

Pamela Nayara Modesto

Influência do extrato de chá verde na remodelação cardíaca induzida por administração de doxorubicina.

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

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Paula Schimidt Azevedo Gaiolla
Coorientador(a):Prof(a). Elenize Jamas Pereira

Botucatu
2015

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

Modesto, Pamela Nayara.

Influência do extrato de chá verde (*camellia sinensis*)
na remodelação cardíaca induzida por administração de
doxorrubicina / Pamela Nayara Modesto. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Coorientador: Elenize Jamas Pereira

Capes: 4010100

1. Chá verde. 2. Remodelação ventricular. 3.
Doxorrubicina. 4. Stress oxidativo.

Palavras-chave: Chá verde; Doxorrubicina; Remodelação
Cardíaca.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rosangela e Marcio, que sempre estiveram ao meu lado e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Á minha irmã, Natalia, com quem partilho todos os momentos de minha vida. Obrigada pelo carinho, amizade e paciência.

Ao meu padrasto Marcello, que acredita em mim, me incentiva e me dá apoio constante.

Á minha tia Elisabete, que está sempre ao meu lado, sendo o meu maior exemplo de força e determinação.

Á toda minha família, pela presença e incentivo constante.

***AGRADECIMENTOS
ESPECIAIS***

Á Deus, que colocou todos esses sonhos em meu coração e me ensinou a ter fé, me dando forças e sabedoria para busca-los.

Meu agradecimento especial á minha orientadora Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla, que ao longo desses anos não mediu esforços e dividiu comigo todos os seus ensinamentos e experiências profissionais, me dando a oportunidade de crescer a cada dia. Obrigada pela paciência e pela confiança que depositou em mim.

Á minha coorientadora Elenize Jamas Pereira que me dedicou seu tempo e dividiu comigo toda sua experiência em laboratório. Obrigada pela sua colaboração, amizade, companheirismo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do grupo de pesquisa:

Sergio Alberto Rupp de Paiva,

Leonardo Antônio Mamede Zornoff,

Marcos Minicucci,

Bertha Furlan Polegato.

Vocês são meu espelho. Obrigada pelo apoio, tenho orgulho de poder aprender e trabalhar com vocês.

As Dras.:

Fernanda Chiuso Minicucci

Meliza Goi Roscani,

Silmeia Garcia Zanati Bazan

Pela colaboração na realização de etapas do projeto.

Aos pós-graduandos e amigos:

Renata Candido, Bruna Rafacho, Priscila, Bruna Pereira, Diego, Andrea, Amanda, Ana Carolina e Renan.

Obrigada pela amizade, companhia e risos de todos os dias.

À equipe do laboratório de experimental:

Mario, Vitor e todos os outros que colaboraram para a realização desse trabalho, sem vocês isso não seria possível.

Aos funcionários da seção de pós-graduação e a todos os outros que não foram aqui citados, mas que contribuíram de alguma forma ao longo desses dois anos.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	4
Introdução.....	7
Objetivos.....	17
Material e métodos.....	19
Delineamento.....	20
Preparo da ração com extrato de chá verde.....	21
Indução da cardiotoxicidade pela doxorrubicina.....	21
Estudo ecocardiográfico.....	22
Eutanásia e coleta de material biológico.....	23
Avaliação do estresse oxidativo.....	23
Western Blotting para avaliar TNF- α e colágeno I e III.....	24
Determinação da atividade da metaloprotease cardíaca: zimografia.....	27
Estudo morfológico.....	28
Estudo histológico utilizando imunohistoquímica.....	28
Análise estatística.....	29
Resultados.....	30
Ecocardiograma.....	31
Estresse oxidativo.....	32
Western blotting: TNF- α e colágeno I e III.....	33
Resultados da zimografia.....	35
Resultados histológicos.....	36
Discussão.....	38
Conclusão.....	45
Referências bibliográficas.....	47
Anexos.....	54

RESUMO

A doxorubicina (DOX) é um medicamento amplamente utilizado como agente quimioterápico, tendo eficácia no tratamento de inúmeros tipos de cânceres. Entretanto, o uso desse medicamento pode proporcionar efeitos indesejáveis, como a cardiotoxicidade. Diferentes mecanismos têm sido propostos para a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, como o estresse oxidativo, inflamação e alterações da matriz extracelular, levando ao processo de remodelação cardíaca. Chá verde (*Camellia sinensis*), uma das bebidas mais populares em todo o mundo, tem demonstrado uma relação positiva entre o seu consumo habitual e a proteção contra doenças cardiovasculares e contra alguns tipos de neoplasias. Isso se deve as propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antiapoptóticas encontradas nas catequinas, presentes no chá verde. Portanto, é possível que o mesmo atenuar os efeitos cardiotóxicos da doxorubicina, retardando o processo de remodelação cardíaca. O objetivo do presente estudo foi avaliar se o extrato de chá verde atenua a remodelação cardíaca induzida pela doxorubicina, por meio da avaliação de variáveis bioquímicas, celulares, intersticiais e variáveis morfofuncionais cardíacas. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos com peso de 300 a 350 gramas. Esses animais foram divididos em 4 grupos: CP (controle) que receberam ração padrão e administração intraperitoneal de solução salina, CCV (controle + chá verde) que receberam ração adicionada de extrato de chá verde e administração intraperitoneal de solução salina, DX (doxorubicina) que receberam ração padrão e administração intraperitoneal de doxorubicina e DX-CV (doxorubicina + chá verde) que receberam ração adicionada de extrato de chá verde e administração intraperitoneal de doxorubicina. A ração foi ofertada por 35 dias e no 33º dia foi feita a infusão de doxorubicina ou de solução salina foram na mesma proporção (20 mg/Kg em dose única) e os animais foram eutanasiados 48 horas após injeção da

droga. Os ratos foram submetidos ao ecocardiograma antes e 48 horas após a injeção da doxorubicina. Foi realizada avaliação do estresse oxidativo por espectrofotometria (Hidroperóxido, catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase), dosagem através do western blotting do TNF- α e colágeno I e III e zimografia para avaliação da atividade da metaloproteinase, avaliação da área seccional do miócito e de fibrose pela porcentagem de colágeno. Além disso, o tecido cardíaco foi submetido a microscopia óptica com coloração Picrosirius red para análise do colágeno e histologia por imunofluorescência. Foi observado que a doxorubicina induziu a remodelação cardíaca acompanhada de disfunção diastólica atenuada pelo chá verde, aumentou os níveis de hidroperóxido de lipídeos e diminuiu os níveis de glutathione peroxidase, induzindo a cardiotoxicidade mediada pelo estresse oxidativo. Porém os animais que receberam doxorubicina + chá verde (DX-CV), tiveram menor formação de hidroperóxido de lipídeos e maior atividade enzimática. Houve também aumento na produção do TNF- α no coração de ratos que receberam doxorubicina independente da presença do chá verde, assim como houve aumento da fração do metaloprotease 2 intermediária. Quanto a matriz extracelular, não houve a presença de fibrose quando avaliadas através do colágeno I e III, e porcentagem de colágeno intersticial. A área seccional do miócito, apresentou – se maior nos animais que receberam doxorubicina independente da presença do chá. Em conclusão: nesse estudo o chá verde atenuou alguns parâmetros de remodelação cardíaca e melhorou o estresse oxidativo do coração, após 48 horas da aplicação da droga.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is a widely used drug as a chemotherapeutic agent having efficacy in the treatment of numerous cancers. However, use of this drug may provide undesirable effects such as cardiotoxicity. Various mechanisms have been proposed for doxorubicin cardiotoxicity, such as oxidative stress, inflammation and alterations in the extracellular matrix, leading to cardiac remodeling. Green tea (*Camellia sinensis*), the most popular drinks in the world, has demonstrated a positive relationship between regular consumption and protection against cardiovascular disease and some types of cancer. This is the antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic found in catechins present in green tea. It is therefore possible that it mitigates the cardiotoxic fond of doxorubicin, slowing the process of cardiac remodeling. The aim of this study was to evaluate whether the green tea extract attenuates cardiac remodeling induced by doxorubicin, through the evaluation of biochemical variables, cell phones, and interstitial cardiac morphofunctional variables. For this, was used male Wistar rats weighing 250 to 300 grams. These animals were divided into 4 groups: CP (control) received standard chow and intraperitoneal administration of saline, CCV (control + green tea) receiving feed added green tea extract and intraperitoneal administration of saline, DX (Doxorubicin) who received standard chow and intraperitoneal administration of doxorubicin and DX-CV (doxorubicin + green tea) fed diets with added green tea extract and intraperitoneal administration of doxorubicin. The feed was supplied for 35 days and on day 33° doxorubicin or infusion of saline solution were carried out in the same ratio (20 mg / kg single dose) and the animals were euthanized 48 hours after drug injection. The rats were subjected to the echocardiography before and 48 hours after injection of doxorubicin. Was conducted evaluation of oxidative stress by spectrophotometry (hydroperoxide, catalase, superoxide dismutase and glutathione

peroxidase), dosed using western blotting of TNF- α and collagen I and III and zymography to evaluate the metalloproteinase activity. Furthermore, the cardiac tissue was subjected to optical microscopy to Picrosirius red staining and histological analysis of collagen by immunofluorescence. It was observed that doxorubicin induced cardiac remodeling monitored diastolic dysfunction was attenuated by green tea, increased lipid hydroperoxide levels and decreased levels of glutathione peroxidase, mediated cardiotoxicity induced by oxidative stress, but the animals receiving doxorubicin + green tea (DX-CV), had less formation of lipid hydroperoxide and higher enzyme activity. There was also an increase in TNF- α production in hearts of mice receiving doxorubicin regardless of the presence of green tea, as well as increasing the fraction of the intermediate 2 metalloprotease. As the extracellular matrix, there was the presence of fibrosis when evaluated through collagen I and III and percentage of interstitial collagen and the sectional area of the myocyte, presented - is higher in animals receiving doxorubicin independent of tea presence. In conclusion, this study green tea attenuated some parameters of cardiac remodeling and improved the oxidative stress of the heart, after 48 hours of drug application.

INTRODUÇÃO

Essa droga é amplamente utilizada como agente quimioterápico e vem sendo considerada uma das mais importantes e potentes no tratamento de vários tipos de cânceres (RODRIGUEZ, et al 2013; ZHU et al, 2008).

A descoberta de atividade antineoplásica das antraciclinas levou a sua utilização em larga escala (FERREIRA, et al 2007). Entretanto, assim como outros agentes antineoplásicos, as antraciclinas apresentam efeitos colaterais sobre órgãos e sistemas e o principal órgão afetado é o coração (MATSUBARA & FERREIRA, 2005). Em recente metanálise, observou-se que esquemas quimioterápico com doxorubicina aumentam em 4,96 vezes a chance de doença cardíaca quando comparado com esquemas sem doxorubicina (SMITH, et al 2010)

Atualmente foram descritos alguns fatores de risco para o desenvolvimento de toxicidade associada à doxorubicina, tais como: sexo feminino, idade maior que 70 anos, terapia combinada, radioterapia mediastinal, doença cardíaca prévia (doença aterosclerótica coronariana, valvar ou miocárdica) e hipertensão arterial (SANTOS et al, 2009). Adicionalmente, a cardiotoxicidade pode estar relacionada à susceptibilidade individual, ao tempo de tratamento e à dose total da medicação utilizada (SÁ et al, 2009).

São descritas 4 formas de cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina: aguda, subaguda, crônica e tardia (NASCIMENTO & MARTINS, 2005; SOUZA et al, 2009).

A cardiotoxicidade aguda ocorre durante o ciclo de quimioterapia (SÁ et al, 2009; SOUZA, 2009) e afeta de 0,4 a 41% dos pacientes, principalmente quando o fármaco é administrado como uma infusão intravenosa rápida ou em bolus. Os sinais são mais proeminentes durante as primeiras horas após a administração e

desaparecem cerca de duas a três semanas (SIMUNEK et al, 2009). Clinicamente, a cardiotoxicidade aguda se manifesta por hipotensão, taquicardia, arritmias. O aparecimento de disfunção sistólica pode ou não acontecer nessa fase (ZHU et al, 2008). Os achados eletrocardiográficos, observados são alterações inespecíficas da repolarização ventricular, complexos de baixa voltagem, alterações inespecíficas do segmento ST, taquicardia sinusal, extrassístoles ventriculares e supraventriculares e prolongamento do segmento QT (SOUZA, 2009). Do ponto de vista bioquímico, observam-se aumentos significativos nos níveis séricos de desidrogenase láctica e creatinofosfoquinase (ABOU et al, 2003).

A cardiotoxicidade subaguda é mais rara e é descrita como ocorrendo em dias a semanas após o uso da doxorubicina e manifesta-se como pericardite e/ou miocardite (SOUZA et al,2009).

Cardiotoxicidade crônica é definida como toxicidade ocorrida fora do ciclo de quimioterapia, aparecendo mais tardiamente (SÁ et al, 2009). Ela ocorre de semanas a meses após o término da quimioterapia e se desenvolve principalmente, nos pacientes que receberam dose total maior que 550mg/m² (Souza, 2009). Nessa forma de cardiotoxicidade pode ocorrer o surgimento de cardiomiopatia, com dilatação cardíaca e disfunção sistólica acompanhados de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (MACHADO et al, 2008). Adicionalmente, podem ocorrer hipotensão grave, taquicardia e redução significativa da voltagem do complexo QRS (NASCIMENTO & MARTINS, 2005). Trata-se da cardiotoxicidade mais conhecida e estudada, devido às repercussões clínicas mais graves (SOUZA, 2009).

A cardiotoxicidade tardia ocorre anos após o término da quimioterapia, mesmo com doses de doxorubicina consideradas menores (inferiores a 480mg/m²). Os pacientes são assintomáticos, ocorrendo um período durante o qual nenhuma manifestação clínica é observada, embora haja disfunção sistólica ao exame ecocardiográfico (COVE-SMITH et al,2014) . Seguindo esse período de latência, há deterioração progressiva da função ventricular esquerda, com surgimento de sintomas clínicos, que são associados à alta incidência de morbidade e mortalidade (NASCIMENTO, 2009).

Embora o risco de cardiotoxicidade pela doxorubicina seja cumulativo e proporcional a dose utilizada, observa-se que a lesão miocárdica acontece após cada dose administrada. Biópsias cardíacas realizadas após administração de doxorubicina, na ausência de sintomas de cardiomiopatia mostraram alterações patológicas precoces. (UNVERFERTH et al,1983; IQBAL, et al 2008; SAWYER, 2013).

Considerando as diferentes apresentações clínicas da cardiotoxicidade, observa-se a dificuldade de estudá-la em humanos. A cardiotoxicidade aguda, por exemplo, resolve-se em semanas e pode ser imperceptível. A cardiotoxicidade tardia pode ter comportamento latente e assintomático por anos até que o paciente manifeste sintomas. Portanto, a utilização de diferentes modelos experimentais tem por finalidade, estudar mecanismos de lesão induzidas pela doxorubicina e potenciais compostos que possam atenuar estes danos (SEGREDO et al, 2013). Existem diversos modelos experimentais para o estudo da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina que simulam os quadros clínicos agudos e crônicos desenvolvidos por seres humanos. Em geral, os modelos de toxicidade aguda são

obtidos com a administração de 1 dose de doxorubicina e avaliação do coração horas a 1 semana após. Os modelos de cardiotoxicidade crônica são comumente obtidos com a administração de doses semanais da droga e avaliação cardíaca a partir de 15 dias de tratamento (IQBAL et al, 2008, SEGREDO et al, 2013; COVE-SMITH et al, 2014).

Existem vários mecanismos participantes da cardiotoxicidade induzida por antraciclinas como, por exemplo, o estresse oxidativo e a inflamação (KAPUSTA, 2001)

Em relação ao estresse oxidativo observa-se que as antraciclinas, principalmente a doxorubicina pode ser substrato para várias oxirredutases, formando radical semiquinona. Esse radical interage com o ferro, formando um complexo ferro-antraciclina. Esse complexo reduz o oxigênio formando superóxido. O superóxido por sua vez apresenta alta afinidade à cardiolipina, principal componente da membrana interna da mitocôndria e necessária para que ocorra a fosforilação oxidativa. Estudos mostram, ainda que existe afinidade direta da doxorubicina pela cardiolipina. A cardiolipina é rica em fosfolípides e, portanto, quando interage com superóxido ou doxorubicina, é susceptível a lipoperoxidação. A peroxidação lipídica da membrana interna da mitocôndria impede o trânsito de transportadores iônicos gerando comprometimento da transferência de energia e favorecendo maior formação de espécies reativas de oxigênio.

Outro ponto importante é que foram observadas menores concentrações de antioxidantes na vigência da cardiotoxicidade pela doxorubicina. Adicionalmente, a doxorubicina pode se ligar a óxido nítrico sintase, aumentando a produção de superóxido e reduzindo a produção de óxido nítrico (LAMBERTI et al, 2014).

Recentemente, existe a descrição de novo mecanismo de lesão no qual a doxorubicina se liga à enzima topoisomerase II (TOPIIB). Essa enzima é responsável pela tensão e conformação espacial do DNA. Assim, a ligação da doxorubicina com a TOPIIB, quebra o DNA levando a morte celular, disfunção mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio (SAWYER, 2013).

Portanto, o aumento do estresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade cardíaca por lesar o miocárdio de diferentes formas. As EROS são tóxicas aos miócitos levando a dano no DNA, modificação de proteínas e lipoperoxidação (STERBA et al 2013), como mostra a figura 1. Essas alterações podem levar ao aumento da inflamação, morte celular e disfunção do miócito.

Adicionalmente, EROS participam de vias da remodelação cardíaca, por meio da ativação de fatores de transcrição, inflamação, ativação de metaloproteases e dano mitocondrial. Essas alterações promovem hipertrofia, fibrose, apoptose e disfunção miocárdica (TSUTSUI, 2011, STERBA et al 2013).

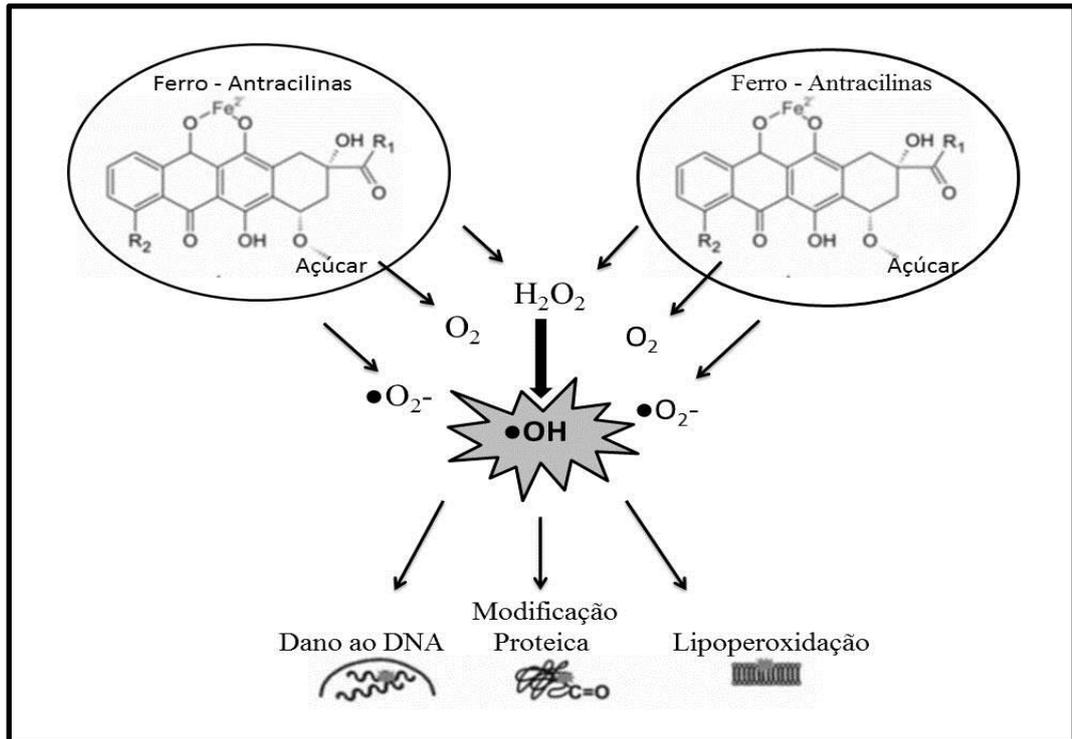


Figura 1 – Mecanismos de lesão direta causada pela doxorrubicina

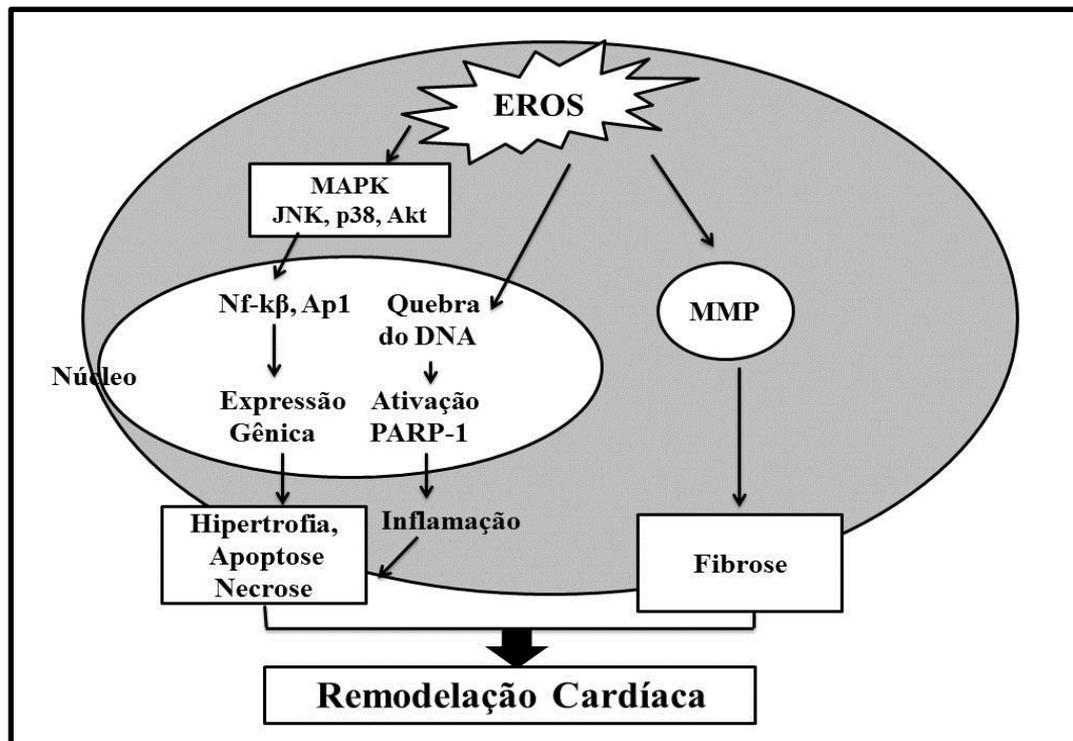


Figura 2. Participação das EROS em vias de remodelação cardíaca levando a hipertrofia, fibrose, apoptose e disfunção cardíaca.

Considerando a inflamação, as antraciclinas produzem também uma resposta sistêmica induzida por droga, que é mediada por citocinas, em particular Interleucina 1- beta, TNF alfa e interleucina 6. As citocinas aumentam a atividade da NADPH Oxidase favorecendo a produção de superóxido.

Os benefícios de se utilizar doxorrubicina como quimioterápico é indiscutível e aparentemente os mecanismos de ação antitumoral e cardiotoxico são diferentes. Porém, o aparecimento de insuficiência cardíaca pode comprometer o tratamento da neoplasia. Este fato pode ser evidenciado pela alta mortalidade atribuída à insuficiência cardíaca que se aproxima de 30% (MC MURRAY, 2010).

Portanto, o estudo de compostos que possam atenuar a cardiotoxicidade da doxorrubicina, faz-se necessário para otimização do tratamento de alguns pacientes com neoplasias.

Chá verde (*Camelliasinensis*) é uma das bebidas mais populares em todo o mundo. Estudos experimentais têm estabelecido uma correlação positiva entre o consumo de chá verde e a proteção contra doenças cardiovasculares e contra alguns tipos de neoplasias (JOCHMANN et al, 2008).

A maioria dos benefícios do chá verde pode ser atribuída aos flavonóides polifenolicos, conhecidos como as catequinas (CLEMENT, 2009). As principais catequinas do chá verde são epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina 3-galato (ECG) e epigalocatequina 3-galato (EGCG), sendo que esses polifenóis são responsáveis por até 40% do peso seco no chá verde (KODAMA et al, 2010).

Os efeitos potenciais das catequinas sobre a saúde não dependem somente da quantidade consumida, mas também sobre sua biodisponibilidade, que parece ser variável (CABRERA et al, 2006).

O metabolismo de polifenóis ocorre através de uma via comum. Durante o curso de absorção os polifenóis são conjugados no intestino delgado e no fígado. Este processo inclui metilação, sulfatação e glucuronidação. Os polifenóis são capazes de penetrar nos tecidos, particularmente aqueles em que são metabolizados, mas a sua capacidade de se acumular nos tecidos-alvo específicos precisa ser mais investigada (MANACH et al, 2004).

Estes efeitos benéficos atribuídos ao chá verde ocorrem, em grande parte, a sua ação antioxidante, pois o chá verde é fonte de polifenóis, carotenoides, tocoferóis, ácido gálico, ácido ascórbico e minerais como Cr, Mn, Se e Zn.

Dentre as propriedades antioxidantes das catequinas destacam-se: a detoxificação de espécies reativas de oxigênio, a inibição de fatores de transcrição redoxi sensíveis, o efeito quelante de atividade redoxi, a inibição de enzimas pró-oxidantes e a indução de produção de enzimas anti-oxidantes (CABRERA et al, 2006).

Adicionalmente, o chá verde tem como propriedades atividade antiinflamatória, antiproliferativa e antiaterosclerótica, que levou a inclusão do chá verde em suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais (KODAMA et al, 2010),

O impacto favorável do chá verde nas doenças cardiovasculares parece estar relacionado à ação das catequinas sobre o sistema vascular. As propriedades

antioxidantes, antiinflamatórias, antitrombóticas, antiproliferativas e redutoras de LDL conferidas ao chá verde, atenuam a aterogênese e melhoram a função endotelial (JOCHMANN et al, 2008).

Um grande estudo observacional, incluindo 40.530 indivíduos no Japão, seguidos por até 11 anos, demonstrou uma redução significativa do risco de doença cardiovascular com o consumo habitual de chá verde. Observou-se ainda reduções significativas nos níveis pressão arterial, LDL colesterol e estresse oxidativo (KURIYAMA ,2008).

Em conclusão, é possível observar que a cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina pode ocorrer devido ao estresse oxidativo e inflamação que levam ao processo de remodelação cardíaca. Considerando que o chá verde possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, é possível que o mesmo atenuar os efeitos cardiotóxicos da doxorrubicina, atenuando o processo de remodelação cardíaca.

OBJETIVOS

Avaliar se o extrato de chá verde atenua a remodelação cardíaca induzida pela doxorubicina, por meio da avaliação de variáveis bioquímicas (estresse oxidativo, inflamação), celulares e intersticiais (metaloproteases 2 e colágeno) e variáveis morfofuncionais cardíacas.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 21 dias e aproximadamente 100 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu. Os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo CP – que receberam ração padrão por 35 dias e no 33º dia receberam injeção intraperitoneal de solução salina;

Grupo CCV – que receberam ração adicionada de extrato de chá verde por 35 dias e no 33º dia receberam injeção intraperitoneal de solução salina;

Grupo DX – que receberam ração padrão por 35 dias e no 33º dia receberam injeção intraperitoneal de Doxorubicina;

Grupo DX-CV – que receberam ração adicionada de extrato de chá verde por 35 dias e no 33º dia receberam injeção intraperitoneal de Doxorubicina;

Os animais foram acondicionados no biotério em gaiolas individuais, 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.

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

Os animais foram submetidos à eutanásia 48 horas após a injeção intraperitoneal de doxorubicina ou solução salina. Para isso foi feita a aplicação intraperitoneal de tiopental sódico (50 mg/kg), de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal e em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da FMB – UNESP, protocolo 898/2011 (Anexo 1).

Preparo da Ração com extrato de chá verde

O extrato de chá verde utilizado foi Polyphenon 60 (Sigma-Aldrich Canadá, Oakville, ON, Canadá) composto por 65,4% de catequinas, das quais 29,2% correspondem a galato de epigallocatequina, 21% epigallocatequina, 7,9% galato de epicatequina e 7,3% epicatequina. A concentração utilizada foi 0,25%, isto é, 2,5 g de extrato de chá verde por kg de dieta.

Considerando consumo de dieta do rato Wistar, em torno de 30g/dia, cada animal fez ingestão equivalente a seis a sete copos de chá verde/dia em humanos de 60kg (AKHALAGHI & BANDY, 2010).

Indução da cardiotoxicidade pela doxorubicina

A cardiotoxicidade foi induzida por meio de injeção intraperitoneal em dose única de 20 mg/kg de peso de Doxorubicina (KYZAKI et al, 2006). Os animais foram estudados 48 horas após a injeção da droga e constituíram os grupos DX. O grupo controle foi constituído por ratos de mesmo sexo, peso e idade, que receberam injeção intraperitoneal de salina, na mesma proporção de volume do grupo DX.

Estudo Ecocardiográfico

Todos os animais foram submetidos a estudo ecocardiográfico antes da injeção intraperitoneal de doxorubicina, para avaliar a homogeneidade entre os grupos estudados e 48 horas após a injeção da doxorubicina ou da solução salina. Para isso, os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma transtorácico. Foi utilizado equipamento da General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. Todas as variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography (LANG, et al, 2005) e foram obtidas a partir dos cortes paraesternal longo e curto e apical quatro e cinco câmaras. Os exames foram realizados pelo mesmo examinador, que era cego em relação ao tratamento. As variáveis analisadas foram: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessura diastólica (EDPP) da parede posterior do VE; e diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) (LITWIN, et al 1995). A espessura relativa do VE foi calculada pela fórmula $[(2 \times EDPP) / DDVE]$ (GANAU, et al 1992). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo): $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$; 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; 3) fração de variação das áreas sistólica e diastólica da cavidade ventricular; 4) velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S)

obtida por Doppler tissular. Adicionalmente foi calculado o índice de performance miocárdica do VE (índice de Tei) (TEI, et al 1997). A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) corrigido pela raiz quadrada de RR ($RR=60000/FC$); 4) pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (A') obtidas por Doppler tissular; e 5) razão entre as ondas E e E' (E/E') (WATSON et al 2004; SLAMA, et al 2005).

Eutanásia e coleta de material biológico

Após o estudo ecocardiográfico final, os animais foram anestesiados com dose excessiva de pentobarbital. Foram coletados pulmão, fígado e o coração que foi dissecado em átrio direito (AD), átrio esquerdo (AE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). O material foi colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80°C . O sangue foi coletado e centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos a 4°C , coletado o sobrenadante e armazenado a -80°C .

Avaliação do Estresse Oxidativo

Amostras de aproximadamente 200 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 15 minutos a -4°C . O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, hidropéroxido de lipídios e a atividade

das enzimas antioxidantes. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes são de procedência da Sigma (St. Louis, USA). Para determinar as proteínas totais empregou-se o método de Biureto, em que as ligações peptídicas das proteínas reagiram com íon cúprico, em meio alcalino, resultando em um complexo cor de violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteínas totais presentes na amostra (MOURA, 1982). A atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathione reduzida, azida sódica, EDTA, glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada, de acordo com Nakamura et al (1974). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH₂ e fenazina metassulfato (EWING & JANERO, 1995). A atividade enzimática da catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%) (AEBI, 1974). Leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca a 560nm. O hidroperóxido de lipídio (HP) foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe²⁺) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90%, segundo método descrito por JIANG et al, 1991.

Western Blot para avaliar a expressão do TNF- α e colágeno I e III

A expressão da proteína TNF- α e colágeno I e III foram realizados pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas,

eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 mL 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 (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total será analisada pelo método de Bradford utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.

Foi feito a Eletroforese em Gel após a quantificação da concentração proteica. As amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e 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 com 50 μ g de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada será de 5% e a concentração do gel de resolução. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética será efetuada a 30 min a 50 V e

2,5 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%).

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, em agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0 e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1,5 horas em agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram analisadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA) nos tempos padronizados para cada proteína estudada. Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH. As mesmas membranas serão lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos para o GAPDH e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente. Uma vez 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.

Determinação da atividade da metaloproteinase cardíaca: zimografia

Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X and 10 mM CaCl₂. Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 1,5 ml deste tampão. As amostras foram trituradas utilizando o aparelho Ultra Turrax, 21.000 rpm e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol 100%, e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 12% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean, a 80 V por 2 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado 2 vezes, por 30 minutos cada vez, em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 16 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de CaCl₂, em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação o gel foi corado com coumassie blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético (29). Os géis foram fotografados no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA), e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gelpro, que mede a área

de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel. Os resultados foram normalizados pelo animal controle que foi repetidos em todos os géis.

Estudo Morfológico

Os corações foram retirados, dissecados e os ventrículos direito (VD) e o esquerdo (VE), incluindo o septo interventricular. Em seguida os corações tiveram o VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice, em fragmento de 3 mm de espessura, que foi fixado em solução de formol tamponado a 4% por período de 48 horas, segundo relato prévio. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 micra e corados pela técnica de Picro Sirius red, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo, excluindo-se o colágeno perivascular.

As leituras foram feitas utilizando-se microscópio LEICA DM LS, objetiva 40X, com luz polarizada, acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cyberetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Estudo histológico utilizando imunofluorescência

Foram realizados cortes de 4mm do tecido incluído no bloco de parafina, que foi fixado em lâmina “starfrost”. As lâminas foram aquecidas por 5 a 10 minutos , a

60o C. Em seguida foram desparafinizadas com Xylol (1) (5 min), Xylol (2) (5min), álcool 100% (1), álcool 100% (2), álcool 90% e álcool 70%. As lâminas foram aquecidas em ácido cítrico no microondas (3X de 1 minuto) seguida de 20 minutos de resfriamento. Os cortes foram delimitados com caneta própria e lavados com água 1x e com PBS 2x de 2 minutos. O bloqueio para ligações inespecíficas foi realizado com albumina 5% por 30 minutos e retirado após com lavagem em PBS. O anticorpo Wheat germ agglutinin (WGA- FITC) Sigma L4895 1: 100 foi aplicado sobre os cortes e mantido em temperatura ambiente por 1hora. Em seguida as lamínas foram lavadas com PBS – 3X de 2 minutos. Para finalizar foi aplicado meio Prolong gold antifade (P36934), cobertura com lamínula e fixação de bordas com esmalte. A análise das imagens foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX51, com excitação e emissão entre 400 a 600 nm, acoplado a câmera fotográfica. Foram obtidas 6 fotos representativas de diferentes regiões do corte. Para cada lâmina foram obtidas medidas da área seccional de 100 a 150 miócitos. As medidas foram realizadas utilizando o programa Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD.

Análise estatística

A avaliação dos resultados foi realizada por meio de comparações entre os grupos utilizando – se o teste de análise de variância ANOVA de dois fatores independentes. O nível de significância adotado foi de 5%. As variáveis foram apresentadas em média \pm desvio padrão. Os dados com distribuição não normal foram normalizados para a comparação.

RESULTADOS

Ecocardiograma

Foi realizado ecocardiograma inicial para mostrar a homogeneidade entre os grupos estudados e não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma variável ecocardiográfica. Já após 48 da aplicação da droga, apresentaram diferenças estatísticas as seguintes variáveis: FC, AE/PC e ERP. A FC apresentou uma diminuição no grupo DX, porém o grupo DX-CV atenuou essa diminuição. O AE/PC teve um aumento no grupo DX e o grupo DX-CV diminuiu quando comparado aos outros grupos. A ERP teve um aumento no grupo DX e o grupo DX-CV diminuiu como mostra a tabela 1.

TABELA 1: Variáveis Ecocardiográficas.

VARIAVEL	CP (15)	CCV (15)	DX (15)	DX-CV (15)	P INT	P CCV	P DOX
FC (bpm)	367±9,50	335±10,5	290±9,82	305±9,82	0,02	0,39	<0,001
DDVE/PC (mm)	20,5±0,66	19,9±0,73	20,9±0,67	21,0±0,67	0,55	0,69	0,29
DSVE/PC (mm)	10,1±0,72	9,26±0,79	10,7±0,74	9,96±0,74	0,94	0,28	0,39
PP (mm)	1,39±0,04	1,36±0,05	1,50±0,05	1,32±0,05	0,14	0,03	0,52
PP/PC (mm/g)	4,39±0,17	4,15±0,19	4,76±0,17	3,97±0,17	0,12	0,006	0,58
AE/PC (mm/g)	10,1±0,45	11,1±0,48	12,3±0,45	11,3±0,48	0,004	0,93	0,01
AE/AO (mm)	1,03±0,05	1,15±0,05	1,14±0,05	1,15±0,05	0,26	0,22	0,27
A (cm/s)	78,0±4,63	78,4±4,88	49,0±4,63	68,4±4,88	0,05	0,03	<0,001
E (cm/s)	88,1±9,23	82,7±4,46	72,8±4,22	74,2±4,48	0,44	0,65	0,001
E/A	1,18±0,11	1,11±0,12	1,60±0,11	1,09±0,12	0,07	0,02	0,09
ERP	0,42±0,02	0,42±0,02	0,46±0,02	0,38±0,02	0,03	0,08	0,93
TRIVc (m/s)	4,08±0,06	3,99±0,06	4,11±0,06	4,08±0,06	0,60	0,30	0,35
Fração enc	0,51±0,02	0,53±0,03	0,49±0,02	0,53±0,02	0,72	0,24	0,74

CP: controle padrão, CCV: controle + chá verde, DX: doxorubicina, DX-CV: doxorubicina + chá verde. FC: frequência cardíaca, DDVE/PC: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal, DSVE/PC: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal, PP: parede posterior, PP/PC: parede posterior corrigida pelo peso corporal, AE/PC: átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal, A: onda A, E: onda E, E/A: relação onda E onda A, ERP: espessura relativa da parede, TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico, Fração enc: fração de encurtamento. FC: CP≠CV; CP≠DX; DX-CV≠DX. PP/PC: DX≠DX-CV. AE/PC: DX≠CP; DX-CV≠DX. A: grupos que receberam DX≠ grupos que não receberam e grupo que recebem CV≠ do grupo que não receberam. E: grupos que receberam DX ≠ dos grupos que não receberam. E: grupos que receberam CV ≠ dos grupos que não receberam. ERP: DX≠DX-CV.

Estresse oxidativo

Em relação ao estresse oxidativo, o Hidroperóxido de lipídeo, teve um aumento no grupo DX e o grupo DX-CV atenuou essa elevação. A catalase, o superóxido dismutase e a glutatona peroxidase, ocorreu o inverso, elas tiveram uma

diminuição no grupo DOXO, porém o grupo DCV conseguiu atenuar essa formação de hidropéroxido e a diminuição da superóxido dismutase como mostra a tabela 2.

TABELA 2: Estresse Oxidativo

VARIAVEL	CP (8)	CCV (8)	DX (6)	DX-CV (6)	P INT	CCV INT	DOX INT
Hidropéroxido	206±34,2	181±6,30	265±18,0	166±8,97	<0,001	0,002	0,228
Catalase	59,1±10,5	37,4±7,01	34,8±7,18	41,4±5,24	0,002	0,030	<0,001
Superoxido dismutase	17,1±1,40	16,7±2,46	13,4±0,10	11,2±2,82	0,011	0,013	<0,001
Glutaciona Peroxidase	27,6±9,10	28,3±1,72	13,7±6,05	20,5±2,00	0,016	0,070	<0,001

CP: controle padrão, CCV: controle + chá verde, DX: doxorubicina, DX-CV: doxorubicina + chá verde. Hidropéroxido: DX≠DX-CV, DX≠CP. Catalase: CP≠CCV, CP≠DX. Superoxido Dismutase: CP≠CCV, CP≠DX, CCV≠DX-CV. Glutaciona Peroxidase: DX-CV≠DX, CP≠DX.

Western Blotting: TNF- α , colágeno I e colágeno III

O TNF- α nos grupos que receberam a droga tiveram um aumento comparado aos grupos que não receberam. Todos os resultados foram ajustados para a quantidade total de proteína de cada amostra e normalizados pela média do grupo controle. A tabela 3 mostra os resultados da quantificação do TNF- α pelo método do Western Blotting.

TABELA 3: Western Blotting TNF- α , Colágeno I e Colágeno III

VARIAVEL	CP (6)	CCV (6)	DX (6)	DX-CV (6)	P INT	CCV INT	DOX INT
TNF- α	1,00 \pm 0,40	0,57 \pm 0,46	6,66 \pm 3,59	5,68 \pm 3,23	0,47	0,84	0,01
Colágeno I	1,00 \pm 0,56	0,91 \pm 0,41	1,14 \pm 1,06	0,85 \pm 0,50	0,67	0,43	0,86
Colágeno III	1,00 \pm 1,31	1,62 \pm 1,60	1,01 \pm 1,35	1,35 \pm 1,45	0,79	0,38	0,81

CP: controle padrão, CCV: controle padrão+chá verde, DX: controle padrão+doxorubicina, DX-CV: doxorubicina+chá verde.

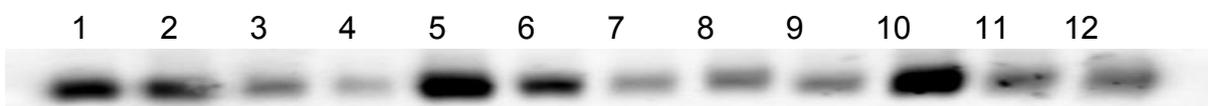


Figura 3: Western Blotting TNF - α (25 kDa). Colunas 1, 5 e 9: DX-CV, colunas 2,6 e 10: DX. colunas: 3, 7 e 11: CCV e colunas 4, 6 e 12: CP.

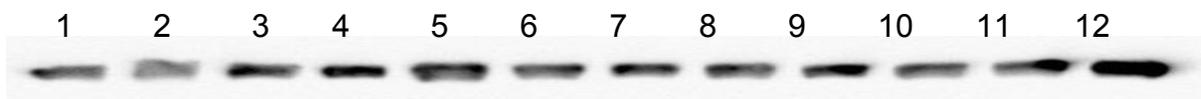


Figura 4 Western Blotting GAPDH (37 kDa). Colunas 1, 5 e 9: DX-CV, colunas 2,6 e 10: DX, colunas: 3, 7 e 11: CCV e colunas 4, 6 e 12: CP.

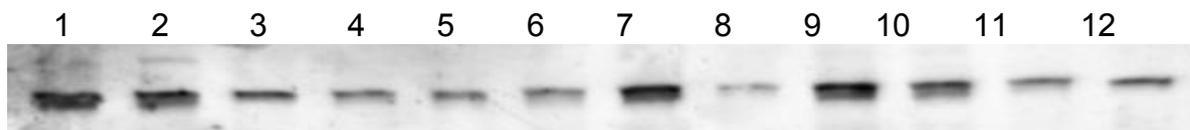


Figura 5: Western Blotting Colágeno I (90 kDa). Colunas 1, 5 e 9: CP; Colunas 2, 6 e 10: CCV; colunas 3, 7 e 11: DX e colunas 4, 8 e 12: DX-CV.

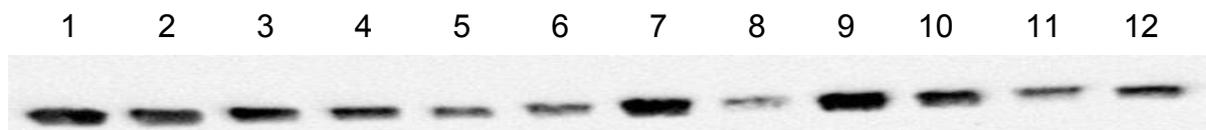


Figura 6: Western Blotting GAPDH (37 kDa). Colunas 1, 5 e 9: CP; Colunas 2, 6 e 10: CCV; colunas 3, 7 e 11: DX e colunas 4, 8 e 12: DX-CV.



Figura 7: Western Blotting Colágeno III (70 kDa). Colunas 1, 5, 9 e 13: CP; Colunas 2, 6, 10 e 14: DX; colunas 3, 7 e 11: DX-CV e colunas 4, 8 e 12: CCV.

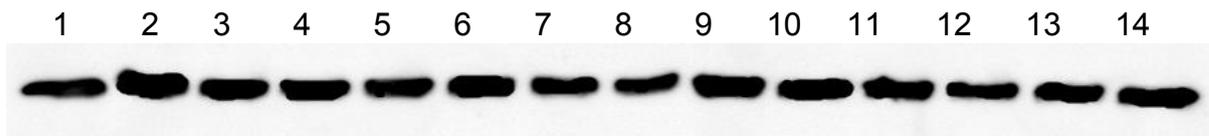


Figura 8: Western Blotting GAPDH (37 kDa). Colunas 1, 5, 9 e 13: CP; Colunas 2, 6, 10 e 14: DX; colunas 3, 7 e 11: DX-CV e colunas 4, 8 e 12: CCV.

Resultados da Zimografia

Foi avaliada atividade colagenolítica da metaloprotease 2 no miocárdio dos ratos estudados através de eletroforese (figura 9) e quantificação da degradação da gelatina incorporada no gel por análise de densidade óptica. No gel de eletroforese foram identificadas duas bandas de degradação correspondentes à metaloprotease 2: a metaloprotease 2 inativa (pró-MMP-2) com peso molecular de aproximadamente 72 KDa e a forma ativa apresenta peso molecular de aproximadamente 64 KDa (Shulz, 2010). É possível ainda identificar banda de degradação intermediária entre as duas últimas citadas. Observou-se aumento da atividade da MMP2 intermediária nos grupos DX e DX-CV, quando comparado aos outros grupos.

Tabela 4: Valores de densidade óptica correspondentes à degradação do gel.

VARIAVEL	CP (6)	CCV (6)	DX (6)	DX-CV (6)	P INT	P CCV	P DOX
MMP ativa	9412±6060	7690±3939	11413±10306	8468±12171	0,85	0,49	0,68
MMP inter.	21907±10304	23576±11532	54553±26211	32163±32206	0,16	0,23	0,02
MMP inativa	35800±21485	34116±32446	48421±29076	48677±32498	0,93	0,95	0,24

CP: controle padrão, CCV: controle padrão+chá verde, DX: controle padrão+doxorubicina, DX-CV: doxorubicina+chá verde. MMP inter.: DX≠CP; DX±CCV, DX-CV≠CP; DX-CV≠CCV

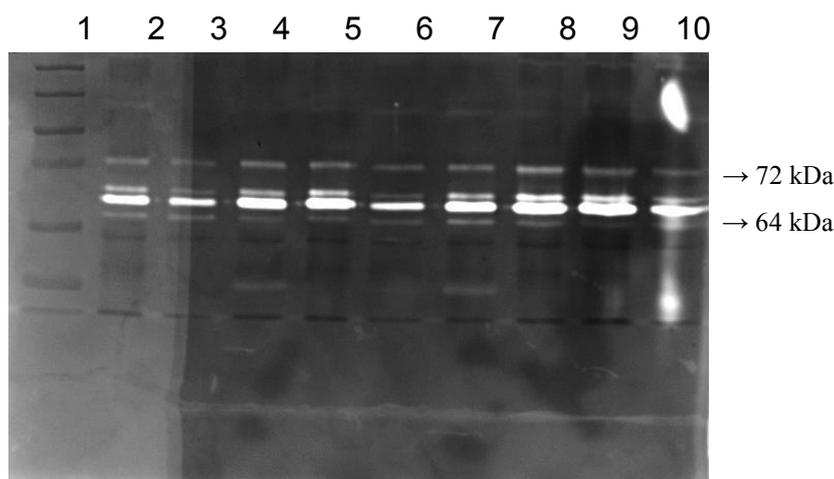


Figura 9: Gel de eletroforese. Coluna 1: padrão. Colunas 2, 6 e 10: grupo CP. Colunas 3 e 7: grupo CCV. Colunas 4 e 8: grupo DX-CV. Colunas 5 e 9: grupo DX.

Resultados histológicos

Não houve diferença na fração de colágeno intersticial mensurado nas lâminas coradas com Picrosirius red e nem na área seccional do miócito quando analisados por imunohistoquímica como apresenta os dados da tabela 6.

Tabela 5: Resultados histológicos

VARIAVEL	CP (6)	CCV (6)	DX (6)	DX-CV (6)	P INT	P CCV	P DOX
Colágeno interst.	3,64±0,65	3,36±0,53	3,62±0,87	3,36±0,78	0,96	0,31	0,97
Área do Miócito	371±22,3	449±35,8	430±61,6	484±13,5	0,54	0,005	0,02

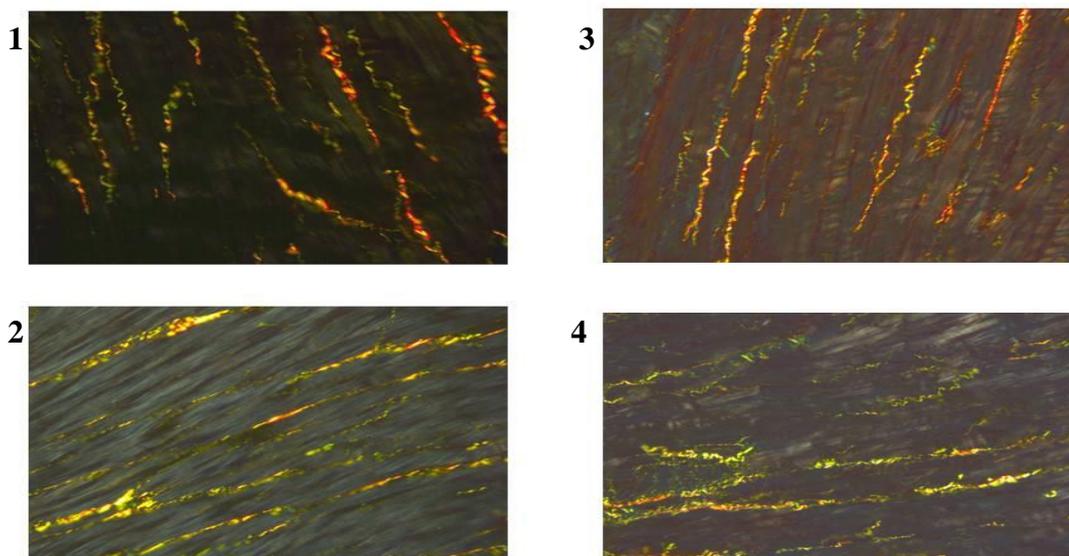


Figura 10: Laminas com coloração de Picrosirius Red visualizada com luz polarizada. Imagem 1: CP, imagem 2 CCV, imagem 3 DX e imagem 4 D

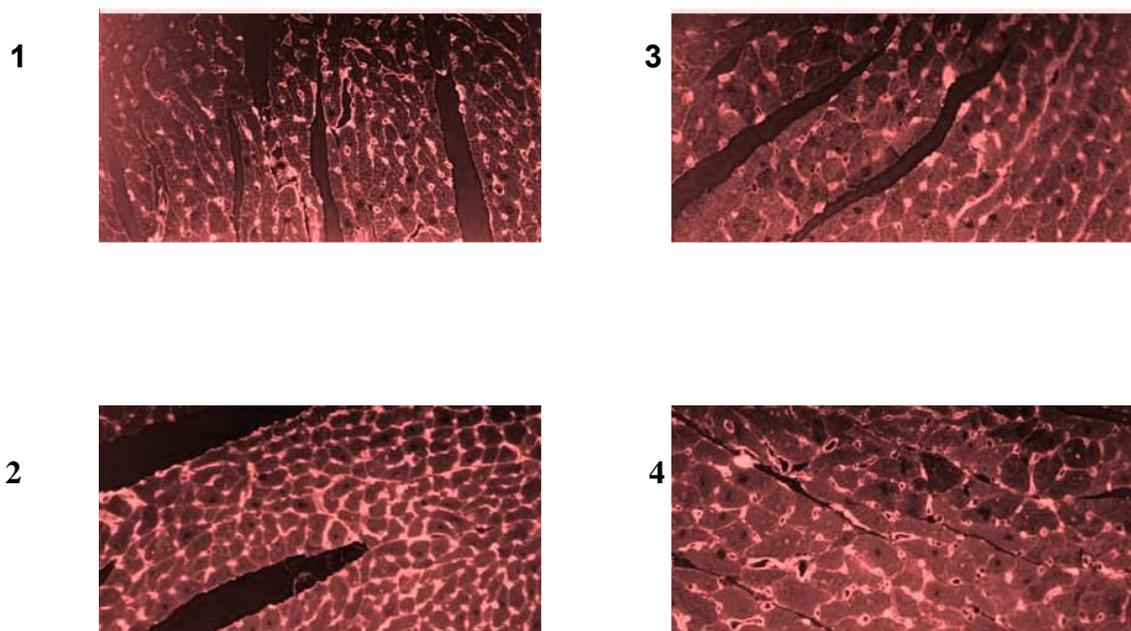


Figura 11: Laminas de Imunohistoquímica para determinação área do miócito. Imagem 1 : CP, imagem 2: CCV, imagem 3: DX e imagem 4 DX-CV

DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta há 50 anos as antraciclina tem sido uma das principais drogas no tratamento de vários cânceres. Entretanto o uso das antraciclina está associado a um risco de insuficiência cardíaca. Esforços têm sido realizados com a finalidade de encontrar maneiras de prevenir a cardiotoxicidade.

O chá verde, principalmente por suas propriedades antioxidantes, tem sido estudado como um potencial protetor à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina. Estudos experimentais e em diferentes modelos apresentam resultados favoráveis ao uso do chá verde como protetor cardíaco. Entretanto, os mecanismos precisos permanecem por serem estabelecidos. Adicionalmente o chá verde exibe propriedades de quimiosensibilização por meio de efeito aditivo e sinérgico às drogas anticâncer, como por exemplo, a doxorubicina (LECUMBERRI, et al 2013).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o extrato de chá verde atenua a remodelação cardíaca induzida pela doxorubicina agudamente. Para tanto foi utilizado modelo de toxicidade aguda induzida pela doxorubicina que tem mostrado que após 48 horas da administração de 20mg/kg da droga já existem lesões cardíacas (IQBAL, et al 2008).

A doxorubicina induziu remodelação cardíaca acompanhada de disfunção diastólica, que foi atenuada pelo chá verde. O estresse oxidativo foi o mecanismo pelo qual o chá verde melhorou os parâmetros morfofuncionais cardíacos.

Considerando a avaliação ecocardiográfica observou – se que a doxorubicina promoveu aumento da ERP e do AE/PC, que foram atenuados pelo chá verde.

Sobre a ERP, como não houve aumento do DDVE e houve tendência ao aumento da PP no grupo DX, é possível que o aumento da ERP seja as custas de

maior espessura da PP. Existem duas hipóteses para o aumento da ERP. O primeiro é por hipertrofia do miócito. Embora 48 horas após o insulto seja um período curto para o desenvolvimento de hipertrofia, Wold et al (2005) observaram que em cultura de cardiomiócitos a exposição à doxorubicina, por 5 minutos, ativa a via da MAPK p38 (WOLD, et al 2005). Esta, por sua vez, é uma importante via que leva a hipertrofia do miócito.

Outra hipótese é que haja inflamação e edema da parede. De fato, estudos prévios mostraram a presença de edema e inflamação no coração após 48 horas da infusão de doxorubicina (IQBAL, et al 2008; RAHEEM , et al 2009). Adicionalmente, a área seccional do miócito aumentou com a doxorubicina, porém o chá verde não atenuou este parâmetro. Como o chá verde diminuiu a ERP sem reduzir a área seccional do miócito, é possível que a hipótese de inflamação da parede seja mais provável. Estudos prévios mostraram que o chá verde protegeu a destruição e desarranjo de fibras musculares e vacuolização dos miócitos (PATIL, 2011). Não encontramos estudos que avaliaram a participação do chá verde em reduzir infiltrado inflamatório e edema tecidual nesse modelo de cardiotoxicidade.

Em relação ao aumento do AE, estudos anteriores Souza et al (2009) observaram aumento desta câmara após 48 horas da injeção de doxorubicina. O aumento do AE é um marcador de disfunção diastólica. Em nosso estudo houve aumento do AE que foi atenuado com o uso do chá verde.

Na literatura não encontramos estudos que avaliassem a ação do chá verde na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, por meio de variáveis ecocardiográficas. Portanto nosso trabalho foi o primeiro a mostrar que o chá verde

atenua a remodelação cardíaca e melhora a disfunção diastólica na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina.

A remodelação cardíaca é um processo no qual uma agressão ao coração leva a alterações bioquímicas, celulares, moleculares, intersticiais, que resultam em mudanças na forma, peso, geometria cardíaca. Se esse processo não for contido resultara em disfunção ventricular sistólica e diastólica. Neste estudo a doxorubicina é o agressor ao coração. O aumento da ERP e aumento de AE refletem mudança na geometria e disfunção miocárdica, evidenciando que ocorreu processo de remodelação. Dentre as alterações bioquímicas evidenciadas nesse processo estão o estresse oxidativo, ativação de metaloproteases e mediadores inflamatórios. Dentre as alterações celulares e intersticiais estão a hipertrofia e a fibrose cardíaca.

Sobre o estresse oxidativo Khan et al (2014) estudaram o efeito do chá verde nas doses de 100 mg/kg , 200 mg/kg e 400 mg/kg por 30 dias na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina. Os resultados mostraram que a doxorubicina aumentou o estresse oxidativo e que todas as doses de chá verde restauraram a atividade das enzimas antioxidantes. De fato o chá verde tem sido considerado um potente antioxidante capaz de melhorar a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (PATIL,2011; KHAN 2014). Nossos resultados vão de encontro a esses achados da literatura. Pois utilizamos 200 mg/kg de chá verde que reduziu o estresse oxidativo. Neste presente estudo, os animais que receberam doxorubicina e chá verde tiveram menor formação de hidroperóxido de lipídeos e maior atividade enzimática. Sendo assim é possível que o chá verde atenua a remodelação cardíaca por meio da redução do estresse oxidativo.

Considerando a inflamação, esta está entre os mecanismos envolvidos na lesão induzida pela doxorrubicina, estudos prévios mostraram que administração de antraciclinas em camundongos levou ao aumento do TNF- α no tecido neoplásico. Entretanto ao bloquear o receptor do TNF- α não houve redução dos efeitos antineoplásicos da doxorrubicina (LAMBERTI et al 2014), por isso existe a hipótese que o TNF- α não é essencial para a resposta anticâncer da droga, mas pode estar associado à toxicidade da mesma. O presente estudo mostrou que, de fato, houve aumento do TNF- α no coração dos ratos que receberam doxorrubicina, independentemente da ingestão de chá verde. Entretanto, não é um dos mecanismos pelo qual o chá verde atenua a remodelação induzida por essa droga (LAMBERTI et al 2014). Não encontramos na literatura outro trabalho que avaliasse o papel do chá verde sobre o TNF- α na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina.

Outro ponto importante é a ligação entre inflamação e o estresse oxidativo. O TNF- α pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), ao ativar as enzimas NADPH oxidases, favorecendo a formação de H₂O₂ e O⁻ (GIORDANO, 2005). Por outro lado o EROS podem ativar a enzima poli ADP – ribose polimerase que estimula a liberação de citocinas inflamatórias (TSUTSUI, 2011).

Aumento do estresse oxidativo e inflamação exercem papel crucial no processo de remodelação. As EROS causam lesão direta ao coração por promover peroxidação lipídica, proteica e dano ao DNA resultando em lesão e morte celular. Adicionalmente as EROS podem estimular diversas vias que participam da remodelação cardíaca dentre elas as metaloproteases e vias de hipertrofia cardíaca.

Ainda em relação ao TNF- α , esta citocina ao ligar em seu receptor TNFR1, estimula a sinalização pela via do NF-kB e a ativação da fosforilação da MAPKinase p38, levando a apoptose e a hipertrofia dos miócitos (SILWA et al, 2004).

Em relação as metaloproteases (MMP), estas participam de vários processos patológicos como apoptose, angiogênese, migração celular, o remodelamento e a reabsorção tecidual, também estão envolvidos com a metastatização de neoplasias malignas e varias doenças cardíacas. As MMPs 2 e 9 são classificadas como gelatinases e ambas estão envolvidas na degradação de colágeno tipo IV, favorecendo a deposição do colágeno tipo I. Desta forma desempenham papel importante no desenvolvimento da fibrose (VISSE & NAGASE, 2003).

Em modelos de exposição aguda e crônica a doxorrubicina foi encontrado ativação de MMP2, independente da presença de fibrose (POLEGATO, 2011; IVANOVÁ, et al 2012). No presente estudo observou-se aumento da atividade da fração intermediária da MMP2 nos grupos que receberam doxorrubicina. Este achado pode ser reflexo do aumento do estresse oxidativo induzido pela droga. Entretanto, o chá verde não participou desse mecanismo. Adicionalmente não houve presença de fibrose ou alterações no colágenos tipo I e III induzidos pela doxorrubicina. O efeito do chá verde na MMP, fibrose e colágeno tipo I e III não haviam sido investigados anteriormente.

Em resumo, a doxorrubicina aumentou AE/P, ERP, área seccional do miócito e ocasionou disfunção diastólica. Adicionalmente a doxorrubicina aumentou o estresse oxidativo, TNF- α , MMP2. Não houve participação da fibrose e alterações no colágenos I e III nesse modelo de cardiotoxicidade aguda. O chá verde atenuou AE/P, ERP e estresse oxidativo.

Portanto o chá verde melhorou a remodelação cardíaca e a função diastólica por meio de sua ação antioxidante, mas não por atuar sobre TNF- α e MMP2.

CONCLUSÃO

O extrato de chá verde atenuou a remodelação cardíaca, melhorou a função diastólica e reduziu o estresse oxidativo do coração, após 48 horas da aplicação da doxorubicina. Porém a participação do TNF e MMP2 não explicam os benefícios do chá verde na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

1. Abou EHM, Heijn M, Vijgh WV, Bast A, Hoeber R. The protective effect of cardiac gene transfer of CuZn-SOD in comparison with the cardioprotector monohydroxyethylrutoside against doxorubicin-induced cardiotoxicity in culture cells. *Cancer Gene Therapy*. 2003; 10; 270 – 277.
2. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. New York: Verlag chemie Weinheim, 1974.
3. Akhlaghi M, Bandy B. Dietary green tea extract increases phase 2 enzyme activities in protecting against myocardial ischemia-reperfusion. *Nutr Rev*. 2010; 30; 32-9.
4. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial Effects of Green Tea: A Review. *Journal of the Amer. Coll. Of Nutrition*. 2006; 25 (2); 79–99.
5. Clement Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Preventive Medicine*. 2009; 49; 83–87.
6. Cove-Smith L, Woodhouse N, Hargreaves A, Kirk J, Smith S, Price SA, Galvin M, Betts CJ, Brocklehurst S, Backen A, Radford J, Linton K, Roberts RA, Schmitt M, Dive C, Tugwood JD, Hockings PD, Mellor HR. *Toxicol Science*. 2014;140(1):3-15.
7. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem*. 1995; 232; 243-8.
8. Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: An echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*; 2007; 101; 16-24.
9. Iqbal M, Dubey K, Anwer T, Ashish A, Pillai KK. Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Reports*; 2008; 60; 382-390.

10. Jiang ZY, Woolard A, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidative of Fe³ in the presence of xylenol orange. *Lipids*. 1991; 26; 853-56.
11. Jochmann N, Baumann G, Stangl V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. ; 11; 758–765.
12. Kapusta L, Thijssen JM, Groot-Loonen J, Van Druten JA, Daniels O. Discriminative ability of conventional echocardiography and tissue Doppler imaging techniques for the detection of subclinical cardiotoxic effects of treatment with anthracyclines. *Ultrasound Med Biol*. 2001; 27 (12); 1605-14.
13. Kizaki K, Ito R, Okada M, et al. Enhanced gene expression of myocardial matrix metalloproteinases 2 and 9 after acute treatment with doxorubicin in mice. *Pharmacol Rev*. 2006; 53; 341-346.
14. Kodama DH, Gonçalves AESS, LAjolo FM, Genovese MI. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2010; 30 (4); 1077-1082.
15. Kuriama S. The Relation between Green Tea Consumption and Cardiovascular Disease as Evidenced by Epidemiological Studies. *American Society Nutrition*. 2008; 138 (8); 1548-1553.
16. Lamberti M, Giovane G, Garzillo EM, Avino F, Feola A, Porto S, Tombolini V, Di Domenico M. Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antitubercular drugs in patients and occupationally exposed workers. *Biomed Res Int*. 2014; Art Id. 240642.
17. Machado V, Cabral A, Monteiro P, Gonçalves L, Providencia LA. O Carvedilol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas Antraciclina (Doxorrubicina). *RevPortCardiol*. 2008; 27 (10); 1277-1296.

18. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79; 727–747.
19. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, et al., Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 86(2); 126-30.
20. McMurray JJV. Systolic heart failure. *N Eng J Med.* 2010; 228-238.
21. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004; 56; 185-229.
22. Moura RA. Técnicas de Laboratório. 2a. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.
23. Nascimento MCMO, Antonio SM. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arq. Ciênc. Saúde.* 2005; 12 (2); 111-15.
24. Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1974; 358; 251-61.
25. Rodriguez EMN, et al. Diagnóstico oportuno del daño al miocardio en pacientes tratados con antraciclina: un reto para el siglo XXI. *Bol Med Hosp Infant Mex;* 2013; 70(2); 72-77.
26. Sá PBO, Gomes RAF, Silva NPC, Sá MVBO, Filho IC. Cardiotoxicidade e quimioterapia. *Rev Bras Clin Med.* 2009; 7; 326-330.
27. Santos ACS, et al. Cardioncologia: anormalidades eletrocardiográficas em pacientes com cardiomiopatia pós-uso de doxorubicina. *Rev SOCERJ.* 2009; 5; 281-288.
28. Sawyer DB. Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med.* 2013; 368(12):1154-6

29. Segredo MP, Salvadori DF, Rocha N, Moretto FF, Correa C, Camargo E, Almeida DD, Reis RS, Freire CM, Braz M, Tang G, Matsubara L, Matsubara B, Yeum KJ, Ferreira A. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Hum Exp Toxicol*. 2013; 33(7); 748-760.
30. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersiv. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*. 2009; 61; 154–171.
31. Souza NNF, et al. Avaliação ecocardiográfica da cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos. *Rev. Bras. Ecocardiogr. ImagemCardiovasc*. 2009. 22(3), 20-
32. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Canc*. 2010; 10: 337.
33. Sterba M, Popelova O, Vavrova A, Jirkovsky E, Kovarikova P, Gers V,1 and Simunek T. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013; 18(8); 899-929.
34. Unverferth BJ, Magorien RD, Balcerzak SP, Leier CV, Unverferth DV. Early changes in human myocardial nuclei after doxorubicin *Cancer* 1983; 52; 215-21.
35. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301; 2181–90.

36. Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM. Acute Doxorubicin Cardiotoxicity Is Associated With p53-Induced Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Circulation* published online. 2008; 119 (1) :99-106.
37. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18:1440-63.
38. Spadaro J, Fishbein M, Hare C, Pfeffer M, Maroko P. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med*. 1980;104:179-83.
39. Sjaastad I, Sejersted O, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000;89:1445-54.
40. Fioretto JR, Queiroz 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 Endocrinol Metab*. 2002;282:H1327-33.
41. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res*. 2002;22:1353-64.
42. 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. *Chronic angiotensin-*

- converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91:2642-54.
43. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:1550-8.
44. 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;10:169-78.
45. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:161-7.
46. Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289:1131-6.
47. Lecumberri E, Dupertuis YM, Miraebell R, Pichard C. Green tea polyphenol epigallocatechin – 3 gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. *Clinical Nutrition*. 2013; 32: 894-903.
48. Polegato BF. Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade aguda induzida por doxorubicina em ratos. Tese de doutorado apresentado a FMB. Botucatu SP. 2011.
49. Ivanová M, Dovinová I, Okruhlicová L, Tribulová N, Simončíková P, Barteková M, Vlkovičová J, Barančík M. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2012; 33(4):459-69.

50. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation research*. 2003.
51. Giordano FJ, Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005; 115: 500-508
52. Patil R, Balaraman. Effect of Green Tea Extract on Doxorubicin Induced Cardiovascular Abnormalities: Antioxidant Action. 2011, 10 (1): 89-96.
53. Khan G, Ehtaishamul SH, Anwer T, Ahsan MN, Safhi MM. Cardioprotective effect of green tea on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Drug Research*. 2014; 71(5): 861-868.
54. Wold LE, Aberle NS, Ren J. Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detect Prev*. 2005;29(3):294-9.
55. Silwa K, Woodiwiss A, Kone VN, Candy G, Badenhorst D, Norton G, Zambakids C, Peters F, Essop R. Therapy of Ischemic Cardiomyopathy With the Immunomodulating Agent Pentoxifylline. *Circulation*. 2004;109:750-55.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da FMB – UNESP, protocolo 898/2011.

	Comissão de Ética em Experimentação Animal				Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99
	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA	<h1>Certificado</h1>			
<p>Certificamos que (Protocolo CEEA 898-2011) "Influência do extrato de chá verde na remodelação cardíaca induzida por administração de doxorubicina", a ser conduzido por Pánela Nayara Modesto, orientada pela Prof^ª Dr.^ª Paula Schmidt Azevedo Gaiolla, Co-orientada pelo Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>					
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/08/2011.			 Prof ^ª Dr. ^ª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA		
 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA			Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S. P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br		