



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

**Renata Aparecida Candido da Silva**

**Influência da suplementação de jabuticaba na  
remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio**

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

Orientador: Prof Titular Leonardo A Mamede Zornoff

**Botucatu  
2019**

Renata Aparecida Candido da Silva

**Influência da suplementação de jabuticaba na remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio**

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

Orientador: Prof Titular Leonardo A Mamede Zornoff

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Renata Aparecida Candido da.

Influencia da suplementação de jabuticaba na remodelacao cardíaca após infarto do miocárdio / Renata Aparecida Candido da Silva. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff  
Capes: 40101002

1. Remodelação cardíaca ventricular. 2. Antioxidantes. 3. Jabuticaba. 4. Infarto do miocárdio. 5. Compostos bioativos.

Palavras-chave: antioxidantes ; jabuticaba; remodelação cardíaca.

*Dedicatória*



Aos meus pais *Argemiro* e *Vera*, meu irmão *André*, pelo apoio em todos os momentos da minha vida, pelos valores ensinados, por serem exemplo de dedicação ao que fazem.

Ao meu marido *Rafael* pelo amor, carinho, dedicação, por cuidar sempre do meu bem, por acreditar em mim e em meus sonhos, por ser meu companheiro em todas as horas.

*Agradecimientos*



A *Deus* por me dar luz e força para trilhar meu caminho.

Ao meu orientador *Prof. Titular. Leonardo Antonio Mamede Zornoff* pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, por sua competência, por se disponibilizar na realização dos procedimentos cirúrgicos, por sua dedicação em ensinar. Agradeço sempre a confiança depositada em mim.

Aos docentes do grupo de pesquisa em Remodelação Cardíaca e Nutrição *Prof. Titular Sergio A Rupp de Paiva, Prof. Adj. Marcos Ferreira Minicucci, Prof. Assist. Dra. Paula S Azevedo Gaiolla, Prof. Assist. Dra. Bertha Furlan Polegato*, pelos ensinamentos ao longo da jornada e na dedicação ao grupo em reuniões científicas.

A todos os docentes do departamento de Clínica Médica, em especial ao Dr. Katashi Okoshi pela realização do ecocardiograma.

Ao *Prof. Titular Sergio A Rupp de Paiva* a me orientar no estágio de docência.

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

Aos professores *Marcos Minicucci e Bertha Furlan* pelas valiosas  
contribuições no exame geral de qualificação.

A todos os funcionários do departamento de Clínica Médica por todo apoio  
no decorrer da pesquisa.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental – Unipex – em  
especial ao *PC*, pelo auxílio nas etapas de biotério e eutanásia dos animais.

Aos funcionários da Biblioteca Campus de Botucatu e da seção de Pós  
Graduação por toda competência.

Aos amigos e companheiros de Unipex.

A todos meus colegas de Laboratório de Pesquisa em Remodelação cardíaca  
e Nutrição , em especial *Bruna Pereira, Amanda, Tatiana, Bruna Camargo*,  
por compartilhar experiências neste trabalho. Sem vocês eu não teria  
conseguido.

A todos os amigos e familiares de Botucatu e Tietê, que, mesmo de fora,  
torceram para dar certo!

A Fundação Capes pela concessão da bolsa de estudo.

**Muito obrigada!**

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

*Simone de Beauvoir*

## *Sumario*



## Sumario

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Resumo.....               | i  |
| Introdução .....          | 1  |
| Justificativa .....       | 8  |
| Hipótese e Objetivo ..... | 7  |
| Metodologia .....         | 9  |
| Resultados .....          | 29 |
| Discussão .....           | 63 |
| Conclusão .....           | 73 |
| Referências.....          | 75 |

*Resumo*



A remodelação cardíaca tem papel chave na disfunção ventricular após infarto do miocárdio. Alguns mecanismos celulares, como estresse oxidativo, inflamação, dano ao DNA e fibrose modulam esse processo. Assim, o tratamento e reparação dos danos após o infarto tem grande importância clínica. Neste contexto, compostos bioativos ganham interesse, devido suas propriedades cardioprotetoras. A jabuticaba é fonte de compostos fenólicos e antocianinas, como o ácido elágico e a cianidina 3-o glicosídeo, que possuem ação anti-inflamatória, anti-estresse oxidativo e proteção ao DNA. **Objetivo:** analisar a influência da suplementação de jabuticaba na remodelação cardíaca pós infarto do miocárdio (IM) em ratos. **Métodos:** ratos machos com 200-250g foram alocados em 4 grupos: 1) grupo Sham (SC) – animais não submetidos ao IM, recebendo ração padrão (n=16) ; 2) grupo IC – animais submetidos ao IM recebendo ração padrão (n=14); 3) Grupo IJ2% - animais infartados recebendo ração adicionada de jabuticaba na dose de 2% (n=23); 4) Grupo IJ4% - animais infartados recebendo ração adicionada de jabuticaba na dose de 4% (n=18). Após três meses foi realizado ecocardiograma e eutanásia dos animais para coleta de material biológico. No tecido cardíaco analisamos sua morfometria, estresse oxidativo, metabolismo energético, teste de cometa para avaliação de dano ao DNA, expressão de proteínas por western blot. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e as comparações foram feitas por teste ANOVA de uma via, com nível de significância adotado de 5%. **Resultados:** o infarto provocou alterações morfofuncionais e bioquímicas, como esperado. A suplementação com jabuticaba atenuou a peroxidação lipídica, melhorou variáveis do metabolismo energético e diminuiu a fibrose em corações infartados. **Conclusão:** em ratos infartados, a suplementação com jabuticaba atuou em variáveis bioquímicas e estruturais, no entanto, esses benefícios não se traduziram em melhora da geometria ou função cardíaca.

Palavras-chave: jabuticaba, remodelação cardíaca, compostos bioativos, infarto do miocárdio.

*Introdução*



As doenças do aparelho circulatório constituem uma das principais causas de morte no Brasil, sendo responsáveis por 349.642 mil óbitos em 2015, segundo o DATASUS (1). Mundialmente, cerca de 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares (DCV) em 2015, representando 31% de todas as mortes globais. Destas mortes, cerca de 7,4 milhões foram devidos a doença coronariana e 6,7 milhões foram decorrentes de acidente vascular cerebral (AVC) (2).

Dentre as DCV, podemos destacar as síndromes coronarianas agudas, principalmente o infarto agudo do miocárdio (IAM). Estudos epidemiológicos mostraram que 40% dos IAM evoluem com disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e 25% com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca (IC) (3). Diversos fatores influenciam o desenvolvimento de IC após o infarto, sendo que a remodelação cardíaca apresenta papel de destaque nesse cenário.

O termo remodelação cardíaca vem sendo utilizado, nos últimos anos, como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão. Após o IAM, esse processo se caracteriza, clinicamente, por alterações da arquitetura ventricular (4–6).

Os eventos associados ao processo de remodelação podem ser divididos naqueles que ocorrem precocemente após o infarto e naqueles que ocorrem mais cronicamente. Nas primeiras horas após o infarto, simultaneamente à necrose das miofibrilas, a isquemia cardíaca pode ativar enzimas proteolíticas, entre as quais as collagenases, com consequente desintegração do colágeno interfibrilar. A perda do tecido de sustentação torna a região mais propensa à distensão e, conseqüentemente, mais susceptível às deformações. Por essa razão, pode ocorrer deslizamento de áreas musculares necróticas, com realinhamento dos miócitos na parede infartada. O resultado desses eventos é o afinamento da região atingida e dilatação

da cavidade. Essa dilatação ventricular da parede infartada, caracterizada por adelgaçamento e distensão da região, caracteriza a expansão do infarto (4,5).

Na fase crônica, por sua vez, nota-se que a cavidade ventricular esquerda pode continuar a aumentar com o tempo, agora às custas da região não infartada. Este fenômeno se deve à hipertrofia cardíaca de padrão excêntrico, sendo resultado da sobrecarga hemodinâmica e da ativação de fatores neurohumorais e inflamatórios (4,5).

Em resumo, o processo de remodelação após o IAM se caracteriza, clinicamente, por aumento da cavidade ventricular. Na fase aguda, a dilatação ventricular é consequência do processo de expansão do infarto, enquanto que a dilatação cavitária tardia é consequência do processo de hipertrofia excêntrica.

As consequências do processo de remodelação vêm sendo estudadas há vários anos. De modo bastante consistente, se aceita que a remodelação está associada à pior prognóstico. O aspecto mais relevante da remodelação pós-infarto, no entanto, é que esse processo desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular, já que a região não infartada é alvo de diversas alterações genéticas, estruturais e bioquímicas, que vão resultar em progressiva deterioração da capacidade funcional do coração (4–7).

Algumas alterações parecem desempenhar papel fisiopatológico de destaque: aumento da morte celular, principalmente por apoptose; modificações nas proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio; acúmulo de colágeno, resultando em fibrose; alterações das metaloproteases, em particular o aumento da atividade das metaloproteases 2 e 9; aumento do estresse oxidativo; déficit energético, com aumento da atividade da via glicolítica e diminuição na utilização de ácidos graxos livres, aumento na produção de citocinas inflamatórias, particularmente interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e alterações da geometria ventricular (7–17) .

Está bem documentado que o infarto do miocárdio (IM) resulta em aumento do

estresse oxidativo tanto na região infartada como não infartada (18,19), e também na fase de expansão do infarto e hipertrofia (20). O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e das reservas antioxidantes do miocárdio. Sun (2009) descreveu queda progressiva das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) no miocárdio de ratos submetidos ao IM (19).

Após o IM ocorre desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio, resultando em déficit energético. Em condições normais, os ácidos graxos livres (AGL) são o principal substrato energético do coração, com participação variando de 60% a 90%. Já foram identificadas diversas alterações do metabolismo energético na remodelação, que se manifestam com diminuição da produção de energia: diminuição na utilização dos AGL e aumento da utilização de glicose como substrato energético, diminuição da  $\beta$ -oxidação e alterações funcionais mitocondriais (15,16).

Desse modo, suplementos antioxidantes podem ser benéficos após injúria ao miocárdio: por exemplo, estudos com probucol mostraram proteção da função cardíaca no modelo de cardiomiopatia induzida por adriamicina, maior sobrevida após infarto experimental, melhora do estresse oxidativo (21–23). Em estudos com modelo de infarto, os compostos bioativos presentes no alecrim e antioxidantes como ácido ascórbico, quercetina, alfa-tocoferol exerceram efeito protetor contra danos ao tecido cardíaco (24–26). Em linhagem de ratos hipertensos (SHR) ervas medicinais (*Centella asiatica*, *Justicia gendarussa* e *Imperata cylindrica*) preveniram hipertrofia ventricular esquerda induzida pela hipertensão devido à diminuição do estresse oxidativo (27).

Neste contexto, grande interesse tem sido focado em compostos bioativos de produtos naturais, com propriedades cardioprotetoras como os polifenóis (28).

O nome polifenóis, ou compostos fenólicos referem-se a um amplo e numeroso grupo

de moléculas encontradas em hortaliças, frutas, cereais, chás, café, cacau, vinho, soja e suco de frutas (28–30). A ação dos compostos fenólicos tem sido estudada devido aos seus efeitos biológicos preventivos e com potencial curativo. A jabuticaba, *Myrciaria jaboticaba*, é um fruto nativo do Brasil, que pertence à família Myrtaceae. Possui compostos bioativos, como os polifenóis e antocianinas, concentradas em sua casca de coloração roxa, além de derivados de quercetina e proantocianidinas. Adicionalmente, também contêm derivados do ácido elágico, os elagitaninos (31–33).

As principais antocianinas caracterizadas, especialmente na casca da jabuticaba, são cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo (33,34), conhecidas por suas propriedades antioxidante e antiinflamatória, bem como sua capacidade de prevenir doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (35–42). Nesse sentido, Leite e colaboradores, em estudo realizado com ratos, mediante administração da casca da jabuticaba, verificaram aumento no potencial antioxidante plasmático nos grupos que ingeriram a fruta (43).

O ácido elágico e seus derivados também possuem atividade antioxidante e outros efeitos biológicos benéficos, tais como antiproliferativo e cardioprotetor. Em estudo realizado por Pinto e colaboradores, verificou-se que o ácido elágico é capaz de inibir a enzima conversora de angiotensina I, reconhecidamente um modulador do processo de remodelação cardíaca (44–46). Nota-se ausência de estudos envolvendo suplementação de jabuticaba e seus efeitos no coração.

Aspecto importante a ser considerado é que, apesar de mecanismos ainda pouco claros, algumas evidências indicam que a elevada capacidade antioxidante de compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, pode resultar em redução do estresse oxidativo (46–48). O estresse oxidativo, por sua vez, modularia diversas vias de sinalização envolvidas no processo de inflamação (49).

Portanto, acredita-se que a ingestão de frutas com altos níveis de antocianinas e taninos

está associada a efeitos positivos sobre a saúde humana. Entre os mecanismos envolvidos, se destaca sua atividade antioxidante com consequentes efeitos no processo inflamatório (50–52) .

*Hipótese e Objetivo*



## **HIPÓTESE**

Com base nas alterações induzidas pelo IM e na ação antioxidante e anti-inflamatória da jabuticaba, é possível levantar a hipótese de que o consumo de jabuticaba pode atenuar a remodelação cardíaca em ratos submetidos ao IM.

## **OBJETIVO**

Avaliar a influência da suplementação de jabuticaba no processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio experimental em ratos.

*Metodologia*



O protocolo experimental do trabalho (CEUA-1125) foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo – USP. Os animais foram acondicionados no biotério em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e ingestão controlada de ração. A temperatura foi mantida a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , e a umidade controlada. Os ciclos de luz (claro/escuro) foram de 12 horas.

Quando os animais atingiram o peso entre 200 e 250g, o experimento foi iniciado. Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos: um grupo Infarto, que foi submetido ao infarto experimental, e o outro grupo Sham, que sofreu cirurgia simulada (mesmo procedimento do infarto experimental, mas sem a oclusão da artéria coronária).

### **Infarto experimental**

O infarto agudo do miocárdio foi produzido de acordo com método inicialmente descrito por Heimbürger e modificado por Pfeffer e colaboradores. Após anestesia com cloridrato de cetamina (70mg/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 descendente ligada a aproximadamente 2 mm da origem com fio de polivinil (5-0 Ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, os pulmões expandidos com ventilação positiva com oxigênio a 100% e o tórax fechado, com aspiração do pneumotórax.

## **Estudo ecocardiográfico**

Após 3 a 5 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado estudo ecocardiográfico inicial para aferição do tamanho de infarto dos animais e cálculo da fração de variação da área (FVA), de modo a garantir que não houvesse diferença entre os grupos. No final de três meses foi realizado novo estudo ecocardiográfico.

Nos dois momentos o procedimento foi o mesmo, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma transtorácico, segundo método descrito previamente (53–58).

A partir do corte paraesternal em eixo menor, foi possível a obtenção da imagem monodimensional transversa do VE, utilizando-se a imagem bidimensional como guia para posicionamento do feixe ultrassônico logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. A espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) também foi avaliada pelo modo-M. O registro da imagem monodimensional, ajustada para a velocidade de 100 mm/s, foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão e em acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography/European Association of Echocardiography (60). O aparelho utilizado foi General Electric Medical System modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico multifrequência de 5,0-11,5 MHz.

A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico

tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 5) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ( $TRIV/(R-R)^{0.5}$ ). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E e E' (E/E') (59–61). As medidas de fluxo foram obtidas com o transdutor na posição apical quatro câmaras e realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, em cinco ciclos cardíacos consecutivos (62). Também foi contemplada a frequência cardíaca.

As estruturas cardíacas foram medidas em três a cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (EDPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento de máxima excursão sistólica da parede posterior da cavidade. As áreas diastólicas e sistólicas foram medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraesternais: eixo maior e eixo menor. A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a porcentagem de encurtamento sistólico ( $(DDVE-DSVE/DDVE) \times 100$ ) e a fração de ejeção ( $(DDVE3-DSVE3/DDVE3)$ ) e a velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), fração de variação da área ( $FVA=AD-AS/AD \times 100$ ) e Índice de Tei [ $(te_i a - te_i b) / te_i b$ ]. A espessura relativa do VE foi calculada pela fórmula  $[(2 \times EDPP) / DDVE]$ . O índice de massa do VE e calculado a partir do peso do VE e peso corporal do animal  $[IMVE = (massa\ VE\ (g) / peso\ corporal\ (g)) \times 1000]$

O aparelho utilizado não foi feito para pequenos animais. No entanto, com a utilização de transdutor adequado, foi possível a aquisição de imagens adequadas das estruturas cardíacas de roedores.

## **Acompanhamento durante período experimental**

Após o estudo ecocardiográfico inicial, os animais foram novamente subdivididos, alocados ao acaso em três grupos IM e em um grupo Sham, da seguinte forma:

- a) Grupo sham controle (SC) - animais Sham que receberam ração padrão.
- b) Grupo Infarto dividido em tres novos grupos:
  - Grupo infarto controle (IC) - animais infartados que receberam ração padrão.
  - Grupo infarto jabuticaba 2% (IJ2) - animais infartados que receberam ração padrão adicionadas polpa de jabuticaba a 2%.
  - Grupoo infarto jabuticaba 4% (IJ4) - animais infartados que receberam ração padrão adicionadas polpa de jabuticaba a 4%.

## **Preparação e oferta da ração**

Foi utilizada ração Nuvilab (Nuvital®) em pó para confecção de ração com jabuticaba e peletizada para ração padrão. A composição aproximada por kg de ração é de 220g de proteína, 40g de gordura, 100g de mineral, 80g de fibra.

Para a suplementação de jabuticaba, utilizamos frutos de jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg) maduros, lavados manualmente. A quantidade total de jabuticaba utilizada no experimento foi adquirida de produtor local. A fruta inteira (casca + polpa + semente) foi homogeneizada em liquidificador industrial, acondicionada em recipientes plásticos menores e congelada à -80° C, conforme mostra a figura 1. A análise de umidade foi de 87,3%, e esta porcentagem foi considerada para o cálculo de quantidade de jabuticaba utilizada na suplementação. A ração foi armazenada em freezer (-20°C). Como a confecção da ração foi feita ao longo dos experimentos, a quantidade de jabutuicaba utilizada era descongelada em geladeira. O que não foi utilizado era desprezado, não havendo

recongelamento. A suplementação com jabuticaba foi iniciada após o ecocardiograma inicial e teve duração de 3 meses.

A ingestão de ração dos animais foi controlada a cada 24 horas. Era pesado a ração ofertada e no dia seguinte era pesado a sobra, assim tínhamos a ingestão diária.

Suplementamos em duas doses: de 20g de homogenato/kg (2%) de dieta e 40g de homogenato/kg (4%) de dieta. A escolha da dose foi baseada no estudo de Leite e cols. (2011) que estudaram o uso da jabuticaba no potencial antioxidante plasmático.

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o período experimental.

**Figura 1.** Processamento da jabuticaba



### **Caracterização físico-química de amostras de jabuticaba**

Enviamos ao Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (ITAL), amostras de jabuticaba batida, ração com jabuticaba a 2% e ração com jabuticaba a 4%, totalizando 200g de cada. As amostras chegaram via correio na cidade de Campinas – SP e logo foram iniciadas as análises.

Foram utilizados os seguintes métodos para caracterização das amostras: antocianinas totais, atividade antioxidante (método DPPH) e compostos fenólicos totais (63–65).

### **Eutanásia e coleta de material biológico**

Os animais foram anestesiados com dose excessiva de tiopental. O coração foi lavado em soro fisiológico, e dissecado em ventrículo direito (VD) e VE, no qual foram separados e pesados. Também foram coletados, o pulmão e fígado inteiros para estudo morfométrico. Um anel do VE foi seccionado e coletado para preparação de lâminas histológicas. O restante do VE foi colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80 °C para posteriores determinações bioquímicas e moleculares.

O sangue, que foi coletado por decaptação, foi centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos a 4 °C e separado o soro, também armazenado a -80 °C, que, a princípio não utilizamos para análises.

### **Estudo morfométrico dos tecidos**

O pulmão, fígado, o VE e o VD foram pesados no momento da eutanásia. A razão entre o peso dos tecidos e das estruturas cardíacas com o peso corporal foi calculada para avaliar a hipertrofia das estruturas cardíacas, a congestão pulmonar e hepática.

## **Análise histológica do VE**

Após coleta do coração, um anel do VE de aproximadamente 3 mm, seccionado de 4 a 6 mm da ponta do VE, foi retirado, colocado em formol tamponado (formol a 10%) por 24 horas. Após a fixação os tecidos foram incluídos em blocos de parafina para confecção de lâminas histológicas.

Cortes histológicos de 4 µm foram realizados nos blocos de parafina e, os mesmos corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição das áreas seccional transversa dos miócitos (ASM). Foram mensuradas de 50 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente, apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 µm e corados pela técnica de *Picrosirius red*, específicos para visualização de colágeno foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo e para determinação do tamanho do infarto. A determinação da ASM e da porcentagem de colágeno foram realizadas na área não infartada do corte histológico. Para analisar o percentual de colágeno foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo, excluindo-se o colágeno perivascular, utilizando objetiva de 40X.

O tamanho do infarto foi calculado pela soma do comprimento endocárdico e epicárdico do segmento infartado em relação à soma do comprimento endocárdico e epicárdico total do ventrículo esquerdo x 100. A quantificação do tamanho do infarto por meio da análise histológica é considerada mais precisa do que a análise pelo ecocardiograma. Isso se deve ao ecocardiograma quantificar apenas o perímetro endocárdico do infarto, que pode estar superestimado devido ao processo de expansão do infarto (66).

Posteriormente para as análises, os animais foram incluídos nas avaliações de acordo com o tamanho do infarto avaliado pela histologia, como proposto por Minicucci et al. (2011). O ponto de corte adotado para remodelação cardíaca foi de 35% de área infartada pela histologia (67).

Todas as leituras foram feitas utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

### **Avaliação do metabolismo energético no VE**

Amostras de aproximadamente 100 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e o homogeneizado foi centrifugado a 21000 x g, durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas e a atividade das enzimas do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória de elétrons foi determinada após ressuspensão do pellet com tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 250 mM de sacarose e 2 mM de EDTA e, centrifugação (21000 x g por 5 minutos), de acordo com técnica adaptada de Cassina & Radi (1996) (68).

- Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH): A atividade da LDH foi determinada de acordo com Wilkinson et al. (1965) com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH<sub>2</sub>, que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra (69).
- Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK): A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50 mM; pH 8,0), MgCl<sub>2</sub>, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-

fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH<sub>2</sub>, segundo método descrito por Bass et al. (1969) (70).

- Determinação da atividade do complexo piruvato desidrogenase (PIDH): Na presença de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4) determinou-se a atividade da PIDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, MgCl<sub>2</sub>, NBT, piruvato de sódio e fenazina metassulfato, onde mediu-se a conversão do piruvato em acetil coenzima A (acetil-CoA) através da velocidade da redução do NAD (70).
- Determinação da atividade da citrato sintase (CS): A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetato, reação catalisada pela citrato sintase, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0 (70).
- Determinação da atividade da  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase ( $\beta$ -OH-acil CoA-DH): Foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (70).
- Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (Complexo I): A atividade do complexo I foi determinada pelo método de Singer (1984) em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80 mM pH 7,4, EDTA e NADH, onde monitorou a velocidade de oxidação do NADH (71).
- Determinação da atividade da succinato desidrogenase (Complexo II): A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi medida pelo método descrito por Fischer et al (1985) em meio com tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenazina metassulfato e 2,6-dichlorophenolindophenol (DPIP), o qual teve absorbância a 600 nm (72).

- Determinação da atividade ATP sintase: A atividade da ATP sintase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50 mM; pH 8,0, na presença de MgCl<sub>2</sub>, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase (73).

Todas as leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μQuant-MQX Bio- Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) com controle pelo software. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

### **Avaliação do estresse oxidativo no VE**

A avaliação do estresse oxidativo no miocárdio do VE foi feita a partir da análise bioquímica da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase e da concentração de hidroperóxido de lipídeos. As análises enzimáticas e de hidroperóxido de lipídeo foram realizadas após a determinação das proteínas totais do tecido.

Amostras de 100 mg do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugadas a 12000 x g, por 30 minutos a 4° C segundo descrito por Pereira et al. (1998) (74). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (g/100g de tecido).

- Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9.): a atividade da GSH-Px foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura et al. (1974), em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutathione reduzida (GSH) e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metilenotetraidrofolato redutase (NADPH<sub>2</sub>) a 340 nm na presença de glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG), foi determinada a atividade da GSH-Px e expressa em nmol/mg de tecido (75).

- Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1.): a atividade da SOD foi determinada pela técnica de Crouch et al. (1981), tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de nitrobluetetrazólico (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de  $O_2^-$  do NBT para blueformazana em temperatura ambiente. Quando a amostra for adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. A atividade foi expressa em nmol/mg de proteínas totais (76).
- Determinação da atividade da catalase (EC.1.11.1.6.): a atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5 mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 240nm. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol/mg de proteínas totais (74).
- Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeos (HP): foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal ( $Fe^{2+}$ ) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilado de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90%. A intensidade da coloração da reação foi medida espectrofotometricamente. A concentração do hidroperóxido de lipídeo foi expressa em nmol/g de tecido (74).

## **Avaliação do dano oxidativo**

### ***a) Determinação de grupos carbonila***

O conteúdo carbonílico de proteínas é utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo.

As concentrações de grupos carbonila nas proteínas foram analisadas baseadas na reação com dinitrofenil-hidralazina (DNPH) e na formação das bases de Schiff de acordo com

método descrito por Reznick e Packer (77). A concentração dos grupos carbonila foi quantificada por espectrofotômetro a 360nm usando coeficiente de 22000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

***b) Teste do cometa para avaliação de dano no DNA***

O teste do cometa foi utilizado para a avaliação de danos no DNA em amostras de sangue periférico e de tecido cardíaco de acordo com as metodologias descritas por Singh e colaboradores (78) e Tice e colaboradores (79), com pequenas modificações.

Para aumentar a sensibilidade do teste, enzimas de reparo também foram utilizadas para detecção de danos oxidativos no DNA. A enzima endonuclease III (ENDOIII) detecta pirimidinas oxidadas enquanto a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) reconhece purinas oxidadas.

Imediatamente após a coleta do ventrículo esquerdo, sob luz indireta, foi colocado o fragmento de tecido cardíaco em solução contendo HBSS e DMSO a 4°C. O tecido cardíaco foi lavado com solução salina – PBS, por três vezes, em placa de petri. Em seguida, em solução enzimática (5,5 mg de proteinase K, 3 mg de colagenase Tipo I e 3 mL de HBSS), o tecido cardíaco foi picotado com lâmina de bisturi. Ao final desse processo, a solução foi colocada em tubo de 15 mL, a qual permaneceu por 30 minutos em estufa a 37°C. Decorrido esse tempo, acrescentou-se, no mesmo tubo, HBSS até completar 6 mL e centrifugado por 15 minutos a 800 rpm. O sobrenadante foi retirado restando apenas 0,5 mL da suspensão celular.

As lâminas foram realizadas em duplicata e as amostras foram codificadas. Aliquotas de 5 µL e 20 µL de sangue periférico e cardiomiócitos, respectivamente, foram misturadas a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e colocadas sobre lâmina previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após recoberta com lamínula, a lâmina foi colocada a 4°C, por 5 minutos, para solidificação da agarose. Em seguida, a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina transferida para solução de lise

gelada e recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; 1% laurilsarcosinato de sódio; 1% triton-X e 10% DMSO).

Em seguida as lâminas que receberam tratamento enzimático (FPG ou ENDO III) ou controle (tampão sem enzimas), foram retiradas da solução de lise e colocadas em solução salina PBS (1x) por 5 minutos e em seguida transferidas para outra cubeta contendo solução de Flare (1x) por 15 minutos. De acordo com o tratamento (enzimático ou controle), as lâminas foram preparadas em câmara úmida e foram cobertas com lamínula e deixadas na estufa a 37°C por 30 minutos, para atuação das enzimas. Após esse período, as lâminas foram colocadas na geladeira por 10 minutos para solidificação e as lamínulas foram retiradas para realização de corrida eletroforética.

As lâminas que não foram tratadas (avaliação de danos basais) foram tiradas da solução de lise e mergulhadas em PBS 1x por 5 minutos e transferidas para cuba de acrílico horizontal, em solução de eletroforese, juntamente com as outras lâminas por 40 minutos, com tampão alcalino gelado e recém preparado (1 mM EDTA e 300 mMNaOH, pH > 13). Após período de 20 minutos para desespiralização do DNA e expressão dos sítios álcalilábeis, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 30 minutos. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol absoluto e secas à temperatura ambiente.

As lâminas permaneceram a 4°C até o momento de análise, quando foram coradas e analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando-se o sistema de análise de imagem *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments, UK), em aumento de 400x. Foram analisados 50 nucleóides por amostra (sangue ou células cardíacas) por animal e como parâmetro para avaliação de danos oxidativos no material genético foi considerado o *tail intensity* (TI)

## **Determinação da expressão proteica por Western blotting**

Foi realizada a determinação da expressão proteica para as proteínas ERK (quinase regulada por sinal extracelular) (banda observada em 42 e 44 Kda), do NF- $\kappa$ B total e fosforilado (banda observada em 65kDa para ambos), Nrf – 2 (fator nuclear eritróide-2) (banda observada em 57kDa), TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) (banda observada em 13 Kda) e do marcador inflamatório TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) (banda observada em 25kDa). Todas proteínas foram normalizadas pela proteína GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (banda observada m 37 Kda).

### ***a) Extração proteica citoplasmática***

Para determinação de todas as proteínas estudadas, exceto o Nrf-2, a extração de proteína foi realizada utilizando-se amostras de 100 mg do ventrículo esquerdo homogeneizadas com 1ml de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores deproteases (P2714, Sigma- Aldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax<sup>TM</sup> T25 Basic, Wilmington USA). A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenadas em freezer a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão (70).

Após quantificação das proteínas, a amostra juntamente com tampão de Laemmli (Tris – HCL 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e  $\beta$  - mercaptoetanol 200 mM), foi aquecida a 100°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer.

### ***b) Extração proteica nuclear***

Amostras de 60 mg de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas com 500µl de tampão de extração (10mM HEPES, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,05% NP40). As amostras foram homogeneizadas manualmente, com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado (fração citoplasmática) e o pellet ressuspendido com tampão (5mM HEPES, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM EDTA, 0,5mM DTT, 26% glicerol (v/v)) e NaCl. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmongton USA). Após aguardar 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 rpm, por 20 minutos 4°C e coletado o sobrenadante (fração nuclear), que foi utilizado para a quantificação do Nrf-2. Para concentração de proteína e posterior diluição da amostra foi utilizado o mesmo método realizado para extração citoplasmática.

### ***c) Eletroforese em gel***

Posteriormente, as amostras (contendo 30 µg de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 10% e a concentração do gel de resolução varia de 8 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes os grupos foram pipetados de maneira alternada. A corrida

eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

#### ***d) Transferência e Bloqueio***

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação.

#### ***e) Incubação com os Anticorpos primário e secundário***

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução basal. As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos também em solução basal. As membranas permaneceram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no analisador de imagens GE Healthcare Life Sciences Imaging. A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). A análise das imagens foi realizada

no programa de análise de imagens Gel pro Image32 versão 3.1.00 (*Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA*), que mede as bandas escuras em fundo claro do *blot* em unidade de imagem denominada pixel. Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH. Quando houve necessidade de determinar proteínas de mesmo tamanho molecular, as mesmas membranas foram lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos, e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente.

Uma vez com os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi feita da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pela amostra de um animal e repetido em todos os géis; 2) o GAPDH, da mesma forma, foi normalizado pelo animal repetido em todos os géis; 3) as proteínas (já normalizadas) foram então normalizadas pelo GAPDH (já normalizado), para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot.

***f) anticorpos primários utilizados***

- Nfkb – total - mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 8008), diluição 1:200.
- Nfkb – fosforilado - rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 3302), diluição 1:200.
- TGF- $\beta$  - rabbit polyclonal IgG (abcam – ab66043), diluicao de 1:1400)
- ERK 1 - rabbit polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 93)
- Nrf-2 - rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-722). A diluição utilizada foi de 1: 400.
- TNF- $\alpha$  -rabbit polyclonal Ig (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 1350), diluição 1:200.

- GAPDH - mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada: 1:10.000.

***g) anticorpos secundários utilizados***

- Rabbit anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005). A diluição utilizada foi de 1: 5000.
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004). A diluição utilizada foi de 1: 8000.

## **Análise Estatística**

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. Os dados foram testados quanto à normalidade e variância. Para comparações entre os grupos e tamanho de infarto foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 1 via complementada por testes recomendados (Holm Sidak ou Kruskal Wallis). Para a comparação da mortalidade foi utilizado o *Chi-quadrado*.

Os resultados foram apresentados em tabelas, e quando houve interação entre fatores, foi feita a representação na forma de figuras para mostrar as diferenças entre os grupos, adotando o sinal (\*) como indicativo da comparação que apresentou diferença.

O pacote estatístico utilizado foi o SigmaPlot para Windows versão 12.0 (Systat Software, Inc). Os gráficos foram elaborados no programa SigmaPlot para Windows versão 12.0 (Systat Software, Inc).

O nível de significância estabelecido foi de 5%.

## *Resultados*



### ***Número de animais e mortalidade***

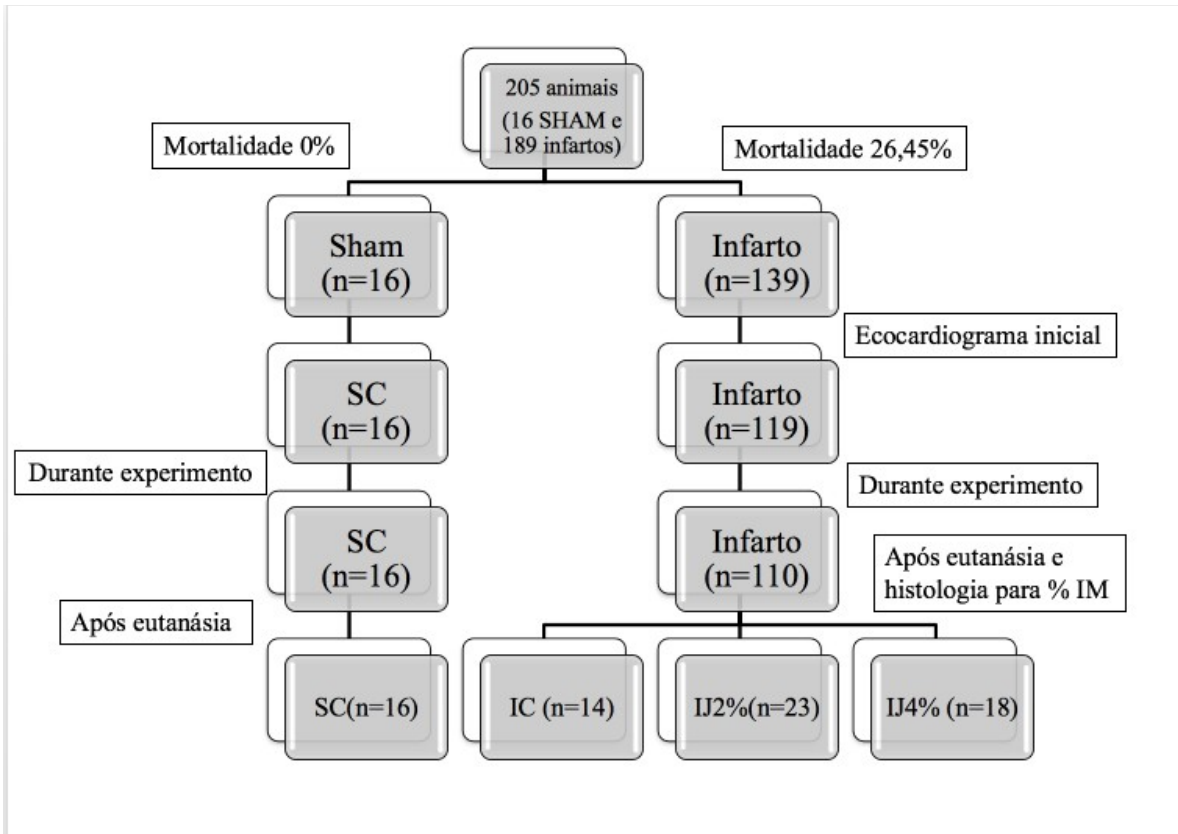
O número de animais, mortalidade e tamanho do infarto estão apresentados na Figura 2. Foram utilizados 205 ratos Wistar machos, 16 animais foram submetidos à cirurgia simulada e não houve mortalidade, 189 animais foram submetidos ao infarto experimental e apresentaram 50 mortes (26,45%), até 48 horas após a cirurgia.

Após 7 dias da realização do procedimento cirúrgico, foi realizado o primeiro estudo ecocardiográfico para aferição do tamanho do infarto e da fração de variação de área. Esse ecocardiograma inicial foi realizado para garantir que o tamanho do infarto fosse semelhante entre os grupos infartados antes do tratamento, os resultados estão representados na Tabela 1.

Foram estudados 16 animais Sham, alocados no grupo SC (n=16), 110 animais infartados (I), alocados em IC (n=34), IJ2% (n=38), IJ4% (n=38). Porém, durante os 3 meses de experimento morreram 3 animais do grupo IC, 3 animais do grupo IJ2% e 3 animais do grupo IJ4%.

A mortalidade após o período experimental foi de 3 mortes para cada grupo infartado, não havendo diferença estatística.

**Figura 2.** Número de animais, mortalidade e tamanho de infarto



SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba.

**Tabela 1.** Estudo ecocardiográfico inicial realizado 7 dias após o IM.

| <b>Variável</b>                         | <b>IC (n=34)</b> | <b>IJ2% (n=38)</b> | <b>IJ4%(n=38)</b> | <b>p</b> |
|-----------------------------------------|------------------|--------------------|-------------------|----------|
| <b>Área sistólica (mm<sup>2</sup>)</b>  | 37,5±7,17        | 35,8±7,86          | 35,8±6,99         | 0,54     |
| <b>Área diastólica (mm<sup>2</sup>)</b> | 52,6±7,59        | 52,2±8,62          | 51,3±7,88         | 0,79     |
| <b>Tamanho infarto (%)</b>              | 35,0±4,98        | 36,9±5,27          | 36,6±5,97         | 0,29     |
| <b>FVA</b>                              | 28,8±8,32        | 31,7±8,42          | 30,2±8,89         | 0,35     |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via. IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba. FVA: fração de variação da área.

### ***Peso dos animais e consumo de ração***

Os animais foram pesados semanalmente e o consumo de ração era feito diariamente. Os pesos corporais iniciais e finais não apresentaram diferença significativa e estão representados na Tabela 2. O consumo médio diário, em gramas, de ração consumida entre os grupos não diferiu significativamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Peso corporal inicial, final e consumo de ração diário.

| <b>Variável</b>                     | <b>SC (n=16)</b> | <b>IC (n=14)</b> | <b>IJ2% (n=23)</b> | <b>IJ4% (n=18)</b> | <b>p</b> |
|-------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|----------|
| <b>Peso inicial (g)</b>             | 250,9±19,13      | 239,5±16,55      | 247,7±23,06        | 245,0±24,47        | 0,522    |
| <b>Peso final (g)</b>               | 379,2±30,38      | 388,0±25,07      | 400,5±35,77        | 386,2±32,29        | 0,213    |
| <b>Consumo de ração<br/>(g/dia)</b> | 20,6(19,1-22,6)  | 21,4(19,9-22,3)  | 20,3(19,0-21,8)    | 19,9(18,7-20,3)    | 0,062    |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via. IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba.

### **Caracterização físico-química de amostras de jabuticaba**

Após 20 dias do recebimento das amostras pelo ITAL, recebemos os resultados, que são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Caracterização físico-química de amostras de jabuticaba

| <b>Amostra</b>      | <b>Determinação</b>                                            | <b>Resultados</b> |
|---------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|
| Polpa de Jabuticaba | Compostos fenólicos totais expressos em ácido gálico (mg/100g) | $532 \pm 8,00$    |
|                     | Atividade antioxidante (DPPH) (g DPPH/Kg)                      | $248 \pm 1,00$    |
|                     | Antocianinas totais (mg/100g)                                  | $17,56 \pm 0,05$  |
| Racao Jabuticaba 2% | Compostos fenólicos totais expressos em ácido gálico (mg/100g) | $153 \pm 6,00$    |
| Racao Jabuticaba 4% | Compostos fenólicos totais expressos em ácido gálico (mg/100g) | $156 \pm 6,00$    |

## **Estudo ecocardiográfico**

Os resultados obtidos pelo estudo ecocardiográfico após 3 meses de suplementação estão nas tabelas 4, 5 e 6.

O infarto causou alterações morfológicas, caracterizadas por maior diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo, maior índice de massa do ventrículo esquerdo, maior diâmetro do átrio esquerdo, maior átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal e pela aorta e maior área diastólica do VE.

Foram observadas alterações funcionais sistólicas como menor % de encurtamento endocárdico, menor velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, menor fração de ejeção, menor fração de variação da área do VE, maior índice de performance miocárdica, menor onda sistólica do anel mitral lateral e septal e menor média da onda sistólica do anel mitral lateral e septal. Também foram observadas alterações funcionais diastólicas, como menor onda diastólica tardia do anel mitral lateral e maior tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca.

Em relação à influência da suplementação de jabuticaba nos animais infartados, não encontramos diferenças nas variáveis ecocardiográficas no coração infartado.

**Tabela 4.** Variáveis ecocardiográficas estruturais.

| Variável                                | SC (n=16)               | IC (n=14)               | IJ2% (n=23)              | IJ4% (n=18)              | p      |
|-----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|
| <b>DSVE (mm)</b>                        | 2,79±0,61 <sup>b</sup>  | 7,02±0,68 <sup>a</sup>  | 7,06±0,81 <sup>a</sup>   | 7,11±0,88 <sup>a</sup>   | <0,001 |
| <b>DDVE (mm)</b>                        | 7,10±0,74 <sup>b</sup>  | 9,21±0,48 <sup>a</sup>  | 9,26±0,76 <sup>a</sup>   | 9,41±0,67 <sup>a</sup>   | <0,001 |
| <b>EDPP (mm)</b>                        | 1,32±0,08 <sup>b</sup>  | 1,57±0,18 <sup>a</sup>  | 1,64±0,21 <sup>a</sup>   | 1,55±0,19 <sup>a</sup>   | <0,001 |
| <b>EDSIV (mm)</b>                       | 1,32±0,08               | 1,43±0,25               | 1,41±0,21                | 1,34±0,22                | 0,333  |
| <b>Esp. Rel.</b>                        | 0,38±0,04 <sup>b</sup>  | 0,34±0,05 <sup>ab</sup> | 0,36±0,04 <sup>ab</sup>  | 0,33±0,05 <sup>a</sup>   | 0,024  |
| <b>IMVE (g/kg)</b>                      | 1,61±0,11 <sup>b</sup>  | 2,03±0,16 <sup>a</sup>  | 1,89±0,48 <sup>a</sup>   | 1,97±0,18 <sup>a</sup>   | 0,001  |
| <b>AE (mm)</b>                          | 5,44±0,60 <sup>b</sup>  | 6,22±0,95 <sup>a</sup>  | 6,49±0,77 <sup>a</sup>   | 6,36±0,83 <sup>a</sup>   | <0,001 |
| <b>AO (mm)</b>                          | 3,84±0,26               | 3,72±0,20               | 3,99±1,10                | 3,76±0,13                | 0,578  |
| <b>AE/AO</b>                            | 1,42±0,10 <sup>b</sup>  | 1,67±0,23 <sup>a</sup>  | 1,68±0,32 <sup>a</sup>   | 1,70±0,23 <sup>a</sup>   | 0,003  |
| <b>AE/PC (mm/kg)</b>                    | 1,43±0,18 <sup>b</sup>  | 1,60±0,28 <sup>a</sup>  | 1,63±0,25 <sup>a</sup>   | 1,64±0,21 <sup>a</sup>   | 0,004  |
| <b>Área diastólica (mm<sup>2</sup>)</b> | 37,23±4,19 <sup>b</sup> | 68,87±8,12 <sup>a</sup> | 70,25±11,34 <sup>a</sup> | 68,43±13,90 <sup>a</sup> | <0,001 |
| <b>Área sistólica (mm<sup>2</sup>)</b>  | 8,51±3,15 <sup>b</sup>  | 45,35±7,97 <sup>a</sup> | 47,27±11,30 <sup>a</sup> | 47,25±15,62 <sup>a</sup> | <0,001 |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; DDVE: diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; Esp. Rel.: espessura relativa do VE; IMVE: índice de massa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta.

**Tabela 5.** Variáveis ecocardiográficas da função sistólica do VE.

| <b>Variável</b>         | <b>SC (n=16)</b>         | <b>IC (n=14)</b>         | <b>IJ2% (n=23)</b>       | <b>IJ4% (n=18)</b>       | <b>p</b> |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| <b>FC (bpm)</b>         | 359,1±41,17 <sup>a</sup> | 312,9±50,41 <sup>b</sup> | 314,3±55,91 <sup>b</sup> | 319,4±60,90 <sup>b</sup> | 0,047    |
| <b>% Enc. Endo</b>      | 60,9±5,78 <sup>b</sup>   | 23,8±4,75 <sup>a</sup>   | 23,9±4,52 <sup>a</sup>   | 24,6±5,45 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>VEPP (mm/s)</b>      | 39,9±4,55 <sup>b</sup>   | 29,8±5,14 <sup>a</sup>   | 28,0±7,17 <sup>a</sup>   | 28,4±7,07 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>FE</b>               | 0,94±0,03 <sup>b</sup>   | 0,55±0,08 <sup>a</sup>   | 0,55±0,08 <sup>a</sup>   | 0,57±0,09 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>FVA (%)</b>          | 77,4±6,79 <sup>b</sup>   | 35,2±7,75 <sup>a</sup>   | 33,1±7,66 <sup>a</sup>   | 32,2±12,5 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>Índice de Tei</b>    | 0,43±0,04 <sup>b</sup>   | 0,57±0,09 <sup>a</sup>   | 0,61±0,13 <sup>a</sup>   | 0,55±0,11 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>S lateral (cm/s)</b> | 3,83±0,50 <sup>b</sup>   | 3,12±0,36 <sup>a</sup>   | 3,33±0,64 <sup>a</sup>   | 3,14±0,59 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>S septal (cm/s)</b>  | 3,87±0,62 <sup>b</sup>   | 3,01±0,40 <sup>a</sup>   | 3,28±0,65 <sup>a</sup>   | 3,18±0,35 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>S média (cm/s)</b>   | 3,85±0,54 <sup>b</sup>   | 3,07±0,35 <sup>a</sup>   | 3,24±0,67 <sup>a</sup>   | 3,16±0,39 <sup>a</sup>   | <0,001   |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak.. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; FC: frequência cardíaca; % Enc. Endo.: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; FVA: fração de variação da área; Índice de Tei ou Índice de Performance Miocárdica (avalia conjuntamente a função sistólica e diastólica, calculado considerando o tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + tempo de relaxamento isovolumétrico); S lateral: onda sistólica do anel mitral lateral; S septal: onda sistólica do anel mitral septal; S média.

**Tabela 6.** Variáveis ecocardiográficas da função diastólica do VE.

| Variável                 | SC (n=16)              | IC (n=14)               | IJ2% (n=23)             | IJ4% (n=18)              | p     |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| <b>E mitral (cm/s)</b>   | 72,0±8,38              | 76,4±19,93              | 67,1±11,37              | 72,8±7,36                | 0,277 |
| <b>A mitral (cm/s)</b>   | 57,9±12,13             | 54,2±19,08              | 53,0±14,75              | 61,1±11,44               | 0,466 |
| <b>E/A</b>               | 1,3±0,21               | 1,4±0,8                 | 1,4±0,74                | 1,2±0,24                 | 0,754 |
| <b>TDE (ms)</b>          | 42,7±7,06              | 47,1±6,79               | 51,8±11,66              | 51,5±10,99               | 0,230 |
| <b>TRIV/R-R</b>          | 52,1±7,05 <sup>b</sup> | 62,5±10,75 <sup>a</sup> | 64,1±9,53 <sup>ab</sup> | 59,9±10,81 <sup>ac</sup> | 0,003 |
| <b>E' lateral (cm/s)</b> | 3,6±0,60               | 3,6±0,91                | 3,5±0,67                | 3,4±0,93                 | 0,924 |
| <b>A' lateral (cm/s)</b> | 5,4±0,97 <sup>b</sup>  | 4,2±1,03 <sup>ab</sup>  | 4,7±1,54 <sup>ab</sup>  | 3,8±0,71 <sup>a</sup>    | 0,022 |
| <b>E' septal (cm/s)</b>  | 3,7±0,98               | 3,8±0,66                | 3,4±0,82                | 3,8±0,78                 | 0,465 |
| <b>A' septal (cm/s)</b>  | 4,8±0,77               | 4,0±1,14                | 4,1±1,28                | 3,6±0,93                 | 0,114 |
| <b>E' média (cm/s)</b>   | 3,7±0,51               | 3,7±0,70                | 3,1±1,03                | 3,6±0,79                 | 0,233 |
| <b>A' média (cm/s)</b>   | 4,7±1,13               | 4,1±0,93                | 4,0±1,83                | 4,0±0,86                 | 0,652 |
| <b>E/E' média</b>        | 19,5±3,39              | 19,9±3,96               | 19,5±4,36               | 20,3±4,31                | 0,955 |
| <b>E'/A' média</b>       | 0,8±0,23               | 0,9±0,37                | 0,7±0,29                | 0,9±0,26                 | 0,238 |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak.. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; R-R: distância de um batimento a outro (para cálculo do TRIV/R-R); TRIV/R-R: TRIV normalizado para a frequência cardíaca (TRIV dividido pela raiz quadrada do R-R); E' lateral: onda diastólica inicial do anel mitral lateral; A' lateral: onda diastólica tardia do anel mitral lateral; E' septal: onda diastólica inicial do anel mitral septal; A' septal: onda diastólica tardia do anel mitral septal; E' média; A' média; E/E' média, E'/A' média.

### **Estudo morfométrico**

O infarto resultou em maior peso do VE (Tabela 7). Em relação à influência da suplementação de jabuticaba nos animais infartados, não houve diferença em relação às variáveis morfométricas.

**Tabela 7.** Variáveis morfométricas.

| <b>Variável</b>        | <b>SC (n=16)</b>       | <b>IC (n=14)</b>       | <b>IJ2% (n=19)</b>     | <b>IJ4% (n=15)</b>     | <b>p</b> |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------|
| <b>Peso VE(g)</b>      | 0,61±0,08 <sup>b</sup> | 0,79±0,07 <sup>a</sup> | 0,80±0,07 <sup>a</sup> | 0,77±0,06 <sup>a</sup> | <0,001   |
| <b>Peso VD (g)</b>     | 0,17±0,04              | 0,21±0,06              | 0,23±0,11              | 0,18±0,07              | 0,119    |
| <b>Peso Pulmão (g)</b> | 1,58±0,42              | 1,68±0,73              | 1,83±0,65              | 1,48±0,48              | 0,351    |
| <b>Peso Fígado (g)</b> | 8,87±2,17              | 8,88±1,50              | 9,53±1,60              | 8,80±1,14              | 0,532    |

Dados expressos em média ± desvio padrão complementado pelo teste de Holm-Sidak.. Anova 1 via. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.

### ***Análise histológica do VE***

Após 3 meses de experimento e a eutanásia dos animais, foi realizada análise histológica para verificação da área do miocito, percentual de colágeno e tamanho do infarto. Os resultados da análise histológica estão apresentados na Tabela 8 e Figura 3 e 4.

A área do miocito foi maior nos animais infartados, não havendo diferença em relação a suplementação de jabuticaba.

O percentual de colágeno foi maior nos grupos infartados e em relação a suplementação de jabuticaba, a dose de 2% diminuiu a fibrose, quando comparada ao controle e a dose de 4% (figura 5).

O tamanho de infarto esta representado na Tabela 9. Foram excluídos os infartos inferiores a 35%. A comparação do tamanho do infarto entre os grupos não apresentou diferenças estatisticamente significantes.

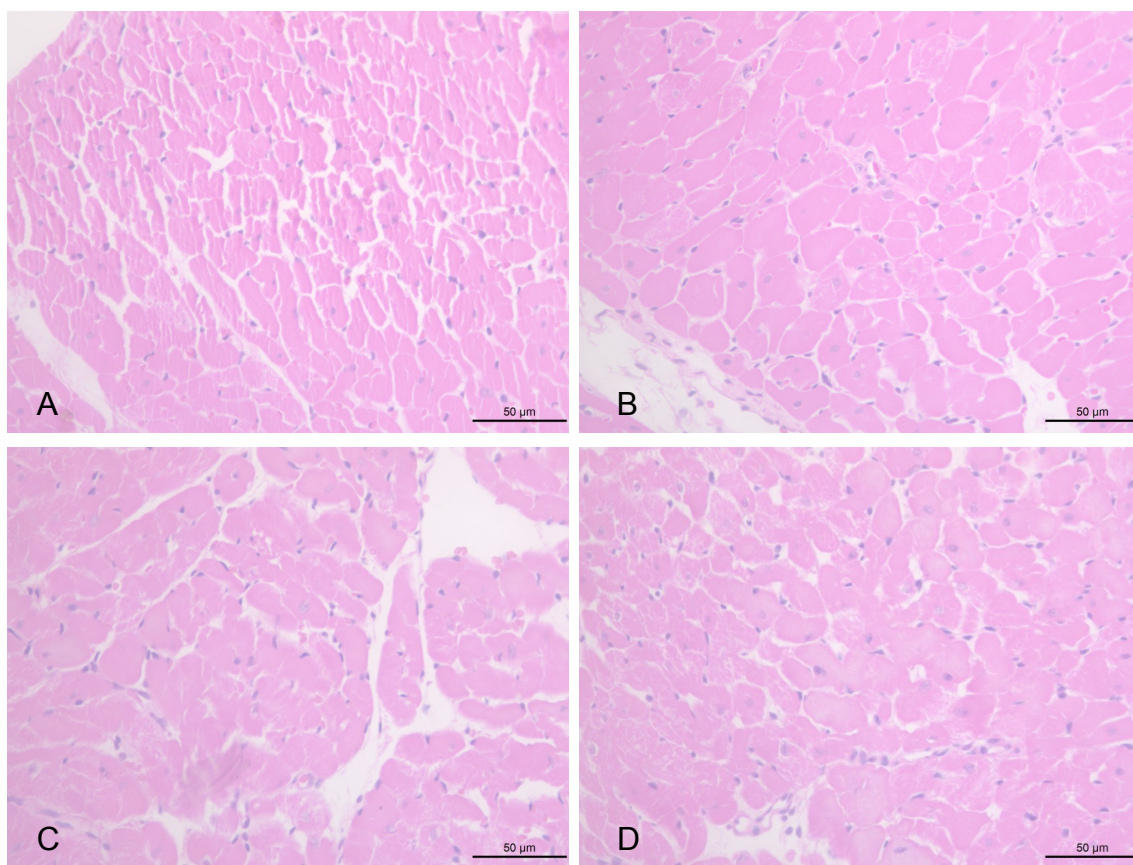
**Tabela 8.** Análise histológica do VE

| <b>Variável</b>         | <b>SC (n=8)</b>          | <b>IC (n=8)</b>          | <b>IJ2% (n=8)</b>        | <b>IJ4% (n=8)</b>         | <b>p</b> |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| <b>Area do miocito</b>  | 362,7±79,73 <sup>a</sup> | 673,1±71,82 <sup>b</sup> | 624,9±91,34 <sup>b</sup> | 629,5±176,81 <sup>b</sup> | <0,001   |
| <b>(µm<sup>2</sup>)</b> |                          |                          |                          |                           |          |
| <b>% Colageno</b>       | 2,81±0,87 <sup>a</sup>   | 7,82±0,55 <sup>b</sup>   | 5,83±0,17 <sup>c</sup>   | 7,69±0,15 <sup>b</sup>    | <0,001   |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-

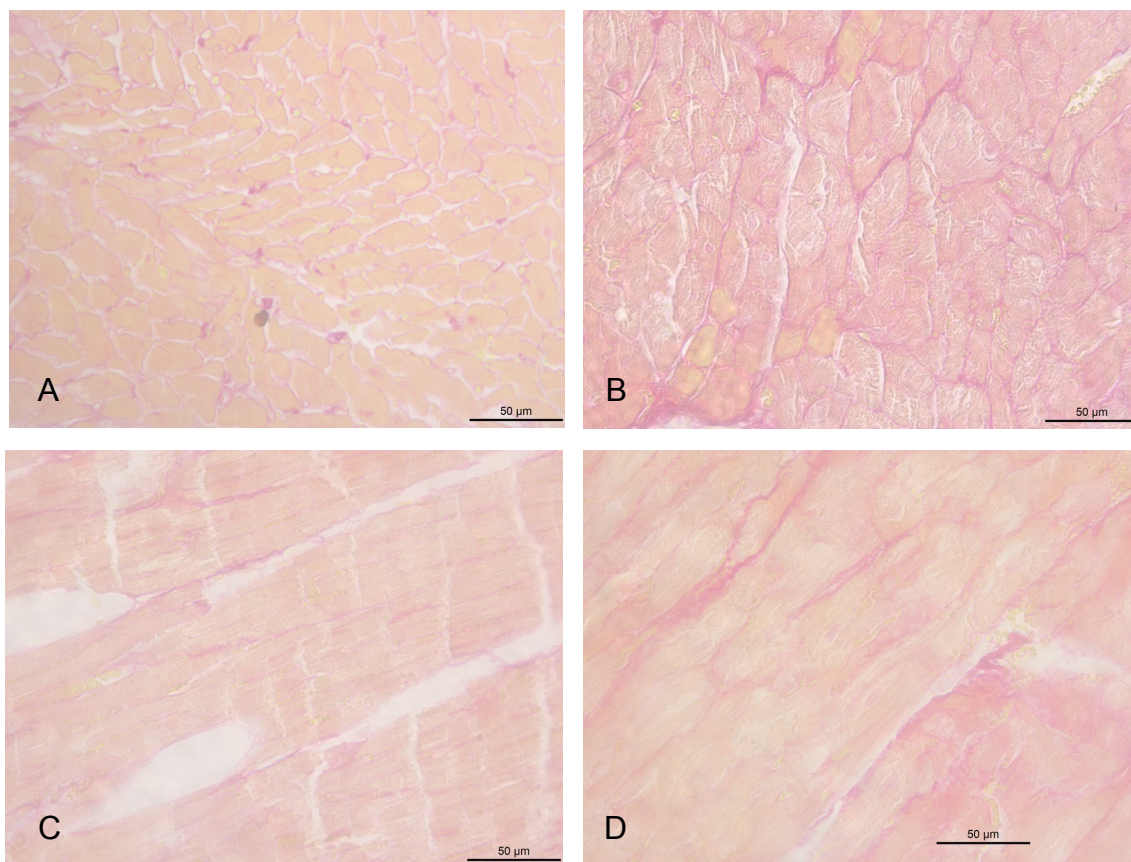
Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba. As diferenças estão representadas por letras, em que letras diferentes designam as diferenças entre os grupos.

**Figura 3.** Área do miócito



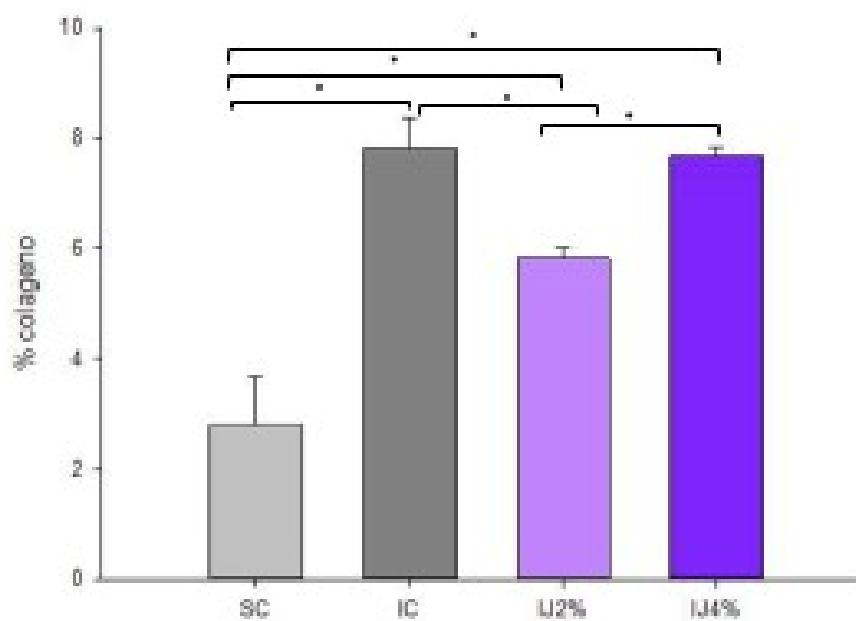
A: animais Sham que receberam ração padrão; B: animais infartados que receberam ração padrão; C: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; D: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba.

**Figura 4. Colágeno**



A: animais Sham que receberam ração padrão; B: animais infartados que receberam ração padrão; C: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; D: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba.

**Figura 5.** Percentual de colágeno



Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba.

**Tabela 9.** Porcentagem de infarto por histologia

| <b>Variável</b>  | <b>IC (n=14)</b> | <b>IJ2% (n=23)</b> | <b>IJ4% (n=18)</b> | <b>p</b> |
|------------------|------------------|--------------------|--------------------|----------|
| <b>% infarto</b> | 43,5±7,63        | 43,9±5,44          | 43,5±5,51          | 0,974    |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-

Sidak.SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba..

### ***Avaliação do metabolismo energético do VE***

Os resultados para o metabolismo energético cardíaco estão apresentados nas tabelas 10 e 11.

O infarto resultou em maior atividade da LDH e PKF (Figura 6), menor atividade da PIDH (Figura 7), CS,  $\beta$ -OH-acil CoA-DH, ATP sintase (Figura 8), Complexos I e II.

Em relação à influência da suplementação de jabuticaba, a dose de 4% diminuiu atividade da PKF, bem como contribuiu para diminuição da atividade da PIDH e ATP sintase, quando comparadas a dose de 2%. Assim a suplementação com jabuticaba parece exercer papel no metabolismo energético.

**Tabela 10.** Atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco.

| <b>Variáveis</b>                              | <b>SC (n=8)</b>           | <b>IC (n=8)</b>            | <b>IJ2% (n=8)</b>          | <b>IJ4% (n=8)</b>         | <b>p</b> |
|-----------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------|
| <b>LDH</b><br>(nmol/mg proteína)              | 61,36±10,08 <sup>b</sup>  | 92,50±28,13 <sup>a</sup>   | 78,86±14,33 <sup>ab</sup>  | 90,84±24,14 <sup>a</sup>  | 0,018    |
| <b>PFK</b><br>(nmol/g tecido)                 | 148,11±29,85 <sup>a</sup> | 355,10±78,54 <sup>b</sup>  | 340,63±99,09 <sup>b</sup>  | 134,86±62,89 <sup>a</sup> | <0,001   |
| <b>PIDH</b><br>(nmol/g tecido)                | 282,64±30,40 <sup>b</sup> | 212,31±56,92 <sup>ac</sup> | 244,31±35,86 <sup>bc</sup> | 186,31±37,68 <sup>a</sup> | <0,001   |
| <b>CS</b><br>(nmol/mg tecido)                 | 31,13±6,10 <sup>b</sup>   | 16,34±3,73 <sup>a</sup>    | 17,02±3,48 <sup>a</sup>    | 15,76±3,62 <sup>a</sup>   | <0,001   |
| <b>β-OH-acil CoA-DH</b><br>(nmol/mg proteína) | 26,67±5,53 <sup>b</sup>   | 10,70±3,21 <sup>a</sup>    | 8,48±2,21 <sup>a</sup>     | 9,56±3,21 <sup>a</sup>    | <0,001   |

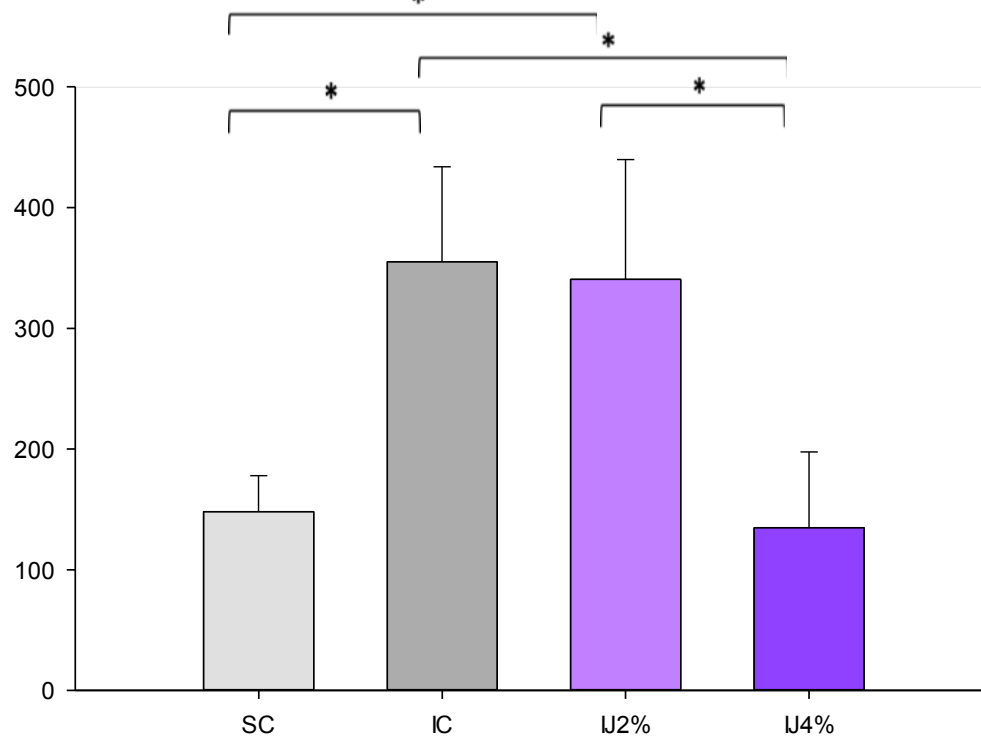
Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; LDH: Lactato desidrogenase; PFK: Fosfofrutoquinase; PIDH: Piruvato desidrogenase; CS: Citrato sintase; β-OH-acil CoA-DH: Beta-hidroxiacil Coenzima-A desidrogenase; as diferenças estão representadas por letras, em que letras diferentes designam as diferenças entre os grupos.

**Tabela 11.** Atividade das enzimas da cadeia respiratória cardíaca.

| <b>Variáveis</b>        | <b>SC (n=8)</b>         | <b>IC (n=8)</b>          | <b>IJ2% (n=8)</b>       | <b>IJ4% (n=8)</b>       | <b>p</b> |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|
| <b>ATP sintase</b>      | 30,03±5,40 <sup>c</sup> | 17,91±4,82 <sup>ab</sup> | 22,95±4,39 <sup>b</sup> | 15,78±4,29 <sup>a</sup> | <0,001   |
| <b>(nmol/mg tecido)</b> |                         |                          |                         |                         |          |
| <b>Complexo I</b>       | 10,01±1,08 <sup>b</sup> | 6,55±1,57 <sup>a</sup>   | 5,03±1,44 <sup>a</sup>  | 4,95±1,02 <sup>a</sup>  | <0,001   |
| <b>(nmol/mg tecido)</b> |                         |                          |                         |                         |          |
| <b>Complexo II</b>      | 4,87±0,88 <sup>b</sup>  | 2,75±0,54 <sup>a</sup>   | 2,88±0,98 <sup>a</sup>  | 2,55±0,48 <sup>a</sup>  | <0,001   |
| <b>(nmol/mg tecido)</b> |                         |                          |                         |                         |          |

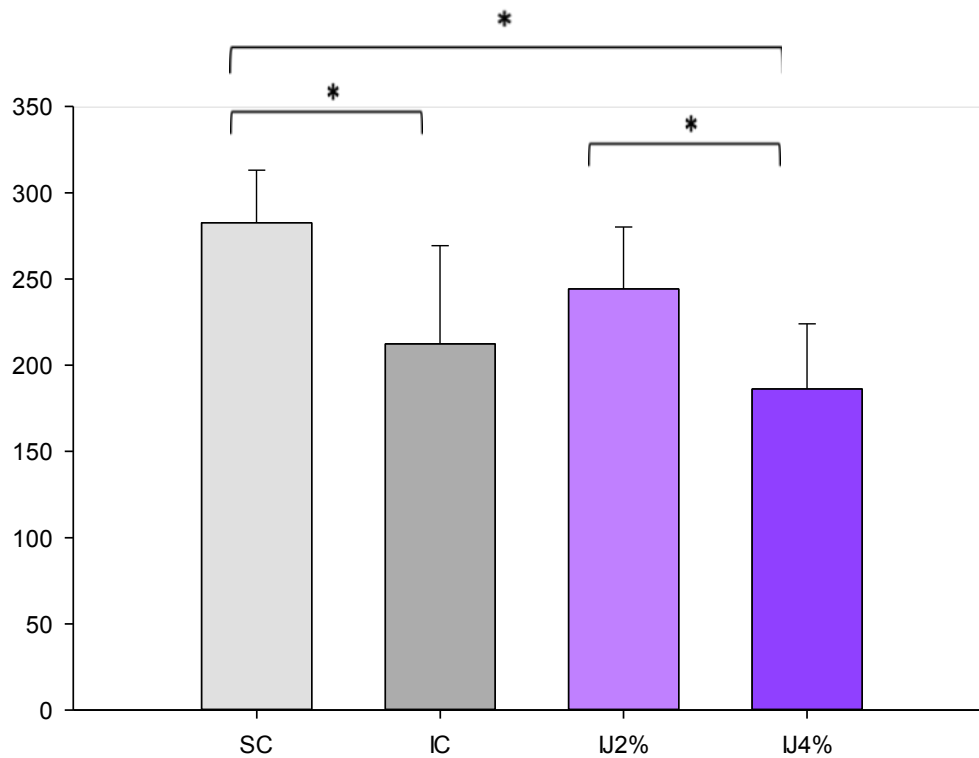
Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; Complexo I: Complexo I da cadeia respiratória; Complexo II: Complexo II da cadeia respiratória. As diferenças estão representadas por letras, em que letras diferentes designam as diferenças entre os grupos.

**Figura 6.** Atividade da fosfofruto quinase no VE.



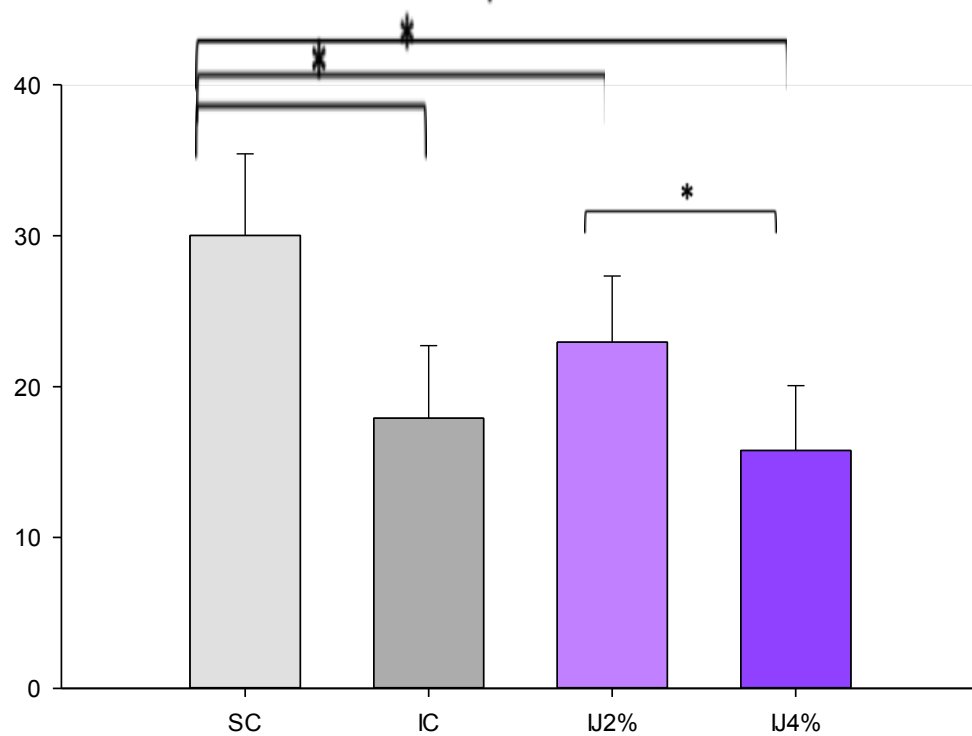
Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. VE: ventrículo esquerdo; PKF: fosfofruto quinase. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; \*= $p < 0,001$ .

**Figura 7.** Atividade da piruvato desidrogenase no VE.



Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. VE: ventrículo esquerdo; PIDH: piruvato desidrogenase. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; \*= $p < 0,001$ .

**Figura 8.** Atividade da ATP sintase no VE. \*



Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. VE: ventrículo esquerdo; SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; \*= $p < 0,001$ .

### ***Avaliação do estresse oxidativo do VE***

Os resultados para a avaliação bioquímica do estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 12.

O infarto resultou em maior concentração hidroperóxido de lipídeo (Figura 9), proteína carbonil e menor atividade de catalase, SOD e GSH-Px (Figura 10).

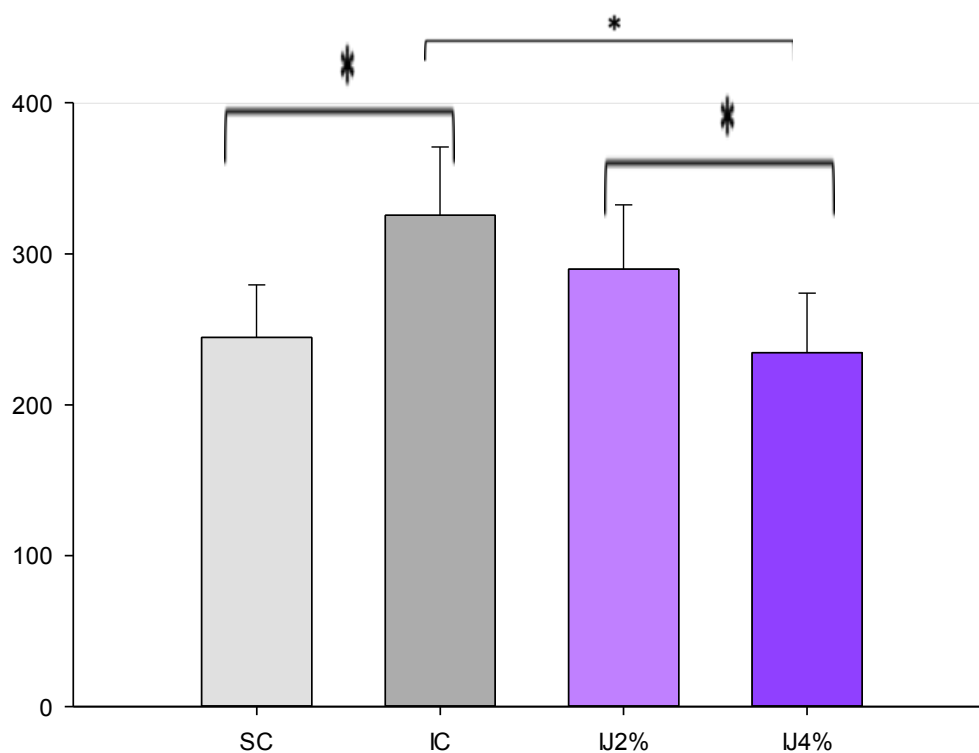
Em relação à influência da suplementação de jabuticaba, a dose de 4% atenuou a peroxidação lipídica, o que não ocorreu com a dose de 2%. De outra forma, a suplementação com jabuticaba aumentou a atividade da GSH-Px, quando comparadas ao grupo IC, não havendo diferença entre a dose de 2 ou 4%. Assim a suplementação com jabuticaba parece exercer papel na peroxidação lipídica e no estresse oxidativo.

**Tabela 12.** Lipoperoxidação, carbonilação protéica e atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no VE.

| <b>Variáveis</b>                                 | <b>SC (n=8)</b>           | <b>IC (n=8)</b>           | <b>IJ2% (n=8)</b>          | <b>IJ4% (n=8)</b>          | <b>p</b> |
|--------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|
| <b>Hidroperóxido de lipídeo (nmol/mg tecido)</b> | 244,64±34,68 <sup>c</sup> | 325,50±45,35 <sup>b</sup> | 289,88±42,47 <sup>bc</sup> | 234,55±39,35 <sup>ac</sup> | <0,001   |
| <b>Proteína carbonila (nmol/mg proteína)</b>     | 2,81±0,43 <sup>b</sup>    | 4,72±0,67 <sup>a</sup>    | 4,43±0,98 <sup>a</sup>     | 4,91±0,84 <sup>a</sup>     | <0,001   |
| <b>Catalase (nmol/mg tecido)</b>                 | 53,19±6,85 <sup>b</sup>   | 37,50±5,19 <sup>a</sup>   | 34,23±6,39 <sup>a</sup>    | 34,22±7,39 <sup>a</sup>    | <0,001   |
| <b>SOD (nmol/mg proteína)</b>                    | 15,03±3,07 <sup>b</sup>   | 11,41±1,32 <sup>a</sup>   | 9,99±1,86 <sup>a</sup>     | 11,92±1,96 <sup>a</sup>    | <0,001   |
| <b>GSH-Px (nmol/g de tecido)</b>                 | 41,51±8,87 <sup>a</sup>   | 28,12±6,72 <sup>b</sup>   | 43,92±9,23 <sup>a</sup>    | 41,24±8,32 <sup>a</sup>    | 0,003    |

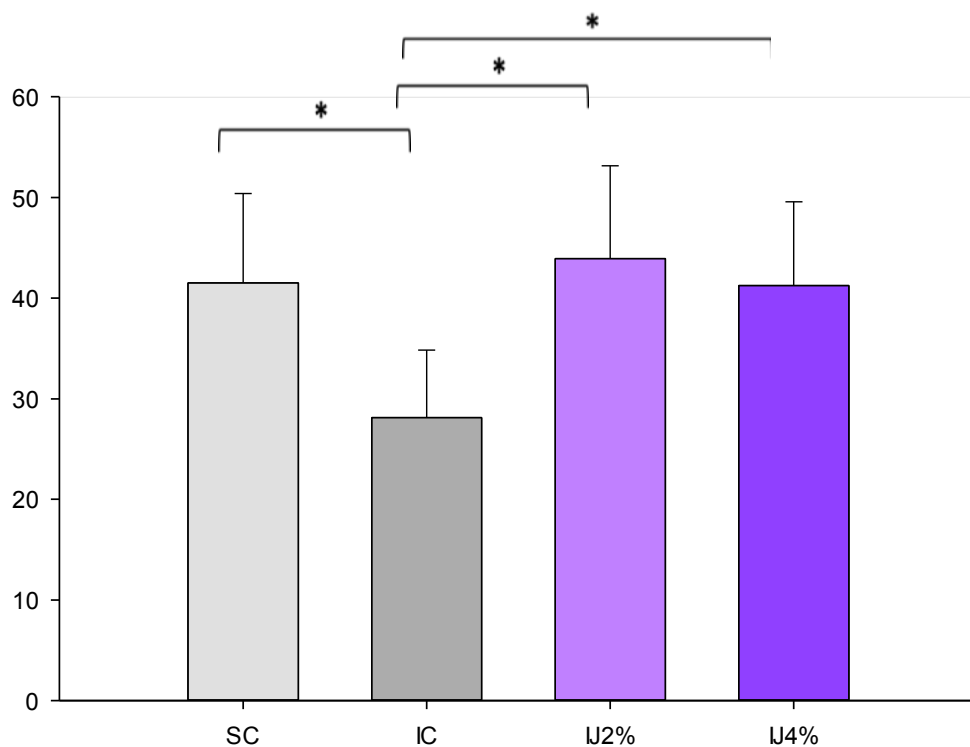
Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutatona peroxidase. As diferenças estão representadas por letras, em que letras diferentes designam as diferenças entre os grupos.

**Figura 9.** Hidroperóxidos de lipídeo no VE.



Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. VE: ventrículo esquerdo; SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; \*= $p < 0,001$ .

**Figura 10..** Atividade da glutathiona peroxidase no VE.



Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. VE: ventrículo esquerdo; GSH-Px: glutathiona peroxidase. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; \* =  $p < 0,003$ .

### **Teste do cometa para avaliação de dano ao DNA**

Considerando a análise de dano ao DNA pela técnica de cometa, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma variável estudada. Os dados referentes ao teste do cometa estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Resultados para Teste de Cometa.

| Variável               | SC (n=8)    | IC (n=8)    | IJ2% (n=8)  | IJ4% (n=8)  | p     |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| <b>TI Tampão (%)</b>   | 48,38±29,97 | 48,15±28,32 | 49,23±19,13 | 64,15±32,64 | 0,709 |
| <b>TI FPG (%)</b>      | 25,52±11,53 | 34,29±11,59 | 42,86±10,6  | 47,56±14,8  | 0,630 |
| <b>TI Endo III (%)</b> | 59,37±28,76 | 53,20±32,47 | 60,22±24,92 | 44,37±21,76 | 0,733 |
| <b>TI Sangue (%)</b>   | 10,06±4,10  | 15,25±7,94  | 19,40±12,04 | 15,18±9,32  | 0,363 |

Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Anova 1 via. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba; TI: tail intensity; Tampão: tampão sem enzima; formamidopirimidina DNA glicosilase; Endo III: endonuclease III.

### **Determinação da expressão proteica por Western blotting**

Considerando a análise da expressão proteica de ERK (42 e 44 Kda), NFkB e pNFkB, Nrf-2, TGF $\beta$  e TNF $\alpha$  pela técnica de western blot, para o Nrf-2, estando diminuída sua expressão nos grupos infartados. Os dados são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Resultados referentes à expressão proteica por Western Blot.

| Variável           | SC (n=8)               | IC (n=8)               | IJ2% (n=8)             | IJ4% (n=8)             | p     |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| <b>ERK (42/44)</b> | 1,12±0,62              | 1,12±0,36              | 1,00±0,46              | 1,15±0,31              | 0,911 |
| <b>pNFκb/NFκb</b>  | 1,02±0,27              | 1,37±1,01              | 0,73±0,35              | 0,60±0,48              | 0,133 |
| <b>Nrf-2</b>       | 2,24±1,14 <sup>b</sup> | 0,98±0,67 <sup>a</sup> | 1,14±0,80 <sup>a</sup> | 1,01±0,68 <sup>a</sup> | 0,015 |
| <b>TGFβ</b>        | 1,24±1,12              | 0,66±0,39              | 1,16±1,34              | 0,81±0,92              | 0,632 |
| <b>TNFα</b>        | 0,98±0,62              | 1,14±0,53              | 1,14±0,90              | 1,38±0,90              | 0,770 |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Anova 1 via complementado pelo teste de Holm-Sidak. SC: animais Sham que receberam ração padrão; IC: animais infartados que receberam ração padrão; IJ2%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 2% de jabuticaba; IJ4%: animais infartados que receberam ração com suplementação de 4% de jabuticaba. ERK (quinase regulada por sinal extracelular); NFκB: Fator nuclear-kB total; pNFκB: Fator nuclear-Kb fosforilado; NRF-2: fator nuclear derivado de eritróide-2; TGFβ: fator de crescimento transformador beta; TNFα: fator de necrose tumoral alfa. As diferenças estão representadas por letras, em que letras diferentes designam as diferenças entre os grupos.

## *Discussão*



A remodelação cardíaca tem grande importância clínica, pois pode levar a alterações complexas na arquitetura ventricular, associada a alterações funcionais, que podem evoluir para quadros de insuficiência cardíaca clínica (4,18,80,81). Desse modo, diversas estratégias têm sido utilizadas para atenuar esse processo, destacando-se nutrientes e compostos antioxidantes, como a jabuticaba.

A jabuticaba é frequentemente utilizada para fazer geleias, licores e também é usada na medicina popular (principalmente no sul do Brasil) por seus benefícios antioxidantes e para tratamento de distúrbios vasomotores espasmódicos (82,83).

Muitos compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas estão presentes na casca do fruto, que pode ser responsável pelos efeitos biológicos e tem sido de grande interesse medicinal (84,85). Estes compostos são capazes de complexar radicais livres e inibir a iniciação da cadeia de propagação de reações oxidativas, incluindo a peroxidação lipídica (86). Além do potencial antioxidante, alguns estudos descrevem ação anti- inflamatória, anti – idade e anticâncer dos compostos da jabuticaba (87). Entretanto, informações sobre o papel na remodelação cardíaca são limitadas.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de jabuticaba na remodelação cardíaca após infarto do miocárdio. Nossos dados mostraram que o infarto induziu, como esperado, alterações cardíacas morfológicas e funcionais, no estresse oxidativo, no metabolismo energético e nos biomarcadores celulares. Importante, a suplementação com jabuticaba nos animais infartados atenuou o estresse oxidativo, diminuiu a fibrose nas regiões não infartadas e melhorou variáveis do metabolismo energético cardíaco.

Em relação ao metabolismo energético cardíaco, a demanda energética é constante e a regulação do metabolismo energético é fundamental. Em corações normais, 60–90% do acetil-CoA vem da oxidação de ácidos graxos, e 10 - 40% vem da

oxidação do piruvato, originado do metabolismo da glicose e ácido láctico (88–91). Em situações de injúria, por exemplo, no infarto do miocárdio, há diminuição da oxidação de ácidos graxos e aumento da oxidação de glicose (92–97). Além da utilização preferencial de glicose, o coração passa a gerar mais lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidratos e a atividade da LDH (98,99). Descreve-se também que a citrato sintase, enzima inicial do ciclo do ácido cítrico, pode estar diminuída na insuficiência cardíaca por incapacidade da mitocôndria em transportar elétrons e realizar a fosforilação oxidativa, comprometendo a produção de energia (100), corroborando com nossos achados.

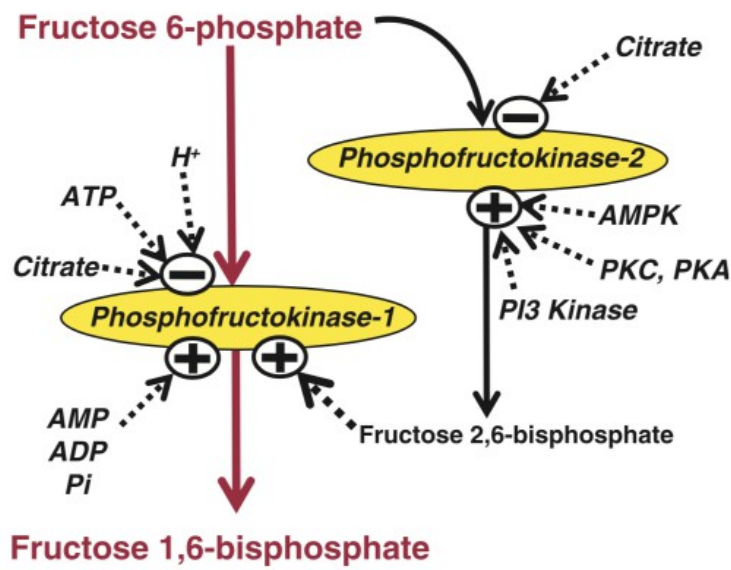
Assim, a otimização do metabolismo energético é essencial para melhora da função cardíaca. Em nosso estudo, a dose de jabuticaba de 4% reduziu a atividade da PKF-1, PIDH e ATP sintase. A PFK-1 é uma enzima reguladora chave na via glicolítica e catalisa a primeira etapa irreversível (Figura 11). A PFK-1 utiliza ATP para produzir frutose 1,6-bisfosfato e é ativada por ADP, AMP e Pi e inibida por ATP, acelerando assim o fluxo através da glicólise (101).

A PDH é um complexo multienzimático localizado na matriz mitocondrial, sendo responsável pela descarboxilação do piruvato, formado a partir da glicólise, um passo irreversível na oxidação dos carboidratos, (Fig. 12) (102,103). Lembrando que o piruvato tem três destinos principais: conversão em lactato, descarboxilação em acetil-CoA ou carboxilação em oxaloacetato ou malato.

Em nosso estudo, a oxidação de glicose e piruvato e a atividade da PDH no coração foram reduzidas nos animais suplementados, provavelmente por taxas aumentadas na oxidação de ácidos graxos (104–107).

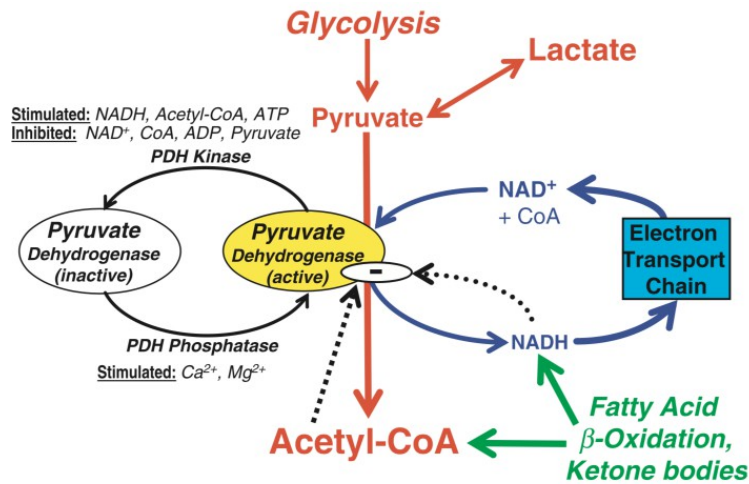
Esses achados, portanto, sugerem melhora no metabolismo energético cardíaco com a suplementação de jabuticaba na dose de 4%.

**Figura 11.** Regulação da PFK-1 por PFK-2 e frutose 2,6-bisfosfato (108)



PKF-1: fosfofrutoquinase-1; PKF-2: fosfofrutoquinase-2; PKA: proteína quinase A; PKC: proteína quinase C; PI3K: fosfatidilinositol 3 –quinase.

**Figura 12.** Regulação da oxidação de glicose e lactato pela PDH. A atividade da PDH é inibida pela inibição do produto de acetil-CoA e NADH (setas tracejadas), e pela fosforilação pela PDH-quinase e defosforilação pela PDH-fosfatase. (108)



PDH – piruvato desidrogenase

Em relação ao estresse oxidativo, como comentado anteriormente, a jabuticaba é rica em compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, tanto na casca como na semente, sendo relevante sua ação antioxidante. No presente estudo, o primeiro aspecto a ser considerado foi que a concentração de HP foi a variável utilizada como marcador do dano oxidativo lipídico. Assim, nossos dados evidenciaram aumento na atividade de HP em animais infartados, sugerindo aumento do estresse oxidativo após o IM.

A peroxidação lipídica é definida como reação em cadeia que destrói a membrana lipídica, o que ocasiona alterações na estrutura e permeabilidade celular. É iniciado com o sequestro de hidrogênio da membrana lipídica, formando hidroperóxidos, considerados marcadores de danos induzidos por EROs (109). Assim, o segundo aspecto a ser considerado foi que a suplementação com jabuticaba na dose de 4% atenuou o dano oxidativo lipídico. Espera-se esta ação, devido ao ácido elágico, um dos componentes da jabuticaba que possui alta eficiência antioxidante. Esse efeito é devido à presença de vários grupos hidroxila, responsáveis pelo forte potencial de doação de um átomo de hidrogênio e suporte ao elétron desemparelhado (110). Por outro lado, a suplementação com jabuticaba não atenuou o dano protéico, avaliado pela proteína carbonila.

De acordo com a literatura, o conteúdo de ácido elágico total em frutos de jabuticabeira (*M. cauliflora*) varia de 0,0215% a 0,311% (p / p). Desse modo há um interesse crescente nesse marcador químico devido às suas poderosas atividades antioxidantes e outras propriedades, como efeitos cardioprotetores e sob enzimas conversoras de angiotensina (111). Especula-se também que o extrato de jabuticaba poderia restaurar antioxidantes endógenos (112).

Sabe-se que em condições fisiológicas, os efeitos das EROs podem ser atenuados em parte pelo sistema antioxidante enzimático, que inclui as enzimas

glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (20). A SOD é responsável pela dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) para hidroperóxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que a catalase e a GSH-Px posteriormente metabolizam em água e oxigênio (20). A GSH-Px é uma enzima de segunda fase, diferente das demais. No presente trabalho foi evidenciado aumento na concentração da GSH-Px em ambos os grupos suplementados com jabuticaba (2 e 4%), sugerindo que o aumento de enzimas antioxidantes possa ser um dos mecanismos responsáveis pelo menor estresse oxidativo.

O Nrf-2 é um fator de transcrição que se liga à região promotora de vários genes da resposta antioxidante, como enzimas antioxidantes e enzimas de fase 2 (113,114), iniciando a transcrição de genes da resposta antioxidante, como a GSH-Px. Estudos relataram que o Nrf-2 está envolvido na proteção do coração contra hipertrofia cardíaca e IC por meio da supressão do estresse oxidativo (115). Também é descrita a redução do Nrf-2 após o infarto, sugerindo assim a participação desta via no processo de remodelação após IM (116). Em nosso estudo observamos menor expressão do Nrf-2 nos grupos infartados e a suplementação com jabuticaba não influenciou essa variável, sugerindo que a diminuição da GSH-Px não foi mediada pelo Nrf-2.

Analisando os efeitos da suplementação de jabuticaba na quantidade de colágeno na região não infartada, a suplementação na dose de 2% atenuou a fibrose. Está bem estabelecido que essa variável é importante determinante do prognóstico após o infarto, por ser fator determinante da função e de arritmias malignas após o infarto. Sabe-se que após o infarto, os fibroblastos cardíacos e seus derivados ativados, miofibroblastos, desempenham um papel crítico na resposta cicatricial. Isso inicia resposta inflamatória e o recrutamento de macrófagos e neutrófilos (117,118). Os neutrófilos secretam várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1). Em modelos animais, mostrou-se que o TGF- $\beta$ 1 ativa a diferenciação de

fibroblastos a miofibroblastos e contribui para a hipertrofia e fibrose cardíaca (119,120). Similarmente, o TGF- $\beta$ 1 exógeno aplicado in vitro demonstrou induzir a diferenciação de miofibroblastos em pele, pulmão, rim e fibroblastos cardíacos (121–125). Em nosso estudo, a suplementação de jabuticaba não interferiu com o TGF- $\beta$ . Dessa forma, podemos inferir que a redução da fibrose em nosso estudo não foi mediada via TGF- $\beta$ 1.

Em relação ao dano ao DNA, na literatura há apenas um trabalho mostrando que os componentes da semente de jabuticaba não apenas protegem o DNA de lesões, mas também ajudam a reparar danos no DNA, acelerando a eficiência do reparo do DNA em células danificadas (126). Neste estudo, os elagitaninos isolados da semente são compostos principalmente de elagitaninos C-glicosídicos de castalagina e vescalagina com um núcleo de glicose de cadeia aberta; e, em menor quantidade, de pedunagagina, um elagitanino simples com 4 núcleos de C1-glucopiranosose e duas unidades de hexa-hidroxi-difenol. Ambos os tipos de elagitaninos possuem capacidade de complexação com íons metálicos, proteínas / enzimas e compostos básicos, além de suas atividades antioxidante e antitumoral (117,118).

Em nosso estudo o teste de cometa não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Considerando que os grupos infartados foram iguais aos animais controle, nossos dados podem sugerir que essa técnica não é adequada quando aplicada em modelos com ratos infartados.

Finalmente, devemos considerar que apesar dos benefícios da jabuticaba em diferentes variáveis estudadas, esse benefício não se traduziu em melhora funcional ou diminuição dos diâmetros ventriculares. O processo de remodelação se inicia com uma agressão ao coração, que induz alterações genéticas, moleculares, celulares e intersticiais. Com a evolução do processo, essas alterações resultam em modificações morfológicas e funcionais. Portanto, nossos achados sugerem que o infarto propiciou

alterações bioquímicas, moleculares e funcionais cardíacas. Importante, a suplementação com jabuticaba agiu de modo favorável a nível molecular, intersticial e bioquímico. No entanto, talvez pelo curto período de observação, esses benefícios não se traduziram em melhora da geometria ou função cardíaca.

### ***Equivalência da suplementação de jabuticaba de ratos para seres humanos***

É importante destacar a relevância clínica dos resultados descritos no presente estudo. Apesar dos avanços na pesquisa cardiovascular, o infarto do miocárdio ainda é uma das principais causas de morbi-mortalidade no Brasil e no mundo, podendo levar a disfunção ventricular e IC. Neste sentido, a suplementação de jabuticaba poderia ser medida coadjuvante no tratamento de pacientes com IM após a segurança e eficácia de seu uso ser testada em estudos de intervenção.

Calcula-se a equivalência da quantidade de jabuticaba a ser usada em estudos com humanos utilizando a equação de equivalência de dose proposta por Reagan-Shaw e colaboradores (127). Considera-se que um rato consome em média 25 gramas de ração por dia. Concentrações de 2% e 4%, equivalem a 0,5 e 1,0 grama de jabuticaba adicionada na ração por dia, respectivamente. Transformando em mg/kg, encontramos 1250mg/kg e 2500mg/kg, também respectivamente.

Calculando-se a dose equivalente para humanos utilizando a equação, temos que, na dose de 2% o valor é 260mg/kg, e na dose de 4% é de 520mg/kg. Nesse contexto, tomando como base um homem de 60kg, teríamos 15,6g de jabuticaba e 31,2g de jabuticaba, nas respectivas doses.

## *Conclusão*



Conclui-se que, em ratos infartados, a suplementação com jabuticaba atenuou o estresse oxidativo, diminuiu a fibrose nas regiões não infartadas e melhorou variáveis do metabolismo energético cardíaco. No entanto, esses benefícios não se traduziram em melhora da geometria ou função cardíaca.

## *Referências*

---

1. DATASUS. Doenças do sistema circulatório - óbitos por residência segundo região. MS - Rede Interagencial de Informações para a Saúde. 2018.
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
3. Albert NM, Lewis C. Recognizing and managing asymptomatic left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Crit Care Nurse. 2008;28(2):20–37.
4. Chon JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000;35(3):569–82.
5. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation. 1990;81(4):1161–72.
6. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. Am J Med. 2001;110(7):37–46.
7. Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. Physiol Rev. 1999;79(1):215–62.
8. Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. “How do cardiomyocytes die?” Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. J Card Fail. 2006;12(5):381–91.
9. Giordano FJ. Oxygen , oxidative stress , hypoxia , and heart failure. J Clin Invest. 2005;115(3):500–8.
10. Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. Pharmacol Ther. 2004;104(1):1–16.
11. Cleutjens JP. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. Cardiovasc Res. 1996;32(5):816–21.
12. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the

- failing heart. *Circ Res*. 2002;90(5):520–30.
13. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 2007;49(2):241–8.
  14. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(4):379–88.
  15. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. 2007;1140–51.
  16. Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*. 2007;116(4):434–48.
  17. Anand IS. Ventricular remodeling without cellular contractile dysfunction. *J Card Fail*. 2002;8(6 SUPPL.).
  18. Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(2):150–64.
  19. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: Roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):482–90.
  20. Deel ED Van, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD, et al. Extracellular SOD protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction.pdf. 2009;44(7):1305–13.
  21. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*. 1996;91(1):10–4.
  22. Fu H, Li G, Liu C, Li J, Wang X, Cheng L, et al. Probucol prevents atrial remodeling by inhibiting oxidative stress and  $\text{tnf-}\alpha/\text{nf-}\kappa\text{b/tgf-}\beta$  signal transduction pathway in alloxan-induced diabetic rabbits. *J Cardiovasc*

- Electrophysiol. 2015;26(2):211–22.
23. Xiao X, Hou H, Lin V, Ho D, Tran K, Che B, et al. Probucol Protects Rats from Cardiac Dysfunction Induced by Oxidative Stress following Cardiopulmonary Resuscitation. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
  24. Murino Rafacho BP, Dos Santos PP, Gonçalves ADF, Fernandes AAH, Okoshi K, Chiuso-Minicucci F, et al. Rosemary supplementation (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuates cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. *PLoS One*. 2017;12(5):1–17.
  25. Buttros JB, Bergamaschi CT, Ribeiro DA, Fracalossi ACC, Campos RR. Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Pharmacology*. 2009;84(1):29–37.
  26. Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphata. *Life Sci*. 2010;86(5):178–84.
  27. Sulistyowati E, Hsu J-H, Cheng Y-B, Chang F-R, Chen Y-F, Yeh J-L. Indonesian herbal medicine prevents hypertension-induced left ventricular hypertrophy by diminishing NADPH oxidasedependent oxidative stress. *Oncotarget*. 2017;8(49):86784–98.
  28. Vasanthi H R, ShriShriMal N, Das D K. Phytochemicals from Plants to Combat Cardiovascular Disease. *Curr Med Chem*. 2012;19(14):2242–51.
  29. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231–46.
  30. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li H Bin. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 2014;6(12):6020–47.
  31. Seraglio SKT, Schulz M, Nehring P, Della Betta F, Valese AC, Daguer H, et al.

- Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. *Food Chem.* 2018;239:649–56.
32. Plaza M, Batista AG, Cazarin CBB, Sandahl M, Turner C, Ostman E. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba*. *Food Chem.* 2016;211(15):185–97.
33. Pereira LD, Barbosa JMG, Ribeiro Da Silva AJ, Ferri PH, Santos SC. Polyphenol and Ellagitannin Constituents of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Chemical Variability at Different Stages of Fruit Development. *J Agric Food Chem.* 2017;65(6):1209–19.
34. Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SAE, Graf BA, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem.* 2008;56(3):705–12.
35. Hügel HM, Jackson N, May B, Zhang AL, Xue CC. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine.* 2016;23(2):220–31.
36. Sousa De Brito E, De Araújo MCP, Alves RE, Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *J Agric Food Chem.* 2007;55(23):9389–94.
37. Sasaki R, Nishimura N, Hoshino H, Isa Y, Kadowaki M, Ichi T, et al. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of reti. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(11):1619–27.
38. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary Cyanidin 3-O- $\beta$ -D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *J Nutr.* 2003;133(7):2125–30.
39. Sun C-D, Zhang B, Zhang J-K, Xu C-J, Wu Y-L, Li X, et al. Cyanidin-3-Glucoside-Rich Extract from Chinese Bayberry Fruit Protects Pancreatic  $\beta$  Cells

- and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Med Food*. 2012;15(3):288–98.
40. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. *J Nutr*. 2010;140(3):527–33.
  41. Balisteiro DM, Araujo RL de, Giacaglia LR, Genovese MI. Effect of clarified Brazilian native fruit juices on postprandial glycemia in healthy subjects. *Food Res Int*. 2017;100(Pt 2):196–203.
  42. Batista ÂG, Soares ES, Mendonça MCP, da Silva JK, Dionísio AP, Sartori CR, et al. Jaboticaba berry peel intake prevents insulin-resistance-induced tau phosphorylation in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(10):1–10.
  43. Leite A V., Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Pastore GM, Maróstica Júnior MR. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *J Agric Food Chem*. 2011;59(6):2277–83.
  44. Larrosa M, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med*. 2010;31(6):513–39.
  45. Pinto MS, Carvalho JE de, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) using in vitro models. *J med food*. 2010;13(5):1027–35.
  46. Rozentsvit A, Vinokur K, Samuel S, Li Y, Gerdes AM, Carrillo-Sepulveda MA. Ellagic Acid Reduces High Glucose-Induced Vascular Oxidative Stress Through ERK1/2/NOX4 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(3):1174–87.
  47. Fagundes L, Macedo L, Macedo M, Pereira J, Granato D, Pereira L, et al. Effect

- of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chem.* 2013;137(1–4):122–9.
48. Mullarkey CJ, Edelstei D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation prodeucts: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(3):932–9.
  49. Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2011;147(2):191–201.
  50. Mullen W, McGinn J, Lean ME, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, et al. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 2002;50(18):5191–6.
  51. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem.* 2002;50(7):2200–6.
  52. Srinivasan P, Vadhanam M V., Arif JM, Gupta RC. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro. *Int J Oncol.* 2002;20(5):983–6.
  53. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. *Circ Res.* 1977;44(4):503–12.
  54. Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980;104(4):179–83.
  55. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjørnerheim R, Bjørnerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl ....* 2000;89(4):1445–54.
  56. Fioretto JR, Querioz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to

- protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;282(4):H1327–33.
57. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, et al. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res*. 2002;22(11):1353–64.
  58. Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, et al. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(3):325–30.
  59. Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive doppler-derived myocardial performance index: Correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr*. 1997;10(2):169–78.
  60. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline Echocardiographic Values for Adult Male Rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17(2):161–7.
  61. Slama M. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *AJP Hear Circ Physiol*. 2005;289(3):H1131–6.
  62. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation*. 1995;91:2642–54.
  63. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*. 2003;81(3):321–6.
  64. Teixeira LN, Stringheta PC, Oliveira FA De. Comparação de métodos para

- quantificação de antocianinas. *Rev Ceres*. 2008;55(4):297–304.
65. W.Brand-Williams, M.E.Cuvelier, C.Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *food Sci Technol*. 2007;28(1):25–30.
  66. Minicucci MF, Azevedo PS, Duarte DR, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, et al. Comparison of different methods to measure experimental chronic infarction size in the rat model. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89(2):83–7, 93–8.
  67. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Guizoni DM, et al. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol*. 2011;151(2):242–3.
  68. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):309–16.
  69. Wilkinson JH. Introduccion al diagnostico enzimatico. Toray E, editor. Barcelona; 1965.
  70. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic Differentiation of Distinct Muscle Types at the Level of Enzymatic Organization. *Eur J Biochem*. 1969;10(2):198–206.
  71. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal*. 1974;22:123–75.
  72. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985;153(1):23–36.
  73. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333(1):145–51.

74. Pereira B, Costa-Rosa LFBP, Bechara EJH, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenalectomized rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 1998;31(6):827–33.
75. Zakowski J, Tappel A L. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1978;526(1):65–76.
76. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM BM. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes.* 1981;30(3):235–41.
77. AZ, Reznick PL. Abstract Oxidative damage to proteins : spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzym.* 1994;233:357–63.
78. Singh NP, McCoy MT, Tice RR SE. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Electrophoresis.* 1988;175(1):184–91.
79. Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The Single Cell Gel (SCG) Assay: An Electrophoretic Technique for the Detection of DNA Damage in Individual Cells. 1991;157–64.
80. Idikio HA. Postmyocardial infarct remodeling and heart failure: Potential contributions from pro- and antiaging factors. *Cardiol Res Pract.* 2011;1(1).
81. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, et al. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(2):163–70.
82. Wu SB, Dastmalchi K, Long C, Kennelly EJ. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *J Agric Food Chem.* 2012;60(30):7513–25.
83. Wu SB, Long C, Kennelly EJ. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba,

- an emerging fruit crop from Brazil. *Food Res Int.* 2013;54(1):148–59.
84. Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod.* 2006;69(8):1228–30.
  85. Plaza M, Batista ÂG, Cazarin CBB, Sandahl M, Turner C, Östman E, et al. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. *Food Chem.* 2016;211:185–97.
  86. Wu SB, Wu J, Yin Z, Zhang J, Long C, Kennelly EJ, et al. Bioactive and marker compounds from two edible dark-colored *Myrciaria* fruits and the synthesis of jaboticabin. *J Agric Food Chem.* 2013;61(17):4035–43.
  87. Nile SH, Park SW. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition.* 2014;30(2):134–44.
  88. Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC NR. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest.* 1988;82(6):2017–25.
  89. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. *Cardiovasc Res.* 1997;33(2):243–57.
  90. Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Gruenke LD, Cymerman Craig J. Dual carbon-labeled isotope experiments using D-[6-14C] glucose and L-[1,2,3-13C3] lactate: A new approach for investigating human myocardial metabolism during ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 1985;5(5):1138–46.
  91. Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA, Gertz EW. Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. *J Clin Invest.* 1990;85(5):1648–56.

92. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, De Las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(2):271–7.
93. Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR, et al. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor- $\alpha$  in pacing-induced heart failure. *Circulation*. 2002;106(5):606–12.
94. Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res*. 1998;83(10):969–79.
95. Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Tardy I, Papageorgiou I, Dorsaz PA, et al. Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(11):2025–34.
96. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*. 1996;94(11):2837–42.
97. Saks VA, Favier R, Guzun R, Schlattner U, Wallimann T. Molecular system bioenergetics: Regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol*. 2006;577(3):769–77.
98. Neely JR, Morgan HE. Relationship Between Carbohydrate and Lipid Metabolism and the Energy Balance of Heart Muscle. *Annu Rev Physiol*. 1974;36(1):413–59.
99. Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FLJ, Donnelly TJ. Loss of myocardial

- protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation*. 1993;87(3):881–92.
100. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813(7):1360–72.
  101. Hue L, Rider MH. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J*. 1987;245(2):313–24.
  102. Randle PJ. Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans*. 1986;14(5):799–806.
  103. Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*. 2007;146(1):26–39.
  104. Clarke B, Wyatt KM, McCormack JG. Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: Evidence for an indirect mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(2):341–50.
  105. Higgins AJ, Morville M, Burges RA, Blackburn KJ. Mechanism of action of oxfenicine on muscle metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981;100(1):291–6.
  106. Kruszynska YT, McCormack JG, McIntyre N. Effects of glycogen stores and non-esterified fatty acid availability on insulin-stimulated glucose metabolism and tissue pyruvate dehydrogenase activity in the rat. *Diabetologia*. 1991;34(4):205–11.
  107. Schwartz GG, Greyson C, Wisneski JA, Garcia J. Inhibition of fatty acid metabolism alters myocardial high-energy phosphates in vivo. *Am J Physiol*. 1994;267(1 Pt 2):H224–31.
  108. Stanley WC. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol Rev*. 2005;85(3):1093–129.

109. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais Livres: Conceitos E Mecanismo De Lesão. *Rev Ass Med Bras*. 1997;43(1):61–9.
110. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res Toxicol*. 1987;189(2):103–12.
111. Attia SM, Ahmad SF, Zoheir KM, Bakheet SA, Helal GK, Abd-Allah AR, et al. Genotoxic evaluation of chloroacetonitrile in murine marrow cells and effects on DNA damage repair gene expressions. *Mutagenesis*. 2014;29(1):55–62.
112. Vivas N, Laguerre M, Glories Y, Bourgeois G, Vitry C. Structure Simulation of Two Ellagitannins From. *Phytochemistry*. 1995;39(5):1193–9.
113. Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett*. 2005;579(14):3029–36.
114. Bayram B, Ozcelik B, Grimm S, Roeder T, Schrader C, Ernst IMA, et al. A Diet Rich in Olive Oil Phenolics Reduces Oxidative Stress in the Heart of SAMP8 Mice by Induction of Nrf2-Dependent Gene Expression. *Rejuvenation Res*. 2012;15(1):71–81.
115. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev*. 2012;32(4):687–726.
116. Li J, Ichikawa T, Villacorta L, Janicki JS, Brower GL, Yamamoto M, et al. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(11):1843–50.
117. Haslam E. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime.

- Phytochemistry. 2007;68(22–24):2713–21.
118. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011;50(3):586–621.
  119. Schultz JEJ, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, et al. TGF- $\beta$ 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest*. 2002;109(6):787–96.
  120. Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, Correll RN, Fu X, Schips T, et al. Fibroblast-specific TGF- $\beta$ -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 2017;127(10):3770–83.
  121. Desmoulière A, Geinoz AFG. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured. *JcbRupressOrg*. 1993;122(1):103–11.
  122. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2007;282(32):23337–47.
  123. Stephen P. Evanko, Susan Potter-Perigo, Loreen J. Petty, Gail A. Workman and TNW. Hyaluronan Controls the Deposition of Fibronectin and Collagen and Modulates TGF- $\beta$ 1 Induction of Lung Myofibroblasts. *Matrix Biol*. 2015;42:74–92.
  124. Ding J, Kwan P, Ma Z, Iwashina T, Wang J, Shankowsky HA, et al. Synergistic effect of vitamin D and low concentration of transforming growth factor beta 1, a potential role in dermal wound healing. *Burns*. 2016;42(6):1277–86.
  125. Poosti F, Bansal R, Yazdani S, Prakash J, Post E, Klok P, et al. Selective delivery of IFN- $\gamma$  to renal interstitial myofibroblasts: A novel strategy for the treatment of

- renal fibrosis. FASEB J. 2015;29(3):1029–42.
126. Silva RM, Pereira LD, Vêras JH, Vale CR, Chen-Chen L SS. Protective effect and induction of DNA repair by *Myrciaria cauliflora* seed extract and pedunculagin on cyclophosphamide-induced genotoxicity. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen. 2016;810:40–7.
127. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J. 2008;Mar 22(3):659–61.