigênio, a oxidação dos ácidos graxos gera calor e não energia (LOPASHUK *et al*, 2010; WITTELES *et al*, 2008).

Com a manutenção do insulto ao coração, os ácidos graxos que não foram oxidados são estocados em forma de triacilgliceróis e ceramidas. Este processo é chamado de lipotoxicidade e é um dos responsáveis por induzir apoptose, resistência à insulina e disfunção cardíaca. Nesta fase, tanto a via glicolítica quanto a beta-oxidação dos ácidos graxos estão prejudicadas. Conseqüentemente, menos energia é transferida para que haja contração adequada dos miócitos (LOPASHUK *et al*, 2010; WITTELES *et al*, 2008). Outro ponto importante, nesta situação mais grave, é que os complexos, presentes na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, não conseguem transportá-los corretamente e reduzir o oxigênio por completo, favorecendo a formação do superóxido e colaborando para o aumento do estresse oxidativo (TSUITSUI *et al*, 2012; LOPASCHUK *et al*, 2010).

Neste estudo, observa-se que o IAM reduziu a atividade de uma enzima da via glicolítica, a fosfofrutoquinase, a atividade de uma enzima da via da beta-oxidação dos ácidos graxos, a 3-hidróxiacil coenzima A desidrogenase, a atividade da citrato sintase, o transporte de elétrons no complexo I e a atividade da ATP sintase. Estas alterações sugerem que nesta fase, tanto a via glicolítica quanto a via da beta-oxidação dos ácidos graxos estão prejudicadas, configurando fase avançada da insuficiência cardíaca, com importante prejuízo da produção de ATP. A administração do extrato de chá verde recuperou a atividade da fosfofrutoquinase e da piruvato desidrogenase. Desta forma, é possível que o extrato seco de chá verde tenha mantido a atividade da via glicolítica, contribuindo para que a formação de ATP fosse mais eficiente. Este pode ter sido um dos mecanismos através do qual o extrato de chá verde melhora a função cardíaca após o IAM. Além disso, em consequência ao uso da via glicolítica e da ação adequada da citrato sintase, é possível que o ciclo do ácido cítrico tenha gerado NADH^+ e FADH_2 suficientes, para o funcionamento adequado da cadeia transportadora de elétrons,

reduzindo assim, a produção de superóxido. Desta forma, existe a possibilidade de que um dos efeitos antioxidantes das catequinas do extrato seco de chá verde esteja em reduzir o estresse oxidativo gerado na mitocôndria. Não foram encontrados estudos que avaliassem o papel das catequinas do chá verde nestas enzimas do metabolismo energético. Entretanto alguns estudos mostraram que estes compostos bioativos atenuaram a resistência insulínica e favoreceram a oxidação de ácidos graxos em modelos experimentais de diabetes e obesidade (RICKMAN *et al*, 2010).

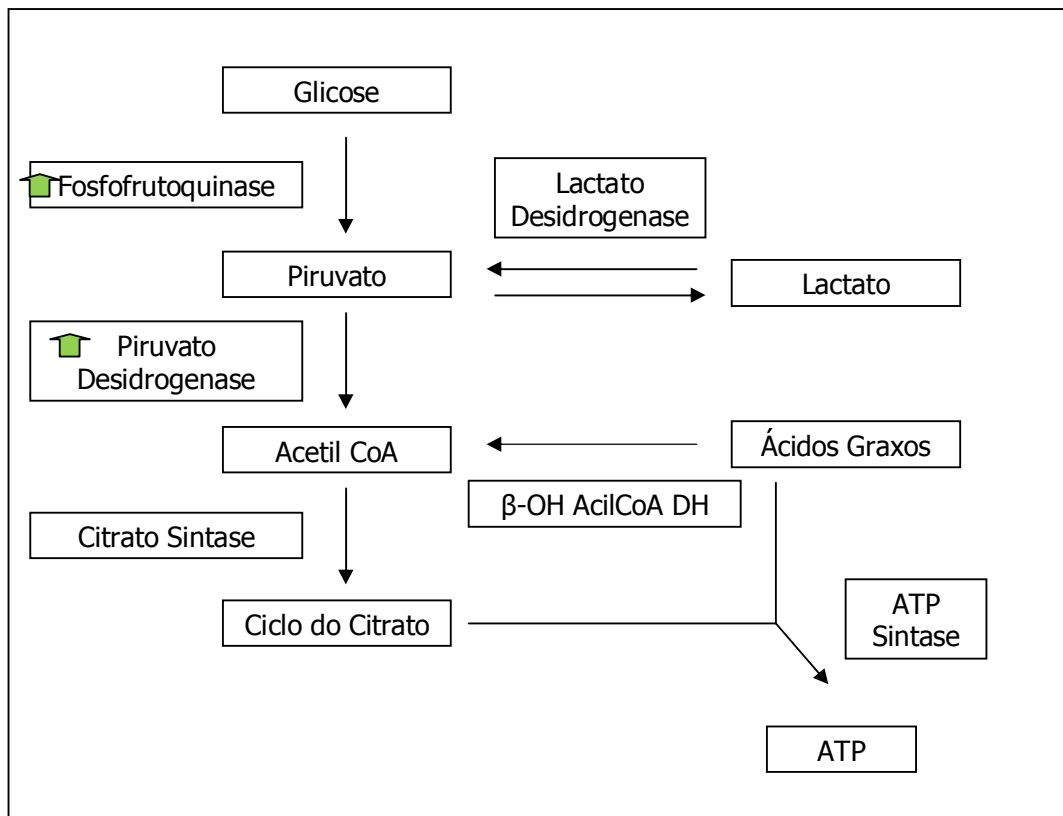


Figura 3. Ação das catequinas do CV após o IAM. ↑

No presente estudo, observou-se um aumento do colesterol total e triacilgliceróis nos grupos com IAM, que podem ser um marcador indireto de lipólise, todavia as o extrato de CV reduziu estas concentrações. De fato, elas exercem vários efeitos sobre os lipídeos, como por exemplo, na solubilidade micelar, na hidrólise intraluminal, na absorção intestinal, no receptor hepático de LDL, entre outros. Em ratos as catequinas

do chá verde reduziram a absorção intestinal do colesterol e dos triacilgliceróis. E ainda, reduzem a lipogênese, por inibir a enzima ácido graxo sintase, bem como a deposição e acúmulo de lipídeos nos tecidos, como no coração.. Sendo assim, é possível que a lipólise aumentada no grupo IP possa ter contribuído com o desenvolvimento de lipotoxicidade e conseqüentemente evoluído para disfunção miocárdica. É possível também, que a influência do extrato de chá verde sobre os lipídeos possa ter reduzido a lipotoxicidade, e que estes, sejam mecanismos de proteção do extrato de chá verde no coração (VELAYUTHAM et al,2008; HERTOOG *et al*, 1995; IMAI & NAKACHI, 1995).

Neste estudo, o processo de remodelação foi caracterizado pela presença de algumas alterações bioquímicas cardíacas, como aumento do estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético, alteração nos lipídeos séricos e redução dos inibidores das MMPs, induzidos pelo IAM e atenuados pelo extrato de chá verde. Estas alterações bioquímicas levaram a mudanças na forma cardíaca, caracterizada neste estudo, pela dilatação ventricular.

O coração remodelado e dilatado passa então a exibir alterações em sua função diastólica e sistólica. Sabe-se que o estresse oxidativo e a inflamação podem induzir à expressão de genes fetais que resultam em alterações no perfil do cálcio, nas proteínas contráteis e no metabolismo energético cardíaco (ZORNOFF *et al*, 2009). Esses são fundamentais para o relaxamento e a contração do miocárdio, e conseqüentemente, participam das funções diastólica e sistólica.

No presente estudo, observou-se nos grupos com IAM, disfunção sistólica, a qual foi atenuada no grupo ICV, sendo as variáveis que mostraram esta diferença a porcentagem de encurtamento subendocárdico e o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. A disfunção diastólica foi evidenciada pela diminuição do tempo de

desaceleração da onda E. Os dados encontrados na literatura mostram que os efeitos das do chá verde nos vasos estão bem estabelecidos. Entretanto, são poucos os estudos disponíveis que avaliaram a influência do chá verde diretamente sobre o miocárdio, dentre eles Jochman *et al*, (2008) observaram que o extrato de chá verde melhora o inotropismo cardíaco. Sendo assim se faz necessária a realização de estudos que investiguem a participação do extrato de chá verde na remodelação e função ventricular.

CONCLUSÃO

7-) CONCLUSÃO

Portanto, o extrato de chá verde atenuou alguns parâmetros da remodelação cardíaca e melhorou a função ventricular, após o IAM em ratos. Nesse estudo, os mecanismos do processo de remodelação, cuja ação do extrato de CV se evidenciou foram estresse oxidativo, metabolismo energético, hipertrofia excêntrica e TIMP-1.

REFERÊNCIAS

8-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. New York: Verlag chemie Weinheim; 1974.
2. Akhlaghi M, Bandy B. Dietary green tea extract increases phase 2 enzyme activities in protecting against myocardial ischemia-reperfusion. *Nutr Res.*, 2010; v. 30, p. 32-9.
3. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, *et al.* Metabolic differentiation of distinct muscle at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem*, 1969; v. 10, p.198-206.
4. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998; v. 56, p. 317-33.
5. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*, 1996; v. 328, p. 309-16.
4. Clement Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Prev Med.* 2009; v. 49, p. 83-7.
5. Chung KT, Wong TY, Wei C, *et al.* Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998; v. 38, p. 421–64.
6. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling- concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; v. 35, p. 569-82.
7. Cohn RM, Roth KS. *Lipid and lipoprotein metabolism*. In: *Biochemistry and disease, bridging basic science and clinical practice*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996; p. 181-263.
8. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; v. 89, p. 201–10.
9. Crozier A, Burns J, Aziz AA, *et al.*, Lean ME. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol Res.* 2000; v. 33, p.79-88.
10. Deng YT, Lin JK. EGCG inhibits the invasion of highly invasive CL1-5 lung cancer cells through suppressing MMP-2 expression via JNK signaling and induces G2/M arrest. *J Agric Food Chem.* 2011; v. 59, p. 13318-27.
11. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, *et al.* Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*, 1996; v. 333, p.145-51.

12. Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, *et al.* Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; v. 22, p.686-95.
13. Erdman JWJr, Balentine D, Arab L, *et al.* Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop; *J Nutr.* 2007; p. 718-37.
14. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem.*1995; v. 232, p.243-8.
15. Ferrari R, Ceconi C, Campo G, *et al.* Mechanisms of Remodelling - A Question of Life (Stem Cell Production) and Death (Myocyte Apoptosis). *Circ J* 2009; v. 73, p. 1973 – 82.
16. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JÁ, *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta*, 1985; v. 153, p. 23-36.
17. Giordano FJ, Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005; v. 115, p. 500-8.
18. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 1992; v. 21, p. 334-50.
19. Harada M, Kan Y, Naoki H, *et al.* Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*1999; v. 63, p. 973-7.
20. Harborne JB. *Secondary Plant Products, Springer-Verlag.* In: *Encyclopedia of Plant Physiology.* Berlin: Heidelberg, 1999; p. 329–95.
21. Heimburger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg.* 1946; v. 52, p. 677-89.
22. Hertog MGL, Kromhout D, Arvanis C, *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Arch Intern Med.* 1995; v. 155, p.381–6.
23. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; v. 43, p. 89-143.
24. Hsieh SR, Tsai DC, Chen JY, *et al.* Green tea extract protects rats against myocardial infarction associated with left anterior descending coronary artery ligation. *Eur J Physiol.* 2009; v. 458, p. 631-42.
25. Imai K, Nakachi K. Cross-sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *B M J.* 1995; v. 310, p. 639–96.
26. Jiang ZY, Woolard A, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidative of Fe₃ in the presence of xylenol orange. *Lipids.* 1991; v. 26, p. 853-56.

27. Jochmann N, Baumann G, Stangl V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; v. 11, p. 758-65.
28. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci*. 2007; v. 81, p. 519-33.
29. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer*. 2004; v. 4, p. 519-27.
30. Lamas GA, Escolar E, Faxon DP. Examining treatment of ST-elevation myocardial infarction: the importance of early intervention. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010; v. 15, p. 6-16.
31. 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*. 2005; v. 18, p. 1440-63.
32. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, *et al*. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010; v. 90, p. 207–58.
33. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by different methods. *Cl Chem*. 1977; v. 23, p. 882-4.
34. Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, *et al*. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int J Biol Macromol*. 2007; v. 41, p. 16-21.
35. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, *et al*. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol*. 2011; v. 151, p. 242-3.
36. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, *et al*. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol*. 2000; v. 279, p. 1534-9.
37. McMurray JJV. Systolic heart failure. *N Eng J Med*. 2010; v. 362, p. 228-38.
38. Moura RA. *Técnicas de Laboratório*. 2a. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.
39. Na KH, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol*. 2008; v. 46, p. 1271-8.
40. Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997; v. 61, p. 1981-5.

41. Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta*.1974; v. 358, p. 251-61.
42. Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. *J Nutr Biochem*. 2005; v. 16, p. 1-8.
43. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, *et al*. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979; v. 44, p. 503-12.
44. Priyadarshi S, Valentine B, Han C, *et al*. Effect of green tea extract on cardiac hypertrophy following 5/6 nephrectomy in the rat. *Kidney Int*. 2003; v. 63, p. 1785–90.
45. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; v. 20, p. 933-56.
46. Rickman C, Iyer A, Chan V, *et al*. Green tea attenuates cardiovascular remodelling and metabolic symptoms in high carbohydrate-fed rats. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; v. 11, p. 881-6.
47. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical.trials. *J Nutr*. 2003; v. 133, p. 3285–92.
48. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, *et al*. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 1999; 99: 3063-70.
49. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, *et al*. Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2010; v. 24, p. 747-57.
50. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and alpha-glycerophosphate dehydrogenase. *Meth Bioche Anal*. 1984; v. 32, p. 123-75.
51. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, *et al*. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000; v. 89, p. 1445-54.
52. Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, *et al*. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail*. 1999; v. 5, p. 213-23.
53. Soloni FG. Simplified manual micro method for determination of serum triglycerides. *Cli Chem*. 1971; v. 17, p. 531-4.
54. Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, *et al*. Tea catechins improve left ventricular dysfunction, suppress myocardial inflammation and fibrosis, and alter cytokine expression in rat autoimmune myocarditis. *Eur J Heart Fail*. 2007; v. 9, p.152–9.
55. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; v. 301, p. 2181–90.

56. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem.* 1993; v. 26, p. 191–8.
57. Velayutham P, Babu A, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem.* 2008; v. 15, p. 1840-50.
58. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, *et al.* Resveratrol Improves Survival, Hemodynamics and Energetics in a Rat Model of Hypertension Leading to Heart Failure. *Biochem Biophys Acta.* 2011; v. 1813, p. 1360–72.
59. Wilkinson JH. *Introducción al diagnóstico enzimático.* 3a. ed. Buenos Aires: Ediciones Toray, 1965; p. 310.
60. Witteles RM, Fowler MB, FACC MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Card.* 2008; v. 51, p. 93–102.
61. Yang Y, Lu FH, Wu JS, *et al.* The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch Intern Med.* 2004; v. 164, p. 1534–40.
62. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, *et al.* Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Nat Cancer Inst.* 1993; v. 85, p. 1819-27.
63. Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, *et al.* Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol.* 2009; v. 92, p. 150-6.
64. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, *et al.* Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2002; v. 3, p. 371-8.
65. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, *et al.* Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000; v. 95, p. 208-14.