

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação clínico-laboratorial dos possíveis efeitos deletérios dos polifenóis no
terceiro trimestre de gestação

GUILHERME BORGES BUBOLS

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação clínico-laboratorial dos possíveis efeitos deletérios dos polifenóis no
terceiro trimestre de gestação

Dissertação apresentada por **Guilherme
Borges Bubols** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.04.2013 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Fernanda Bueno Morrone
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr. Mirian Salvador
Universidade de Caxias do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Bubols, Guilherme Borges
Avaliação clínico-laboratorial dos possíveis efeitos deletérios dos polifenóis no terceiro trimestre de gestação / Guilherme Borges Bubols. -- 2013.
133 f.

Orientador: Solange Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Polifenóis. 2. Gestação. 3. Constricção ductal.
I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Rio Grande do Sul e no Instituto de Cardiologia de Porto Alegre com a supervisão do Prof. Dr. Paulo Zielinsky. A pesquisa foi financiada pelos projetos Fapergs auxílio PPSUS (09/0023-0), CNPq/Universal (479613/2009-5 e 484096/2011-7) e Fapergs (PqG-2010). Guilherme Borges Bubols recebeu bolsa de mestrado CAPES.

AGRADECIMENTOS

À prof^a Solange, agradeço pela confiança e pela oportunidade de compor o seu grupo de pesquisa e pela orientação deste trabalho. Obrigado por tudo!

Aos meus pais Rejane e Francisco por todos os esforços e apoio incondicional. Mãe e pai: este trabalho só foi possível pelo amparo, amor e pela base que sempre recebi e por me manter durante a vida acadêmica.

A toda a família: vó Landinha, irmãos, primos, tios, dindos, ao meu padrasto Luis. Muito obrigado pelo apoio, carinho e torcida em todos os momentos, que foram sentidos apesar da distância em certos momentos.

Ao Instituto de Cardiologia de Porto Alegre, especialmente ao Grupo de Cardiologia Fetal composto pelo prof. Paulo Zielinsky, Antônio, Luiz Henrique, Izabele, Ana Maria, Stefano, Mauro agradeço por todo auxílio, discussões e contribuições fundamentais em todas as etapas desta pesquisa, à prof. Melissa Markoski, do Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular pela colaboração e contribuições, e à equipe do Laboratório de Análises Clínicas.

Aos colegas do LATOX: Ane, Angela, Bruna, Carol, Elisa, Fernando, Gabi, Mariele, Marília, Natália, Rachel, Juliano, Rafael, Sabrina e Sarah. Agradeço pela ajuda de cada um de vocês neste trabalho, pelo companheirismo, conversas, risadas, momentos de descontração e pelas grandes amizades formadas nesse grupo que vou levar sempre comigo.

Aos amigos do Labtoxico Ana Laura, Elô, Gabiruzinha, Rose, Otávio, Madson, Maíra, Paula, agradeço pela parceria, risadas e pelos momentos de convivência. Aos amigos inerentes Ariston, Bruno, Gabriel, Iuri, Marcelo, Rafa e Tati, à Ângela, Luiza e Thali: agradeço pela amizade, parceria, e simplesmente por dividir tantos bons momentos durante esses anos.

Aos professores Fernanda Morrone, José Angelo Zuanazzi e Mirian Salvador por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura para realizar este curso.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

RESUMO

Os polifenóis são normalmente considerados compostos que apresentam atividades biológicas promissoras, em especial pelos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que o consumo materno de alimentos ricos em polifenóis (ARP) durante a gestação interfere na dinâmica de fluxo do ductus arteriosus (DA) no coração fetal de humanos, provavelmente pelo efeito anti-inflamatório dos polifenóis, e também tem sido demonstrado que a restrição da ingestão de ARP é capaz de reverter a constrição ductal. Neste trabalho, um estudo experimental foi desenvolvido com ovelhas prenhas, no qual os animais receberam suplementação oral de polifenóis durante 14 dias. Realizou-se ecocardiografia fetal e a análise de amostras de sangue e urina para investigar biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação além da excreção de polifenóis totais na urina. Houve aumento nas velocidades sistólicas (VS) e diastólicas (VD) e uma diminuição no índice de pulsatilidade (IP), o que indica uma constrição prematura do DA após o consumo de polifenóis. Houve diminuição da peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de TBARS, e nos níveis de tióis reduzidos não proteicos após o tratamento. Houve um aumento das atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) após o tratamento. Apesar do não envolvimento de dano lipídico na constrição ductal, observou-se um aumento no dano proteico através da dosagem de proteínas carboniladas (PCO). O efeito vasoconstritor e anti-inflamatório foi verificado pela diminuição nos níveis de nitritos/nitratos (NOx) após o consumo de polifenóis. O estresse oxidativo estava associado com parâmetros de constrição ductal, através das correlações de dano protéico (PCO) com VS ($r=0,629$, $p=0,028$), VD ($r=0,905$, $p=0,0001$) e IP ($r=-0,772$, $p=0,003$). Ainda, VS foi correlacionada com catalase ($r=0,672$, $p=0,033$) assim como IP com GPx ($r=-0,629$, $p=0,05$). A constrição ductal estava ainda associada com o parâmetro inflamatório, sendo VS e VD correlacionadas com NOx ($r=-0,853$, $p=0,0004$ e $r=-0,705$, $p=0,010$, respectivamente) além da correlação entre IP e NOx ($r=0,599$, $p=0,039$). Além disso, ambos os mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes estavam correlacionados: NOx e GPx ($r=-0,755$, $p=0,004$) e entre NOx e catalase ($r=-0,812$, $p=0,001$), confirmando a ocorrência de ambos efeitos atribuíveis aos

polifenóis. Neste estudo, foi possível perceber que um elevado consumo de polifenóis induziu constrição ductal em ovelhas prenhas com uma excreção urinária aumentada de polifenóis totais e alterações em biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação. Estes resultados ressaltam a necessidade de uma orientação dietética ao final da gestação com relação ao consumo de alimentos ricos em polifenóis devido à possibilidade de indução de constrição ductal através da ação anti-inflamatória em fetos expostos.

Palavras-chave: polifenóis; ductus arteriosus, gestação; ecocardiografia fetal; estresse oxidativo; inflamação.

ABSTRACT

Clinical and laboratorial evaluation of the possible deleterious effects of polyphenols in the third trimester of pregnancy

Polyphenols are often referred to as compounds with promising biological activities, especially antioxidant and anti-inflammatory effects. However, it has been recently reported that maternal consumption of polyphenol-rich foods (PRF) interferes with ductus arteriosus (DA) flow in human fetuses' hearts, probably by an anti-inflammatory effect and it has also been shown that restriction of PRF ingestion reverses ductal constriction. In this work, an experimental study was carried out with pregnant sheep, in which the animals received oral polyphenol supplementation for 14 days. Fetal echocardiography was performed along with blood and urine analysis to investigate antioxidant and anti-inflammatory biomarkers and total polyphenol (TP) urinary excretion. We found a decrease in lipid peroxidation by TBARS levels and a decrease in non-protein reduced thiols after treatment. In addition, an increase in enzymatic activities of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) was observed. Despite that lipid peroxidation was not involved in ductal constriction, protein damage by enhanced protein carbonyls (PCO) were found. Anti-inflammatory and vasoconstrictive effects were observed by a decrease in nitrites/nitrates (NOx) in pregnant sheep after polyphenol consumption. Oxidative stress was associated to ductal constriction parameters, according to the correlations of protein damage marker PCO to SV ($r=0.629$, $p=0.028$), VD ($r=0.905$, $p=0.0001$) and IP ($r=-0.772$, $p=0.003$). Also, SV was positively correlated to CAT ($r=0.672$, $p=0.033$) and IP negatively correlated to GPx ($r=-0.629$, $p=0.05$). Ductal constriction was also associated to the inflammatory parameter, due to the correlations of SV and DV to NOx ($r=-0.853$, $p=0.0004$ and $r=-0.705$, $p=0.010$, respectively) as well as the correlation between IP and NOx ($r=0.599$, $p=0.039$). Besides, association of both inflammatory and antioxidant mechanisms were found: NOx vs. GPx ($r=-0.755$, $p=0.004$) and NOx vs. CAT ($r=-0.812$, $p=0.001$), confirming the presence of both effects attributed to polyphenols. We report that high polyphenol intake induced fetal DA constriction in pregnant sheep followed by an increased TP excretion and alterations in inflammatory and oxidative

biomarkers. These results highlight the need for a dietary orientation in late-pregnancy regarding maternal intake of foods with high polyphenol contents in light of the possible induction of ductal constriction through an anti-inflammatory action of polyphenols in exposed fetuses.

Keywords: polyphenols; ductus arteriosus; pregnancy; fetal echocardiography; oxidative stress; inflammation.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encartes de publicações submetidas e/ou publicadas e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Artigos presentes nos Capítulos 1 e 2, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos. O Capítulo 1 corresponde à Revisão Bibliográfica e é subdividido em duas partes, sendo a Parte I composta por um Artigo de Revisão e a Parte II referente à continuação da Revisão Bibliográfica. O Capítulo 2 corresponde a um Artigo Científico.

A Introdução apresenta de uma forma geral o embasamento teórico no qual a proposta deste trabalho foi construída. Os Materiais, Métodos e Resultados (quando o caso) e as Referências Bibliográficas pertinentes a cada publicação específica encontram-se dentro de cada trabalho, organizados em cada Capítulo.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NT	3-Nitrotirosina
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroides
Adir	Átrio Direito
Aesq	Átrio Esquerdo
AO	Aorta
AP	Artéria Pulmonar
ARP	Alimentos Ricos em Polifenóis
CAT	Catalase
COMT	Catecol- <i>o</i> -metiltransferase
COX	Ciclo-oxigenase
DA	Ductus Arteriosus
EGC	(-)-Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
IP	Índice de Pulsatilidade
MDA	Malondialdeído
NO	Óxido Nítrico
NOx	Relação nitritos/nitratos
PCO	Proteínas Carboniladas
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
SOD	Superóxido Dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
VD	Velocidade Diastólica
Vdir	Ventrículo Direito
Vesq	Ventrículo Esquerdo
VS	Velocidade Sistólica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	23
Objetivos gerais.....	25
Objetivos específicos.....	25
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	27
PARTE 1: ARTIGO I.....	29
The antioxidant activity of coumarins and flavonoids	
PARTE 2: Continuação da revisão de literatura.....	49
1.1 Polifenóis.....	51
1.2. Efeitos dos polifenóis na inflamação.....	55
1.3. Efeitos dos polifenóis no estresse oxidativo.....	56
1.4. Circulação fetal e o ductus arteriosus.....	58
CAPÍTULO 2: ARTIGO II.....	65
Nitric oxide and oxidative stress are modulated in the polyphenol-induced ductus arteriosus constriction in pregnant sheep	
DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	129
ANEXO I: Carta de Confirmação da Submissão do Artigo II.....	131
ANEXO II A. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.....	132
ANEXO II B. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.....	133

Os polifenóis são compostos muito abundantes nos vegetais, sendo representantes importantes dos fitoquímicos presentes nas mais variadas espécies de plantas. Além disso, diversos efeitos benéficos vêm sendo atribuídos a este grande grupo de compostos bioativos, que englobam uma variedade de moléculas que, de acordo com suas propriedades químicas, poderiam ser grosseiramente divididas em flavonoides e não flavonoides. Nas últimas duas décadas, um enorme número de publicações vem relatando diversas atividades biológicas destes compostos por trazer benefícios em patologias agudas e crônicas (BENAVENTE-GARCIA, CASTILLO, 2008; ARROO, 2009). No entanto, poucos estudos demonstram complicações quanto ao consumo de compostos fenólicos. Por exemplo, casos de constrição do ductus arteriosus fetal têm sido associados à ingestão materna de bebidas ricas em polifenóis (ZIELINSKY *et al.*, 2010).

Os chás são bebidas consumidas em grande quantidade e sem restrição ao redor do mundo, inclusive entre as gestantes. Os polifenóis presentes no chá-verde (*Camellia sinensis* L. Kuntze), especialmente as catequinas, apresentam significativo efeito antioxidante e anti-inflamatório demonstrado em humanos, animais e *in vitro* (KUMAR *et al.*, 2007). Esses efeitos também foram observados para o resveratrol, um estilbeno encontrado na casca da uva, suco de uva e no vinho tinto (DE LA LASTRA, VILLEGAS, 2005) e para a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), com a qual se prepara o chimarrão (SCHINELLA *et al.* 2005), parecendo ser resultantes da supressão da biossíntese das prostaglandinas.

Sabe-se que o ductus arteriosus (DA) está presente no coração fetal e apresenta um papel fundamental no direcionamento do fluxo sanguíneo para porções inferiores do feto. Em condições fisiológicas e em todos os mamíferos, o DA torna-se espesso e oclui abruptamente após o parto com o início da circulação pulmonar (BERGWERFF, 1999). Porém, a constrição prematura do DA no terceiro trimestre é preocupante por estar associada a diferentes graus de insuficiência cardíaca fetal, podendo ocasionar hipertensão pulmonar do recém-nascido ou até mesmo levar ao óbito. Estudos relatam a associação do uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ou glicocorticoides durante a gravidez como sendo um dos principais responsáveis pelos casos de constrição ductal (MOISE, 1993).

Em um estudo observacional nos últimos 10 anos, detectou-se uma elevada prevalência de casos idiopáticos de constrição do DA na Unidade de Cardiologia Fetal do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul (LUCHESE *et al.*, 2003). Observou-se que as gestantes tinham feito uso de bebidas tais como chás de origem natural, chimarrão e derivados da uva, todas ricas em polifenóis, os quais têm comprovado efeito anti-inflamatório (GERONIKAKI *et al.*, 2006). Interessantemente, foi demonstrado também que a suspensão do uso dessas substâncias pelas gestantes estava relacionada com melhora, ou até mesmo, reversão dos parâmetros ecocardiográficos analisados (ZIELINSKY *et al.* 2012). Neste contexto, levantou-se a hipótese de que componentes ricos em polifenóis ingeridos pela dieta, como chá-verde, chimarrão e o suco de uva, poderiam estar implicados no aparecimento deste processo.

Apesar do efeito de AINEs sobre o ducto fetal ser conhecido, a propriedade anti-inflamatória de substâncias químicas comumente ingeridas sob a forma de chás, sucos ou vinhos, assim como sua atividade sob o ductus arteriosus, ainda não está bem esclarecida. Além disso, devido ao grande consumo de chimarrão entre a população gaúcha, é de se esperar que esta bebida contribua para os níveis de polifenóis entre a população de mulheres grávidas gaúchas.

Diante disso, percebe-se a necessidade de se investigar a origem desses casos idiopáticos de constrição do DA, sendo fundamental para tal que o verdadeiro efeito *in vivo* dos compostos fenólicos quantificado em fluidos biológicos assim como a excreção dos compostos polifenólicos, com a finalidade de atuar como biomarcadores oriundos da dieta para que sirvam de parâmetro para a verificação da possível influência do consumo de polifenóis sobre o desenvolvimento de constrição ductal. Desta forma, o presente trabalho avaliou os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de alterações hemodinâmicas verificadas no terceiro trimestre de gestação e buscou investigar o possível envolvimento de polifenóis da dieta como agentes causadores destes efeitos cardíacos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

- ✓ Estudar a influência da ingestão de polifenóis da dieta durante o final da gestação na dinâmica ductal do coração fetal e os mecanismos envolvidos em um modelo *in vivo* em ovelhas.

2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a indução de alterações na dinâmica de fluxo do ductus arteriosus em ovelhas após alto consumo de polifenóis.
- ✓ Investigar a possível relação entre os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo em ovelhas com a constrição ductal.
- ✓ Investigar a possível relação entre os níveis dos biomarcadores inflamatórios em ovelhas com a constrição ductal.
- ✓ Quantificar a excreção de polifenóis totais em amostras de urina como biomarcador do consumo de polifenóis pela dieta em ovelhas e sua relação com a constrição ductal.
- ✓ Avaliar possíveis associações entre os dados clínicos ecocardiográficos, níveis de excreção de polifenóis totais, de biomarcadores de estresse oxidativo e de inflamação.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

PARTE 1 (ARTIGO I):

The antioxidant activity of coumarins and flavonoids

Artigo de revisão publicado na revista *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*.

(Mini Rev Med Chem., vol. 13, nº 3, p. 318-334, 2013)

The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids

Guilherme Borges Bubols^{a,b}, Damiana da Rocha Vianna^{b,c}, Alexander Medina-Remón^c, Gilsane von Poser^{b,c}, Rosa Maria Lamuela-Raventos^c, Vera Lucia Eifler-Lima^{b,c*}, Solange Cristina Garcia^{a,c*}.

^a Toxicology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Pharmacy School, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil

^c Medicinal Organic Synthesis Laboratory. Pharmacy School, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA. Pharmacy School, University of Barcelona, Barcelona, Spain. CIBER CB06/03/0003 Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, (CIBERobn) and RETICS RD06/0045. Instituto de Salud Carlos III, Spain.

*Corresponding authors:

Prof Dr Garcia SC:

Toxicology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Pharmacy School, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil; Phone +55 51 33085297; Fax +55 51 33085437; E-mail: solange.garcia@ufrgs.br

Prof. Dr Eifler-Lima VL:

Medicinal Organic Synthesis Laboratory. Pharmacy School, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone +55 51 33085517; Fax +55 51 33085437; E-mail: veraeifler@ufrgs.br

Running title: Antioxidant Flavonoids and Coumarins

Abstract

Coumarins and flavonoids are heterocyclic molecules that have been associated with beneficial effects on human health, such as reducing the risk of cancer, diabetes, cardiovascular and brain diseases. These effects are thought to be related to the radical scavenging effect, due to their antioxidant activities, along with other possible mechanisms, such as anti-inflammatory properties and interaction with several enzymes. Over the past two decades, there have been an increasing number of publications on coumarins and flavonoids, which demonstrates the importance of understanding the chemistry behind the antioxidant activities of both natural and synthesized compounds, considering the benefits from their dietary ingestion as well as pharmacological use. This work aims to review the antioxidant effects of coumarin and flavonoid molecules in humans and the structural aspects that contribute to these effects.

Keywords: Antioxidant; Coumarins; Flavonoids; Free Radicals; Polyphenols; Structure-Activity Relationship.

PARTE 2: Continuação da revisão de literatura

1.1. Polifenóis

Diversos compostos presentes nos alimentos, conhecidos como fitoquímicos ou fitonutrientes, possuem capacidade de alterar reações bioquímicas de forma a impactar positiva ou negativamente na saúde humana. Os polifenóis são compostos fenólicos que representam uma parcela muito importante dos fitonutrientes, sendo que uma das classificações mais usuais e simplificadas adotadas os divide em ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, lignanas e estilbenos (Figura 1). Os polifenóis apresentam como característica comum à presença de anel aromático com pelo menos duas hidroxilas como substituintes em sua estrutura. Por serem substâncias amplamente distribuídas em plantas, são ingeridas normalmente em comidas e bebidas (BEECHER, 2003)

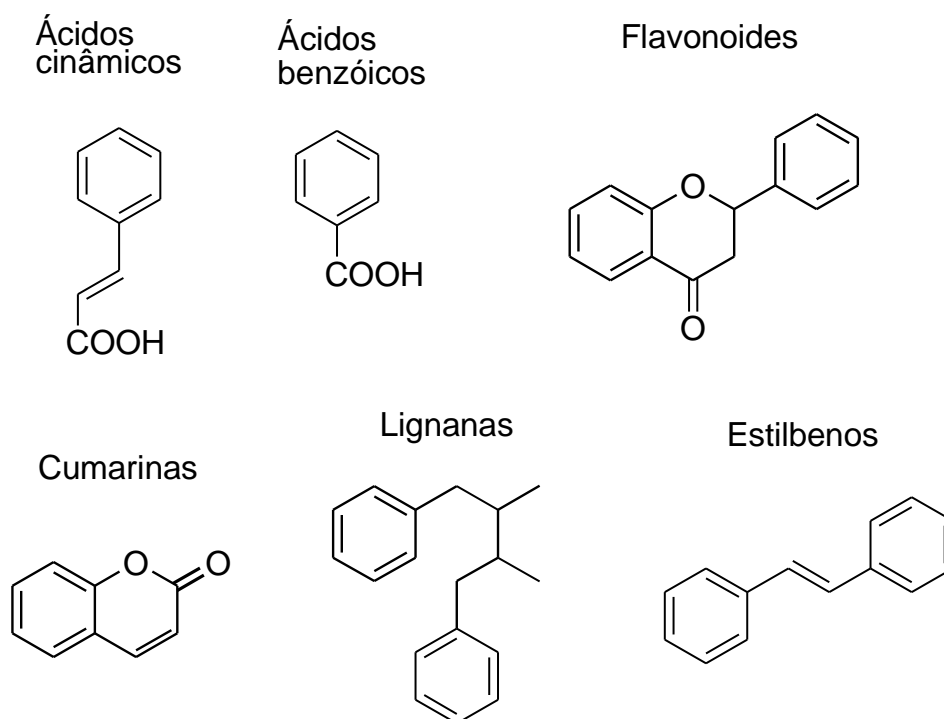


Figura 1. Estruturas básicas dos principais tipos de polifenóis.

Os polifenóis são compostos muito abundantes nos vegetais, sendo representantes importantes dos fitoquímicos presentes nas mais variadas espécies de plantas. Diversos efeitos benéficos vêm sendo atribuídos a este grande grupo de compostos bioativos, os quais englobam uma variedade de

moléculas que podem ser divididas de acordo com suas propriedades químicas em flavonoides e não flavonoides, classificação esta muito simplificada e indicativa apenas da importância dos flavonoides dentro dos polifenóis. Os flavonoides e seus polímeros são representantes importantes dos polifenóis, que são encontrados em maiores quantidades no chá-verde, vinhos, cacau, frutas (maçã, uva vermelha, morango e certas nozes) e verduras, como a cebola. Os flavonoides, portanto, também são compostos fenólicos e têm como estrutura básica o difenilpropano ou benzo- γ -pirona ($C_6C_3C_6$), sendo representados por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central (HALBWIRTH, 2010). Os flavonoides foram os primeiros metabólitos secundários de plantas a serem estudados e atualmente são agrupados em 8 classes distintas: flavanol, flavandiol, flavanona, diidroflavonol, flavona, flavonol, isoflavona e antocianidina. Fisiologicamente, os flavonoides são responsáveis por várias funções das plantas, como pigmentação, proteção contra luz UV e defesa contra patógenos. Já foram identificados mais de 8 mil compostos naturalmente abundantes com a estrutura flavonoide e esta variedade é atribuída a modificações estruturais nas classes (HODEK *et al.*, 2002).

Recentemente, um enorme número de publicações vem relatando diversas atividades biológicas dos compostos fenólicos por trazer benefícios em patologias agudas e crônicas (BENAVENTE-GARCIA, CASTILLO, 2008; ZAMORA-ROS *et al.*, 2012; ARROO, 2009), ao passo que poucos são os estudos que demonstram problemas associados a esses compostos, como por exemplo, os casos de constrição do ductus arteriosus fetal que têm sido associados à ingestão materna de alimentos ricos em polifenóis (ZIELINSKY *et al.*, 2010). Os flavonoides têm sido associados a diversos benefícios em certas condições patológicas, como na redução do risco de câncer (ARROO, 2009), diabetes (JURGONSKI *et al.*, 2013) e ainda em doenças cardiovasculares (ZAMORA-ROS *et al.*, 2012) e cerebrais (RIVERA *et al.*, 2004). Os efeitos positivos observados na prevenção dessas condições são baseados em grande parte nas propriedades antioxidantes, pelo efeito sequestrador de radicais livres, e nas propriedades anti-inflamatórias, assim como a interação com diversas enzimas (HOLLMAN, KATAN, 1999).

Um aspecto importante a ser considerado em relação aos polifenóis diz respeito às suas biodisponibilidades e propriedades cinéticas. Após a ingestão de flavonoides nos alimentos, geralmente sua absorção é considerada baixa, dependendo de suas propriedades físico-químicas, de modo que compostos com alto peso molecular e muitas ligações de hidrogênio normalmente são mal absorvidos (LIPINSKI, 2001). No estômago, os polifenóis oligoméricos se dissociam em unidades monoméricas, facilitando a absorção. Ainda, sabe-se que os flavonoides geralmente são ingeridos na dieta como glicosídeos, os quais são mal absorvidos até que sofram hidrólise enzimática por bactérias presentes no intestino delgado e cólon e liberem as agliconas, as quais são melhor absorvidas (GEE, 2001).

As vias de biotransformação são tipicamente consideradas como um meio de inativar biologicamente compostos ativos e de facilitar sua excreção (KLAASSEN, 1996). As reações enzimáticas predominantes no metabolismo de polifenóis são as de fase II, ou seja, ocorrem principalmente as reações de metilação, sulfatação e conjugação com ácido glicurônico. No entanto, a maioria dos compostos com estrutura polifenólica geralmente não são bons substratos para as enzimas do complexo citocromo P450 (SCALBERT, 2002), sendo assim pouca a influência das reações de biotransformação de fase I sobre esses compostos.

Devido à presença da estrutura catecol, o composto epigalocatequina galato (EGCG) e outras catequinas são rapidamente metiladas pela catecol-*o*-metiltransferase (COMT) no citosol utilizando *S*-adenosilmetionina como doador de grupos metila. A (-)-epigalocatequina (EGC), após sofrer metilação, forma os metabólitos 4'-*o*-metil-EGC que, assim como os metabólitos 4''-*o*-metil-EGC e 4',4''-dimetil-EGC, foram detectados em plasma e urina após ingestão de chá (LEE, 2002, MENG, 2002). Adicionalmente, os compostos EGCG e EGC também sofrem conjugação com ácido glicurônico através da UDP-glicuronosiltransferase microsomal, sendo formados principalmente os metabólitos EGCG-4''-*o*-glicuronídeo e EGC-3'-*o*-glicuronídeo, respectivamente (LU, 2003). A sulfatação é outro tipo de reação enzimática que ocorre com os flavonoides mediante a ação de sulfotransferases no fígado e intestino, tendo sido descrita para a (-)-epicatequina (EC) (VAIDYANATHAN, 2002).

Alguns polifenóis, como as catequinas do chá-verde, quando não são absorvidos no intestino delgado, podem formar metabólitos através da clivagem do anel heterocíclico C em sua estrutura básica, gerados pela microflora bacteriana presente no cólon. Demonstrou-se que a metabolização de catequinas pela flora intestinal acarreta na formação dos produtos de fissão anelar 5-(3',4',5'-trihidroxifenil)- γ -valerolactona (M4), 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (M6), e 5-(3',5'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (M6'). Estes metabólitos são absorvidos no cólon e suas excreções urinárias são maiores em relação aos flavonoides intactos. Adicionalmente, pode ocorrer a formação de ácidos fenólicos a partir dos produtos de fissão anelar. O composto M6, por exemplo, pode ainda ser transformado no fígado em ácido fenilpropiónico, o qual é convertido em ácido benzóico e este é, posteriormente, transformado em ácido hipúrico nos tecidos. De fato, estudos mostram um aumento na excreção urinária de ácido hipúrico após ingestão de chá-verde e chá-preto em humanos (MENG, 2002; SANG, 2008).

A biodisponibilidade dos polifenóis ingeridos na dieta pode ser limitada não apenas pelas propriedades físico-químicas da molécula, mas também por biotransformação através de enzimas ou da microflora bacteriana. Outro fenômeno importante que afeta a biodisponibilidade desses compostos é o chamado efluxo ativo dos polifenóis absorvidos, também chamado de metabolismo de fase III. O efluxo ativo geralmente é um mecanismo importante na detoxificação celular, pois previne o acúmulo de diversos compostos conjugados e não conjugados, que têm potencial para ser diretamente tóxicos (LESLIE, 2001). Neste processo, compostos polifenólicos podem ser transportados de dentro das células intestinais, renais e hepáticas, tanto para o lúmen, urina e bile, respectivamente, quanto para o meio intersticial, mediados por diferentes transportadores. Consequentemente, a biodisponibilidade e o acúmulo intracelular desses compostos serão afetados (LAMBERT, 2007).

Além disso, alguns estudos buscaram avaliar a possível toxicidade dos polifenóis. No entanto, os efeitos adversos decorrentes da elevada ingestão de polifenóis em fontes vegetais são pouco conhecidos, o que pode ser consequência da baixa biodisponibilidade destes compostos. Em muitos casos, efeitos negativos da ingestão de flavonoides são descritos por interação medicamentosa concomitante com ingestão de suco de toranja (*grapefruit*), o

qual apresenta os flavonoides naringenina e quercetina, além de outros compostos como furanocumarinas. Esta interação acaba por elevar a toxicidade de diversos medicamentos (DAHAN, ALTMAN, 2004) ou reduzir o efeito terapêutico da losartana, um antagonista do receptor AT1 de angiotensina II (BAILEY, DRESSER, 2004) através de inibição da enzima CYP3A4. Além disso, pode ocorrer aumento da toxicidade de agentes antihipertensivos, antiarrítmicos, digoxina, entre outros (MARZOLINI *et al.*, 2004), através da inibição da P-glicoproteína típica de suco de grapefruit e também verificada para o flavonol EGCG do chá-verde.

A ingestão de suplementos com quercetina (1000 mg por dia) durante um mês em homens com prostatite crônica ocasionou em alguns participantes náusea e dores de cabeça (SHOSKES *et al.*, 1999). Em um ensaio clínico de fase I, avaliou-se a influência da administração intravenosa de quercetina em diferentes doses em pacientes com câncer, no qual há relatos de náusea, vômitos, sudorese, vermelhidão e dispneia, sendo que nas doses de 945mg/m² houve indícios de toxicidade renal (FERRY *et al.*, 1996). Alguns estudos relatam hepatotoxicidade após consumo de suplementos contendo extratos de chá-verde (BONKOVSKY *et al.*, 2006; JAVAID, BONKOVSKY, 2006).

Em um estudo clínico em pacientes com câncer, a ingestão de 6g por dia de extratos de chá-verde contendo cafeína ocasionou efeitos adversos gastrointestinais leves a moderados, incluindo náusea, dor abdominal e diarreia, assim como sintomas do sistema nervoso central como agitação, insônia, tremores, tonturas e confusão (JATOI *et al.*, 2003; PISTERS *et al.*, 2001), sendo que os efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) seriam mais provavelmente devidos à cafeína do que ao extrato de chá-verde. Outro estudo clínico buscou avaliar a segurança de extrato de chá-verde descafeinado (contendo 800 mg/dia de EGCG) durante administração oral por 4 semanas em indivíduos saudáveis, sendo que poucos participantes relataram náusea, desconforto estomacal, tontura ou dores musculares (CHOW *et al.*, 2003). Em suma, há poucas evidências apontando para efeitos adversos ou tóxicos dos alimentos ricos em polifenóis em indivíduos saudáveis ou até mesmo em muitas condições patológicas. No entanto, não há ainda estudos suficientes para garantir a segurança do consumo de alimentos ricos em polifenóis durante a gestação ou lactação.

1.2. Efeitos dos polifenóis na inflamação

A redução no processo inflamatório é um ponto importante que contribui para os efeitos antitumorais e efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, como aterosclerose, que são descritos para os flavonoides (O'LEARY *et al.*, 2004; CHO *et al.*, 2003). O processo inflamatório pode resultar da produção de EROs por enzimas inflamatórias e pela liberação de mediadores inflamatórios que afetam a proliferação celular, angiogênese e apoptose (STEELE *et al.*, 2003) e que também são associados com um risco aumentado de infarto agudo do miocárdio (BLAKE *et al.*, 2003) ou aterosclerose, pois sabe-se atualmente que essas doenças são doenças inflamatórias.

O efeito benéfico da atividade anti-inflamatória de flavonoides em doenças cardiovasculares como a aterosclerose é relacionado com a capacidade de modular a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular, as quais são necessárias para o recrutamento de leucócitos de defesa para a parede dos vasos, no estágio inicial da aterosclerose (CHOI *et al.*, 2004; LUDWIG *et al.*, 2004). Ainda, a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) catalisa a produção de óxido nítrico (NO) necessário para manter o relaxamento das artérias ou vasodilatação (ANTER *et al.*, 2004). Em situações de prejuízo da vasodilatação dependente de NO há um aumento do risco de doenças cardiovasculares (DUFFY *et al.*, 2003).

De uma forma geral, os polifenóis são retratados como substâncias que trazem benefícios à saúde. Apesar disso, o efeito desses compostos na gestação é ainda pouco conhecido. Neste sentido, demonstrou-se um aumento de casos idiopáticos de constrição ductal prematura na população gaúcha em gestantes que consumiram alimentos ricos em polifenóis, como chá, chimarrão e derivados da uva, os quais têm comprovado efeito anti-inflamatório (LUCHESE *et al.*, 2003). Além disso, ZIELINSKY e colaboradores demonstraram também que, após a suspensão do uso dessas substâncias pelas gestantes, houve reversão dos parâmetros de constrição prematura observados (ZIELINSKY *et al.*, 2012).

1.3. Efeitos dos polifenóis no estresse oxidativo

O desequilíbrio entre os níveis de espécies oxidantes e agentes antioxidantes em um organismo é determinante para o desenvolvimento do processo conhecido como estresse oxidativo. Este desequilíbrio pode ocorrer tanto devido à produção excessiva de espécies reativas oxidantes quanto pela redução nos estoques de substâncias protetoras, chamadas de antioxidantes, que podem ser endógenos ou exógenos (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2000; FINKEL, HOLBROOK, 2000; JUNQUEIRA, RAMOS, 2005). As espécies reativas são compostos instáveis que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital eletrônico mais externo, o que as torna espécies altamente reativas que apresentam a capacidade de atuar como eletrófilos e, portanto, capazes de reagir com biomoléculas presentes nas células, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (GILLHAM *et al.*, 1997; FINDLAY *et al.*, 2005). A maioria destes compostos apresenta elevada instabilidade e tempo de meia-vida muito curto (SIES, 1997).

Diversos processos fisiológicos são responsáveis pela formação de espécies reativas, principalmente a fosforilação oxidativa, as reações de biotransformação mediadas por enzimas do complexo citocromo P450, a oxidação dos ácidos graxos, além da fagocitose mediada por macrófagos e a regulação de vias de sinalização celular (JUNQUEIRA, RAMOS, 2005; HALLIWELL, 1994; BIESALSKI, 2002), de modo que sua produção em baixos níveis nos organismos não é deletéria devido à atuação dos estoques antioxidantes endógenos. As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser espécies radiculares, como o radical superóxido (O_2^-) e os íons hidroxila (OH^\bullet), peroxila (ROO^\bullet) ou alcoxila (RO^\bullet), além de espécies não-radicalares, por exemplo o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são representadas pelo óxido nítrico (NO^\bullet), peroxinitrito (HNOO^\bullet), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-), dentre outros.

Por outro lado, as situações de estresse oxidativo propiciam o ataque de espécies reativas aos lipídios das membranas, o que desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica (URSO, CLARKSON, 2003), que origina vários produtos secundários, principalmente aldeídos, que propagam o

dano oxidativo aos lipídios em uma reação em cadeia (UCHIDA, 2000). Dentre os compostos produzidos no processo de peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), hidróxinonal e isoprostanos são muito estudados e vêm sendo utilizados como indicadores do dano lipídico (ESTERBAUER *et al.*, 1991). As proteínas também são importantes alvos do ataque oxidativo por espécies reativas nas células (DAVIES, 1999). A indução de modificações em proteínas como resultado do dano oxidativo, como a formação de 3-nitrotirosina (3-NT) e de proteínas carboniladas (PCO), não necessariamente gera alterações estruturais ou perda da função, considerando-se que dependendo do grau de dano, estes podem ser reparados ou reversíveis (DALLE-DONE *et al.*, 2005; ISCHIROPOULOS, 2009).

As atividades biológicas mais marcantes reportadas para os flavonoides são devido à capacidade de exercerem efeito antioxidante *in vitro* contra espécies reativas (HEIJINEN *et al.*, 2001; CHUN *et al.*, 2003). No entanto, estima-se que as concentrações plasmáticas e intracelulares obtidas após ingestão de altas doses de flavonoides na dieta são muito inferiores (100 a 1000 vezes menores) às obtidas por outros antioxidantes como ácido ascórbico, ácido úrico ou glutathione reduzida. Ainda, sabe-se que o extenso metabolismo sofrido por estes compostos resulta na presença de metabólitos na corrente sanguínea, sendo que alguns metabólitos apresentam atividade antioxidante menor do que o flavonoide de origem (FREI *et al.*, 2003; LOTITO *et al.*, 2006), contribuindo para sustentar que a ingestão de flavonoides *in vivo* contribui pouco para uma função antioxidante.

Os flavonoides apresentam estruturas favoráveis à quelação *in vitro* de metais, como ferro e cobre, os quais catalisam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MIRA *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2000). Já em animais esses metais encontram-se ligados às proteínas plasmáticas, o que diminui sua produção de EROs em condições fisiológicas; nas condições patológicas onde há um excesso de ferro e cobre, essa capacidade de quelar metais de transição torna-se mais significativa, porém não se sabe a real contribuição *in vivo* dos flavonoides como quelantes de metais (FREI *et al.*, 2003). Em relação ao período final da gestação, sabe-se que há uma transição do ambiente de baixa oxigenação no útero ao qual os fetos estão sujeitos para um ambiente de

maior oxigenação após o parto (BUONOCORE *et al.*, 2002), contribuindo para uma maior formação de espécies reativas de oxigênio.

1.4. Circulação fetal e o ductus arteriosus

A circulação do feto tem características particulares, diferindo assim da extra-uterina tanto anatômica quanto funcionalmente. Durante a vida intra-uterina, uma característica exclusiva do coração fetal é apresentar o ductus arteriosus (DA), que faz parte da via de saída do ventrículo direito (Vdir) e está posicionado entre a artéria pulmonar e a aorta na chamada zona ístmica (Figura 2). Este ducto tem a peculiaridade de se fechar no período pós-natal com o início da circulação pulmonar (BERGWERFF *et al.* 1999). Histologicamente, o DA apresenta uma membrana elástica interna, uma camada média muscular predominante e uma camada adventícia externa. A camada muscular aumenta com a idade gestacional e o DA possui orientação circunferencial, facilitando sua constrição fisiológica pós-natal (HO, ANDERSON, 1979; GOURNAY, 2011).

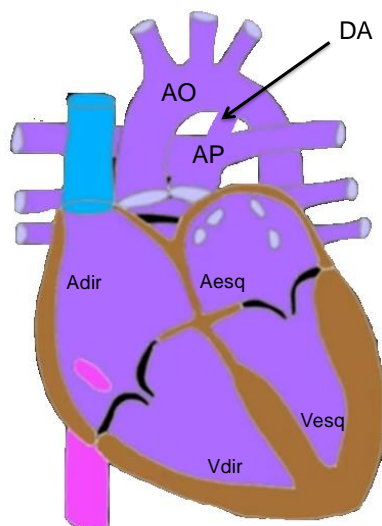


Figura 2. Representação do coração fetal, mostrando o ductus arteriosus (DA), responsável pela circulação do ventrículo direito (Vdir) através da artéria pulmonar (AP) diretamente para a aorta (AO).

O ductus arteriosus exerce um papel fundamental por direcionar o fluxo sanguíneo para os membros inferiores do feto, dirigindo 80 a 85% do débito ventricular direito (sangue pobre em oxigênio) proveniente da veia cava superior, seio coronário e uma pequena parte do sangue da veia cava inferior para a aorta descendente (TREVETT, COTTON, 2004). A maior diferença da circulação fetal para a do adulto é a baixa circulação pulmonar, que é consequência da vasoconstrição pulmonar hipóxica, que aumenta a resistência pulmonar devido à baixa tensão de oxigênio nos pulmões do feto (MICHELAKIS *et al.*, 2004). Neste contexto, a oxigenação do feto é realizada pelo sangue placentário através da veia umbilical, sendo que este sangue encontra resistência para se dirigir através da artéria pulmonar aos pulmões, de modo que a circulação para a aorta é realizada através de adaptações peculiares da circulação fetal, especificamente o forame oval e o ductus arteriosus (KISERUD, ACHARYA, 2004). Apesar da alta resistência pulmonar, 10-20% (15ml/min) são recebidos pelos pulmões, mas a maior parte do sangue mais rico em oxigênio oriundo da veia umbilical e veia cava inferior no coração fetal passa pelo ductus arteriosus para a aorta descendente, distribuindo-se para as porções inferiores do feto. Cerca de 40-50% do sangue da aorta descendente passa pelas artérias umbilicais e retorna à placenta para ser efetuada a hematose e o restante do sangue vai suprir as vísceras e a metade inferior do corpo (HO, ANDERSON, 1979).

Há uma relação entre a idade gestacional e a maturação histológica do ductus arteriosus (TADA *et al.* 1985). O espessamento intimal no feto é um processo contínuo que inicia no segundo trimestre de gestação. Esse mecanismo de espessamento intimal parece estar ligado à prostaciclina (PGI₂) sintase, que possui papel regulador na patência ductal (SLOMP *et al.* 1992). O ductus arteriosus em fechamento apresenta níveis de PGI₂ sintase mais elevados nas células musculares lisas nos locais de espessamento intimal do que em outros sítios, demonstrando uma relação da morfologia ductal com a presença de PGI₂ sintase (DE REEDER *et al.* 1989).

Alterações hemodinâmicas durante o período neonatal imediato ocorrem a partir da cessação da circulação sanguínea placentária, da insuflação e vasodilatação pulmonar e do fechamento do forame oval (que liga o átrio direito – Adir – ao átrio esquerdo – Aesq). Alguns minutos após o nascimento, 90% do

fluxo sanguíneo ejetado pelo ventrículo direito é direcionado para as artérias pulmonares, e não mais através do ductus arteriosus. Com a diminuição da resistência vascular pulmonar, ocorre um aumento de fluxo sanguíneo para os pulmões, que culmina na oclusão ductal. O fechamento funcional do ductus arteriosus é iniciado a partir de um mecanismo induzido pela maior concentração de oxigênio no sangue. Esse mecanismo, embora mediado por prostaglandinas e endotelinas, é intrínseco às células musculares lisas (MICHELAKIS *et al.*, 2004), sendo um evento potencialmente reversível em 8 a 72 horas após o nascimento, secundário à constrição muscular. Subsequentemente, há uma etapa final de remodelamento da parede vascular, com formação neointimal causada por proliferação e migração das células musculares lisas da camada média para o subendotélio com um acúmulo de glicosaminoglicanos na região subendotelial (SLOMP *et al.* 1992).

Geralmente o ductus arteriosus permanece patente por algumas horas ou dias no período neonatal. O fechamento fisiológico do ductus arteriosus no recém-nascido a termo caracteriza-se por uma fase de obliteração funcional secundário à constrição muscular da parede do vaso. O fechamento é gradual e se completa em 10 a 15 horas após o nascimento (HEYMANN, RUDOLPH, 1975). Com a oclusão completa do DA, forma-se o ligamento arterioso (BREZINKA *et al.*, 1993).

Por possuir uma camada muscular predominante, a oclusão do ductus arteriosus sofre uma influência multifatorial proveniente de fatores constritores e relaxantes. Os fatores relaxantes incluem as prostaglandinas, o óxido nítrico e a bradicinina, a qual causa liberação de prostaglandinas e de óxido nítrico. Os fatores constritores do DA são o oxigênio, a bradicinina em doses altas e o sistema nervoso simpático e parassimpático (HEYMANN, RUDOLPH, 1975). A resposta vasoconstritora é dose-dependente a vários neurotransmissores, como a acetilcolina, a histamina, a serotonina e as catecolaminas. Com o aumento da idade gestacional, o ductus arteriosus torna-se menos sensível aos efeitos dilatadores e mais sensível aos fatores constritores (HEYMANN, RUDOLPH, 1975; TARCAN *et al.*, 2004; LEVIN *et al.*, 2005). A produção de prostaglandinas ocorre pela atuação das enzimas ciclo-oxigenase 1 (COX-1), que é constitutivamente expressa, e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), cuja produção é induzida localmente durante processos inflamatórios (TAKAMI *et*

al., 2005). As prostaglandinas foram extensamente estudadas e são comprovadamente fatores que controlam a manutenção da abertura do ductus arteriosus.

Ao contrário do que acontece fisiologicamente, a constrição prematura do DA provoca repercussões hemodinâmicas fetais. A maior resistência no ductus arteriosus gera turbilhonamento do fluxo sanguíneo, evidenciado pelo aumento das velocidades sistólica e diastólica de fluxo e consequente diminuição do índice de pulsatilidade ductal. Como consequência, ocorre dilatação do tronco da artéria pulmonar, do ventrículo e do átrio direito, insuficiência tricúspide e pulmonar com disfunção sistólica e diastólica dos ventrículos (ZIELINSKY *et al.*, 2010a; ZIELINSKY *et al.*, 2010b).

A utilização de técnicas ecocardiográficas permitiu que o diagnóstico de constrição ductal, anteriormente possível apenas em necrópsias, fosse feito ainda no período pré-natal. A aferição do fluxo pelo ductus arteriosus através da técnica Doppler ecocardiográfica permitiu a monitorização dos fetos com risco de desenvolvimento de constrição prematura do ductus arteriosus e a intervenção precoce, quando necessária. Como critério diagnóstico de constrição ductal considera-se a presença, ao Doppler colorido, de fluxo turbulento no DA com velocidade sistólica (VS) máxima maior do que 1,4 m/s, velocidade diastólica (VD) máxima maior do que 0,3 m/s e/ou índice de pulsatilidade (IP) menor do que 1,9 (HUHTA *et al.*, 1987) ou, para maior sensibilidade, têm-se aceitado valores de IP menores que 2,2 (ZIELINSKY *et al.*, 2010a).

Nos casos relacionados ao uso de medicamentos, após a suspensão deste uso a disfunção ventricular pode regredir. Entretanto, quando esse quadro não for tratado, pode evoluir com isquemia endocárdica e disfunção dos músculos papilares à direita. Posteriormente, ocorre um quadro de insuficiência cardíaca, hidropisia e pode resultar em morte fetal (MOISE, 1993). A constrição ductal intra-uterina pode causar insuficiência tricúspide transitória ou permanente e isquemia miocárdica neonatal (LEVIN *et al.*, 1978; LEVIN *et al.* 1979).

Quando há evidência clínica de constrição ductal grave após o uso de drogas inibidoras da síntese de prostaglandinas, a suspensão da medicação

pode reduzir as velocidades sistólicas e diastólicas dentro de 24 horas, com posterior normalização das alterações hemodinâmicas. Os casos leves podem ser tratados somente com a diminuição da dose. Entretanto, está indicado em todos os fetos o acompanhamento ecocardiográfico seriado (NORTON, 1997).

Devido ao efeito constritivo dos AINEs sobre o ductus arteriosus ser predominantemente dose-dependente (MOMMA *et al.*, 1984), é comum o desaparecimento das alterações hemodinâmicas após a suspensão das substâncias causadoras sem o desenvolvimento de disfunção cardíaca fetal ou neonatal (RUDOLPH, 1981; RESPONDEK *et al.*, 1995). Até mesmo na evidência de constrição ductal grave após o uso de fármacos anti-inflamatórios, a suspensão do uso dos medicamentos pode demonstrar reversão das velocidades sistólica e diastólica dentro de 24 horas com posterior melhora das alterações hemodinâmicas. Em alguns casos mais graves, porém, pode haver a necessidade de interrupção da gestação com medidas de ressuscitação cardio-pulmonar ao nascimento (MOISE *et al.*, 1988; MARI *et al.*, 1989).

A hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido tem sido associada à exposição pré-natal a anti-inflamatórios não esteroides. Em fetos de ovelhas, a oclusão mecânica do ductus arteriosus antes do nascimento reproduz as características hemodinâmicas e estruturais da hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido. Além disso, a exposição pré-natal a anti-inflamatórios não esteroides em animais demonstrou alterações similares as da constrição ductal, aumentando a espessura da camada de músculo liso da vasculatura arterial pulmonar e hipertensão arterial pulmonar (SHARPE *et al.*, 1975; HEYMANN, RUDOLPH, 1975; LEVIN *et al.*, 1978; LOCK *et al.*, 1980).

Diversos fármacos são conhecidamente constritores do DA, de modo que a ingestão de fármacos anti-inflamatórios está relacionada à constrição ductal prematura, com destaque para a indometacina, que é um inibidor das ciclo-oxigenases usado para tratamento de trabalho de parto prematuro (TPP) (SHARPE *et al.*, 1975; NORTON, 1997). No entanto, diversos outros fármacos, como a nimesulida (PALADINI *et al.*, 2005), diclofenaco (AUER *et al.*, 2004), ácido acetilsalicílico, dipirona e ibuprofeno (SCHIESSL *et al.*, 2005) entre outros, também causam constrição ductal prematura. Os inibidores seletivos da ciclo-oxigenase-2, como o rofecoxib (SCHIESSL *et al.*, 2005; TAKAMI *et al.*, 2005; TOYOSHIMA *et al.*, 2006), também têm mostrado efeito constritivo sobre

o ductus arteriosus de fetos de ratos (KARADAS *et al.*, 2004) e ovelhas (TAKAHASHI *et al.*, 2000). O sulindaco, outro fármaco inibidor da síntese de prostaglandinas usado no tratamento do TPP, também demonstrou efeito constritivo sobre o ductus arteriosus, porém mais leve e transitório comparado à indometacina (RASANEN, JOUPPILA, 1995).

Os glicocorticoides também apresentam efeito sobre a patência do ductus arteriosus (CLYMAN *et al.*, 1981) e, assim como a maioria dos outros anti-inflamatórios, o efeito dos glicocorticoides sobre o ductus arteriosus é dose-dependente (MOMMA *et al.*, 1981) e sinérgico quando associados à anti-inflamatórios não esteroides, seletivos ou não para as ciclo-oxigenases, aumentando significativamente a frequência e severidade da constrição ductal (LEVY *et al.*, 1999; TAKAMI *et al.*, 2005).

CAPITULO 2 (ARTIGO II):

**Nitric oxide and oxidative stress are modulated in the polyphenol-induced
ductus arteriosus constriction in pregnant sheep**

Submetido para publicação na revista *Experimental and Toxicologic Pathology*

Este capítulo aborda o estudo experimental realizado em ovelhas no terceiro trimestre de gestação (idade gestacional >120 dias) no qual os animais foram submetidos a um consumo de alimentos ricos em polifenóis incorporados na ração normal por um período de 14 dias. Neste trabalho, observou-se que a ingestão de polifenóis induziu uma constrição prematura do ductus arteriosus (DA), com 71.6% de aumento na velocidade sistólica e 57.8% de aumento na velocidade diastólica em conjunto com uma redução de 18.9% no índice de pulsatilidade. Ainda, verificou-se um aumento de 1,7 vezes na excreção urinária de polifenóis totais, uma diminuição de 2,3 vezes nos níveis do biomarcador inflamatório NOx e alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, como um aumento em proteínas carboniladas (1.09 ± 0.09 e 1.49 ± 0.31), CAT (0.69 ± 0.39 e 1.44 ± 0.33) e GPx (37.23 ± 11.19 e 62.96 ± 15.03) apesar da redução na peroxidação lipídica (17.22 ± 2.05 e 12.53 ± 2.11) e nos tióis não proteicos (0.11 ± 0.04 e 0.04 ± 0.01) antes e depois do tratamento, respectivamente. Os parâmetros de constrição ductal se correlacionaram com NOx, CAT, GPx e proteínas carboniladas.

Os resultados deste estudo destacam a importância de reduzir o consumo de alimentos ricos em polifenóis no final da gestação tendo em vista à constrição prematura do DA através de um processo de vasoconstrição mediado por inibição de NO dos polifenóis com o envolvimento do estresse oxidativo.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o tratamento com elevados níveis de polifenóis na ração de ovelhas prenhas durante o terço final da gestação ocasionou alterações na dinâmica do ductus arteriosus (DA), especificamente aumento nas velocidades sistólicas e diastólicas e uma diminuição no índice de pulsatilidade, o que indica uma constrição prematura do DA após o consumo de polifenóis. Um estudo semelhante em ovelhas conduzido por ZIELINSKY e colaboradores (2012) também mostrou indução de constrição ductal após administração de chá-verde aos animais, porém nesse estudo não se avaliou a excreção urinária de polifenóis nem os mecanismos envolvidos neste processo (ZIELINSKY *et al.*, 2012).

Os presentes resultados mostraram que os polifenóis administrados às ovelhas foram excretados na urina, sendo uma consequência da absorção destes compostos, de modo que a avaliação dos níveis urinários de polifenóis totais foi comprovado como um bom biomarcador da ingestão destes compostos. Esta excreção aumentada de polifenóis confirma o efeito do consumo de polifenóis nas alterações cardíacas observadas e possibilita uma avaliação mais aprofundada dos mecanismos envolvidos na constrição ductal.

A peroxidação lipídica foi determinada pelos níveis de TBARS nos animais, os quais se encontraram diminuídos após o tratamento. Este achado está relacionado com a capacidade antioxidante dos polifenóis (BIESALSKI, 2007). Ainda, há relatos de um aumento na produção de EROs ao final da gestação com a aproximação do parto (MOCATTA *et al.*, 2004). Neste contexto, as defesas antioxidantes também seriam responsáveis por diminuir o processo de dano lipídico em conjunto com os polifenóis da dieta, o que foi demonstrado neste estudo através da diminuição nos níveis de tióis reduzidos

não proteicos, indicando que apesar do consumo de polifenóis, a mobilização das defesas antioxidantes endógenas foi necessária para evitar o dano oxidativo a biomoléculas, como já mostrado em relação ao dano lipídico.

Os antioxidantes enzimáticos também sofreram alterações nos animais. Houve um aumento das atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase após o tratamento, de acordo com nossos resultados anteriores condizentes com o aumento de EROs no terço final da gestação. Neste sentido, os resultados de GPx, TBARS e tióis reduzidos indicam o envolvimento da enzima GPx com o sistema da glutathione para consumir os peróxidos lipídicos formados com a aproximação do parto nos animais e evitar assim dano aos lipídeos de membrana.

Apesar do não envolvimento de dano lipídico, observou-se um aumento no dano proteico através da dosagem de proteínas carboniladas, indicando que somente a via de dano proteico está envolvida nas alterações sofridas pelos animais em estudo. Os níveis de 3-nitrotirosina (3-NT) não foram significativamente alterados, o que pode estar relacionado com a baixa meia-vida da 3-NT em plasma e dos mecanismos de degradação proteica, reparo e eliminação, que podem levar a alterações transientes por nitrosilação de proteínas (GREENACRE *et al.*, 2001; ISCHIROPOULOS, 2009)

Os resultados anteriores indicam que o consumo de polifenóis foi capaz de induzir constrição ductal prematura nos fetos de ovelhas e ainda alterações em biomarcadores de estresse oxidativo. Os polifenóis enquanto antioxidantes exógenos possivelmente atuaram sinergicamente com as defesas antioxidantes endógenas contra o desequilíbrio nas EROs, exercendo um papel protetor, porém foram associados às alterações ecocardiográficas nos

corações fetais. Apesar desta dualidade, poderia se esperar que os polifenóis desempenharam um efeito anti-inflamatório vascular mediado por NO nos animais, o que de fato foi observado neste estudo, que pode ter contribuído mais do que as alterações oxidativas. No entanto, não se pode excluir o efeito observado nos parâmetros de estresse oxidativo, que mostraram dano proteico nos animais apesar do consumo de polifenóis, sendo que as espécies reativas não foram sequestradas pelas defesas antioxidantes e induziram dano oxidativo proteico, o qual pode ter contribuído para o desenvolvimento das alterações cardiovasculares prematuras observadas nos fetos, além do possível efeito anti-inflamatório. Neste contexto, muitos estudos apontam o envolvimento das EROs na indução de contração do DA através da ativação de diferentes vias de sinalização, como a inibição de canais de potássio dependentes de voltagem e ativação da sinalização pela via da Rho-cinase, os quais estão associados a contração de músculo liso (MICHELAKIS *et al.*, 2002; THÉBAUD *et al.*, 2004; KAJIMOTO *et al.*, 2007) além de alterar o estado redox mitocondrial (REEVE *et al.*, 2001).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio com diversas propriedades biológicas, atuando como um vasodilatador, neurotransmissor e mediador da inflamação (DUSSE *et al.*, 2005). O radical NO apresenta uma meia-vida sérica muito curta e reage com espécies reativas circulantes para produzir metabólitos inorgânicos mais estáveis, especificamente os nitritos e nitratos (ROMITELLI *et al.*, 2007), que podem ser estimados como a razão de nitritos/nitratos (NO_x).

As ovelhas apresentaram uma diminuição nos níveis de NO_x após o consumo de polifenóis, o que indica um efeito vasoconstritor e anti-inflamatório.

Há estudos mostrando que durante a gravidez o NO é responsável por manter a abertura do ductus arteriosus, o que com a aproximação do parto acaba se invertendo, uma vez que o ducto fetal se torna menos sensível ao efeito dilatador do NO com o avanço da idade gestacional (ARCHER, 1996). Os resultados do presente trabalho indicam que os polifenóis foram capazes de acelerar a constrição ductal fisiológica quando consumidos no final da gestação e portanto conduzir a uma constrição ductal prematura. Ainda, os presentes resultados não mostraram alterações de PGE₂, no entanto outros biomarcadores relacionados às vias de biossíntese de prostaglandinas deveriam ser avaliados, como outras prostaglandinas, isoprostanos e ácido araquidônico séricos, ou as isoformas de ciclo-oxigenases em linfócitos (TAKAHASHI *et al.*, 2000; KALLAPUR *et al.*, 2011).

Recentemente, Chen e colaboradores. (2012) propuseram que os isoprostanos seriam novos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo que são capazes de promover a constrição prematura do ductus arteriosus em ratos. Os autores mostraram que a exposição aos isoprostanos 8-iso-PGF₂ α e 8-Iso-PGE₂ foi capaz de induzir constrição do DA em fetos de ratos sob condições normais de oxigenação fetal através da atuação em receptores de tromboxano A₂ (TxA₂) (CHEN *et al.*, 2012). Os isoprostanos são produzidos pelo dano oxidativo a lipídios de membrana, especialmente o ácido araquidônico, ao passo que as prostaglandinas são produzidas através da ação enzimática das ciclo-oxigenases. Diante disso, o consumo de polifenóis deste estudo pode ter interferido principalmente com a síntese de isoprostanos em comparação com as prostaglandinas, indicando menor envolvimento da via mediada por ciclo-oxigenases. Esta preferência pela via dos isoprostanos se

justificaria pelo envolvimento do estresse oxidativo nesta via, especialmente devido ao caráter antioxidante e anti-inflamatório dos polifenóis, e estudos adicionais devem ser realizados para confirmar este comportamento.

Os estudos disponíveis na literatura em relação à dinâmica do ducto fetal tem como foco basicamente avaliar a influência de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ou glicocorticoides tanto na indução de constrição prematura do DA (RASANEN *et al.*, 1995; LEVY *et al.*, 1999; PALADINI *et al.*, 2005) quanto nos casos de ductus arteriosus patente (DAP), nos quais busca-se o fechamento farmacológico do DA porque a patência do ductus arteriosus é mantida mesmo após o nascimento (SIVANANDAN *et al.*, 2013). Portanto, poucos estudos foram realizados na avaliação de constrição prematura do DA sem relação com ingestão de AINEs (ZIELINSKY *et al.*, 2010; KAPADIA *et al.*, 2010; ZIELINSKY *et al.*, 2012), o que é relevante já que estes fármacos são anti-inflamatórios enquanto os polifenóis em geral apresentam atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, gerando efeitos diferentes.

ZIELINSKY e colaboradores (2010) demonstraram que a ingestão de alimentos ricos em polifenóis ao final da gestação foi capaz de induzir constrição prematura do DA em fetos humanos e recentemente os mesmos autores reportaram a reversão destes efeitos constritores do DA após a orientação às gestantes restringirem da dieta o consumo de alimentos ricos em polifenóis (ZIELINSKY *et al.*, 2012). Observações similares também foram feitas por KAPADIA e colaboradores (2010), que divulgaram um relato de caso onde houve o fechamento pré-natal do DA com a ingestão materna de um suco comercial rico em antocianinas e proantocianidinas.

Além do dano protéico através de proteínas carboniladas (PCO), este estudo apresenta correlações entre as alterações ductais com dano oxidativo a proteínas, sendo que PCO foi correlacionada com VS, VD e com o IP, indicando que a constrição ductal estava associada com o dano proteico, condiz com o aumento de EROs descrito para este período gestacional. Por outro lado, a peroxidação lipídica estava diminuída após o consumo de ARP pelas ovelhas, e foi demonstrado neste estudo correlações entre os três parâmetros ecocardiográficos e TBARS, corroborando a relação inversa de dano lipídico com as alterações ductais que no contexto geral sugere um efeito protetor dos polifenóis contra o dano lipídico ao invés de contribuir para a constrição do ductus arteriosus.

Ainda, demonstrou-se uma correlação positiva entre NOx e TBARS. Considerando que o consumo de polifenóis diminuiu TBARS e que os polifenóis também induziram uma redução dos níveis de NOx, pode-se explicar que os animais tratados com polifenóis apresentando baixos níveis de NOx, e portanto um efeito anti-inflamatório, estariam com menor dano lipídico devido a um efeito antioxidante atribuído aos polifenóis. Além disso, o NO e seus produtos nitritos e nitratos podem levar ao desenvolvimento de dano lipídico (O'DONNELL *et al.*, 1999), logo baixos níveis de NOx seriam associados com menor peroxidação lipídica.

As velocidades sistólicas e diastólicas também apresentaram correlações negativas com os níveis de NOx além da correlação positiva entre IP e NOx. Estes achados corroboram nossos resultados da influência da diminuição nos níveis de NOx no desenvolvimento de constrição do ductus arteriosus em ovelhas prenhas após alto consumo de polifenóis.

Além disso, o aumento na tensão de oxigênio que ocorre nos fetos durante o final da gestação com a aproximação do parto é responsável pela constrição fisiológica do DA (ARCHER, 1996, MICHELAKIS *et al.*, 2002) em conjunto com o aumento na produção de EROs evidenciado com a aproximação do parto (MOCATTA *et al.*, 2004) corroboram os presentes resultados do envolvimento do estresse oxidativo pela ativação de GPx e catalase no terço final da gestação de ovelhas, apesar do também constatado efeito antioxidante dos polifenóis consumidos. As correlações entre VS e catalase assim como IP e GPx confirmam o envolvimento das enzimas antioxidantes na constrição ductal prematura.

Ainda em relação às enzimas antioxidantes endógenas, pode-se inferir o comportamento antioxidante e anti-inflamatório do tratamento com polifenóis através das correlações negativas entre NOx e GPx e entre NOx e catalase, mostrando que um aumento em ambas atividades enzimáticas foi associado com um efeito anti-inflamatório pela inibição de NO. Neste sentido, há relatos de que o NO é capaz de se ligar reversivelmente à catalase e inibi-la (BROWN, 1995), explicando a alta correlação entre ambos os biomarcadores.

Atualmente há necessidade de mais estudos através de modelos animais nos mecanismos que estão envolvidos na constrição ductal e o presente estudo não apenas indica que o consumo de polifenóis na dieta é capaz de induzir constrição prematura do DA, mas também evidencia que a habilidade dos polifenóis em modular uma vasoconstrição mediada por óxido nítrico está relacionada com a constrição ductal induzida por estes compostos. Ainda, até onde se sabe este é o primeiro estudo a demonstrar que os polifenóis da dieta de fato atuam por um mecanismo anti-inflamatório baseado

na diminuição de NO em conjunto com a modulação de vias de sinalização de estresse oxidativo na indução de constrição prematura do ductus arteriosus.

Por fim, os resultados deste trabalho indicam a importância em se realizar uma orientação dietética em relação ao consumo de alimentos ricos em polifenóis ao final da gestação de modo a evitar constrição prematura do DA e, além disso, apontam para o envolvimento dos mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes dos polifenóis no processo de constrição ductal prematura em ovelhas no terço final de gestação.

CONCLUSÃO

- ✓ Este estudo relata que o consumo de alimentos ricos em polifenóis em ovelhas no terço final de gestação induz uma constrição prematura do ductus arteriosus.
- ✓ Verificou-se um aumento na excreção de polifenóis totais nas ovelhas após a administração de polifenóis, confirmando os polifenóis totais como bons biomarcadores para avaliar o consumo de polifenóis na dieta além de garantir a absorção destes compostos após ingestão.
- ✓ Houve alterações no sistema antioxidante endógeno através da redução nos níveis de tióis reduzidos não proteicos, que está relacionado com o aumento de EROs verificado com o aumento da idade gestacional e condizente com a redução na peroxidação lipídica, indicando um papel protetor dos polifenóis contra o dano lipídico e ausência de relação com constrição ductal.
- ✓ O dano proteico encontrou-se aumentado por meio de proteínas carboniladas, que também foi correlacionado com os parâmetros de constrição ductal, mostrando o envolvimento deste tipo de dano na constrição prematura do DA induzida por polifenóis.
- ✓ Os antioxidantes enzimáticos endógenos glutathione peroxidase e catalase estavam aumentados nos animais, sendo que ambos foram correlacionados com parâmetros de constrição ductal e apontando o envolvimento deste mecanismo na constrição prematura do DA.
- ✓ Houve uma redução nos níveis de NOx nos animais tratados com polifenóis, indicando o envolvimento de um mecanismo anti-inflamatório por trás da ação vasoconstritora dos polifenóis que desencadeou a constrição prematura do DA nos fetos de ovelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTER, E. *et al.* Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. **J Biol Chem**, v. 279, n. 45, p. 46637-43, 2004.

ARCHER, N. Drug induced closure of patent ductus arteriosus. **Heart**, v. 76, n. 5, p. 384-5, 1996.

ARROO, R. R. J. *et al.* Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: dietary flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 2, p. 375-386, 2009.

AUER, M. *et al.* Prenatal diagnosis of intrauterine premature closure of the ductus arteriosus following maternal diclofenac application. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 23, n. 5, p. 513-6, 2004.

BAILEY, D. G.; DRESSER, G. K. Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 4, n. 5, p. 281-97, 2004.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **J Nutr**, v. 133, n. 10, p. 3248S-3254S, 2003.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 15, p. 6185-205, 13 2008.

BERGWERFF, M.; DERUITER, M. C.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider. **Anat Embryol (Berl)**, v. 200, n. 6, p. 559-71, 1999.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BIESALSKI, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, n. 6, p. 724-8, 2007.

BLAKE, G. J.; RIDKER, P. M. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. **J Am Coll Cardiol**, v. 41, n. 4 Suppl S, p. 37S-42S, 2003.

BONKOVSKY, H. L. Hepatotoxicity associated with supplements containing Chinese green tea (*Camellia sinensis*). **Ann Intern Med**, v. 144, n. 1, p. 68-71, 2006.

BREZINKA, C.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; WLADIMIROFF, J. W. The fetal ductus arteriosus, a review. **Zentralbl Gynakol**, v. 115, n. 10, p. 423-32, 1993.

BUONOCORE, G. *et al.* Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. **Pediatric Research**, v. 52, n. 1, p. 46-9, 2002.

CHEN, J. X. *et al.* Isoprostanes as physiological mediators of transition to newborn life: novel mechanisms regulating patency of the term and preterm ductus arteriosus. **Pediatric Research**, v. 72, n. 2, p. 122-128, 2012.

CHENG, I. F.; BREEN, K. On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. **Biometals**, v. 13, n. 1, p. 77-83, 2000.

CHO, S. Y. *et al.* Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Mol Cell Biochem**, v. 243, n. 1-2, p. 153-60, 2003.

CHOI, J. S. *et al.* Flavones mitigate tumor necrosis factor- α -induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- κ B. **J Nutr**, v. 134, n. 5, p. 1013-9, 2004.

CHOW, H. H. *et al.* Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 9, p. 3312-9, 2003.

CHUN, O. K.; KIM, D. O.; LEE, C.Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. **J Agric Food Chem.**, v. 51, n. 27, p. 8067-8072, 2003.

CLYMAN, R. I. *et al.* Prenatal administration of betamethasone for prevention of patient ductus arteriosus. **J Pediatr**, v. 98, n. 1, p. 123-6, 1981.

DAHAN, A.; ALTMAN, H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability--mechanism, extent and relevance. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2004.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Proteins as biological markers of oxidative/nitrosative stress in diseases. The contribution of redox-proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 55-99, 2005.

DAVIES, M. J. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 1151-1161, 1999.

DE LA LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 5, p. 405-30, 2005.

DE REEDER, E. G. *et al.* Distribution of prostacyclin synthase, 6-keto-prostaglandin F1 alpha, and 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase in the normal and persistent ductus arteriosus of the dog. **Am J Pathol**, v. 135, n. 5, p. 881-7, 1989.

DUFFY, S. J.; VITA, J. A. Effects of phenolics on vascular endothelial function. **Curr Opin Lipidol**, v. 14, n. 1, p. 21-7, 2003.

DUSSE, L. M. *et al.* Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clin Chim Acta**, v. 362, n. 1-2, p. 195-7, 2005.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p.81-128, 1991.

FERRY, D. R. *et al.* Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. **Clin Cancer Res**, v. 2, n. 4, p. 659-68, 1996.

FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 374-379, 2005.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FREI, B.; HIGDON, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **J Nutr.**, v. 133, n. 10, p. 3275S-3284S, 2003.

GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 11, p. 1245-55, 2001.

GERONIKAKI, A. A.; GAVALAS, A. M. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 9, n. 6, p. 425-42, 2006.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills': Biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997. p. 196-202.

GOURNAY, V. The ductus arteriosus: physiology, regulation, and functional and congenital anomalies. **Arch Cardiovasc Dis**, v. 104, n. 11, p. 578-85, 2011.

GREENACRE, S. A.; ISCHIROPOULOS, H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. **Free Radic Res**, v. 34, n. 6, p. 541-81, 2001.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of New York Academy Science**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HALBWIRTH, H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. **Int J Mol Sci**, v. 11, n. 2, p. 595-621, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HEIJNEN, C. G.; HAENEN, G. R.; VAN ACKER, F. A.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. **Toxicol In Vitro**, v. 15, n. 1, p. 3-6, 2001.

HEYMANN, M. A.; RUDOLPH, A. M. Control of the ductus arteriosus. **Physiol Rev**, v. 55, n. 1, p. 62-78, 1975.

HO, S. Y.; ANDERSON, R. H. Anatomical closure of the ductus arteriosus: a study in 35 specimens. **J Anat**, v. 128, n. 4, p. 829-36, 1979.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem Biol Interact**, v. 139, n. 1, p. 1-21, 22 2002.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem Toxicol**, v. 37, n. 9-10, p. 937-42, 1999.

HUHTA, J. C. *et al.* Detection and quantitation of constriction of the fetal ductus arteriosus by Doppler echocardiography. **Circulation**, v. 75, n. 2, p. 406-12, 1987.

ISCHIROPOULOS, H. Protein tyrosine nitration--an update. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, n. 2, p. 117-21, 2009.

JATOI, A. *et al.* A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 6, p. 1442-6, 2003.

JAVAID, A.; BONKOVSKY, H. L. Hepatotoxicity due to extracts of Chinese green tea (*Camellia sinensis*): a growing concern. **J Hepatol**, v. 45, n. 2, p. 334-5, 2006.

JUNQUEIRA, V. B. C.; RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. **Geriatría e gerontologia**. Barueri : Manole Ltda, 2005. Cap. 24, p. 315-324.

JURGONSKI, A.; JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z. An anthocyanin-rich extract from Kamchatka honeysuckle increases enzymatic activity within the gut and ameliorates abnormal lipid and glucose metabolism in rats. **Nutrition**, 2013.

KAJIMOTO, H. *et al.* Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. **Circulation**, v. 115, n. 13, p. 1777-88, 2007.

KALLAPUR, S. G. *et al.* Pulmonary and systemic inflammatory responses to intra-amniotic IL-1alpha in fetal sheep. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 301, n. 3, p. L285-95, 2011.

KARADAS, B. *et al.* Comparison of effects of cyclooxygenase inhibitors on myometrial contraction and constriction of ductus arteriosus in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 485, n. 1-3, p. 289-98, 2004.

KISERUD, T.; ACHARYA, G. The fetal circulation. **Prenat Diagn**, v. 24, n. 13, p. 1049-59, 2004.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. Ed. 5, McGraw-Hill: New York, p. 1111, 1996.

KUMAR, N. *et al.* Green tea polyphenols in the prevention of colon cancer. **Front Biosci**, v. 12, p. 2309-15, 2007.

LAMBERT, J. D.; SANG, S.; YANG, C. S. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. **Mol Pharm**, v. 4, n. 6, p. 819-25, 2007.

LEE, M. J. *et al.* Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 10, p. 1025-32, 2002.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. **Toxicology**, v. 167, n. 1, p. 3-23, 2001.

LEVIN, D. L. *et al.* Fetal hypertension and the development of increased pulmonary vascular smooth muscle: a possible mechanism for persistent pulmonary hypertension of the newborn infant. **J Pediatr**, v. 92, n. 2, p. 265-9, 1978.

LEVIN, D. L.; MILLS, L. J.; WEINBERG, A. G. Hemodynamic, pulmonary vascular, and myocardial abnormalities secondary to pharmacologic constriction of the fetal ductus arteriosus. A possible mechanism for persistent pulmonary

hypertension and transient tricuspid insufficiency in the newborn infant. **Circulation**, v. 60, n. 2, p. 360-4, 1979.

LEVIN, M. *et al.* ATP depletion and cell death in the neonatal lamb ductus arteriosus. **Pediatric Research**, v. 57, n. 6, p. 801-5, 2005.

LEVY, R. *et al.* Indomethacin and corticosteroids: an additive constrictive effect on the fetal ductus arteriosus. **Am J Perinatol**, v. 16, n. 8, p. 379-83, 1999.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LOCK, J. E. *et al.* Indomethacin-induced pulmonary vasoconstriction in the conscious newborn lamb. **Am J Physiol**, v. 238, n. 5, p. H639-51, 1980.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? **Free Radic Biol Med.**, v. 41, n. 12, p. 1727-1746, 2006.

LU, H. *et al.* Glucuronides of tea catechins: enzymology of biosynthesis and biological activities. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 4, p. 452-61, 2003.

LUCHESE, S.; MANICA, J. L.; ZIELINSKY, P. Intrauterine ductus arteriosus constriction: analysis of a historic cohort of 20 cases. **Arq Bras Cardiol**, v. 81, n. 4, p. 405-10, 399-404, 2003.

LUDWIG, A. *et al.* The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 3, p. 659-65, 2004.

MARI, G. *et al.* Doppler assessment of the pulsatility index of the middle cerebral artery during constriction of the fetal ductus arteriosus after indomethacin therapy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 161, n. 6, p. 1528-31, 1989.

MARZOLINI, C. *et al.* Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther**, v. 75, n. 1, p. 13-33, 2004.

MENG, X. *et al.* Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. **Chem Res Toxicol**, v. 15, n. 8, p. 1042-50, 2002.

MICHELAKIS, E. D. *et al.* Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 6, p. 1119-36, 2004.

MICHELAKIS, E. D. *et al.* O₂ sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K⁺ channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. **Circ Res**, v. 91, n. 6, p. 478-86, 2002.

MIRA, L.; FERNANDEZ, M. T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORENCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free Radic Res.**, v. 36, n. 11, p. 1199-1208, 2002.

MOCATTA, T. J. *et al.* The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. **Free Radic Res**, v. 38, n. 2, p. 185-91, 2004.

MOISE, K. J., JR. *et al.* Indomethacin in the treatment of premature labor. Effects on the fetal ductus arteriosus. **N Engl J Med**, v. 319, n. 6, p. 327-31, 1988.

MOISE, K. J., JR. Effect of advancing gestational age on the frequency of fetal ductal constriction in association with maternal indomethacin use. **Am J Obstet Gynecol**, v. 168, n. 5, p. 1350-3, 1993.

MOMMA, K.; HAGIWARA, H.; KONISHI, T. Constriction of fetal ductus arteriosus by non-steroidal anti-inflammatory drugs: study of additional 34 drugs. **Prostaglandins**, v. 28, n. 4, p. 527-36, 1984.

MOMMA, K.; NISHIHARA, S.; OTA, Y. Constriction of the fetal ductus arteriosus by glucocorticoid hormones. **Pediatric Research**, v. 15, n. 1, p. 19-21, 1981.

NORTON, M. E. Teratogen update: fetal effects of indomethacin administration during pregnancy. **Teratology**, v. 56, n. 4, p. 282-92, 1997.

O'LEARY, K. A. *et al.* Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. **Mutat Res**, v. 551, n. 1-2, p. 245-54, 2004.

PALADINI, D.; MARASINI, M.; VOLPE, P. Severe ductal constriction in the third-trimester fetus following maternal self-medication with nimesulide. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 25, n. 4, p. 357-61, 2005.

PISTERS, K. M. *et al.* Phase I trial of oral green tea extract in adult patients with solid tumors. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1830-8, 2001.

RASANEN, J.; JOUPPILA, P. Fetal Cardiac-Function and Ductus-Arteriosus during Indomethacin and Sulindac Therapy for Threatened Preterm Labor - a Randomized Study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, n. 1, p. 20-25, 1995.

REEVE, H. L. *et al.* Redox control of oxygen sensing in the rabbit ductus arteriosus. **Journal of Physiology-London**, v. 533, n. 1, p. 253-261, 2001.

RESPONDEK, M.; WEIL, S. R.; HUHTA, J. C. Fetal echocardiography during indomethacin treatment. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 5, n. 2, p. 86-9, 1995.

RIVERA, F. *et al.* Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure-activity relationship. **Neurotox Res**, v. 6, n. 7-8, p. 543-53, 2004.

ROMITELLI, F. *et al.* Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 851, n. 1-2, p. 257-267, 2007.

RUDOLPH, A. M. The effects of nonsteroidal antiinflammatory compounds on fetal circulation and pulmonary function. **Obstet Gynecol**, v. 58, n. 5, p. 63S-7S, 1981.

SANG, S.; YANG, C. S. Structural identification of novel glucoside and glucuronide metabolites of (-)-epigallocatechin-3-gallate in mouse urine using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 22, n. 22, p. 3693-9, 2008.

SCALBERT, A. *et al.* Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 6, p. 276-82, 2002.

SCHIESSL, B. *et al.* Prenatal constriction of the fetal ductus arteriosus--related to maternal pain medication? **Z Geburtshilfe Neonatol**, v. 209, n. 2, p. 65-8, 2005.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clin Nutr**, v. 24, n. 3, p. 360-6, 2005.

SHARPE, G. L.; LARSSON, K. S.; THALME, B. Studies on closure of the ductus arteriosus. XII. In utero effect of indomethacin and sodium salicylate in rats and rabbits. **Prostaglandins**, v. 9, n. 4, p. 585-96, 1975.

SHOSKES, D. A. *et al.* Quercetin in men with category III chronic prostatitis: A preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. **Urology**, v. 54, n. 6, p. 960-963, 1999.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SLOMP, J. *et al.* Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. **Atherosclerosis**, v. 93, n. 1-2, p. 25-39, 1992.

STEELE, V. E. *et al.* Mechanisms and applications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of cancer. **Mutat Res**, v. 523-524, p. 137-44, 2003.

TADA, T. *et al.* Human ductus arteriosus. A histological study on the relation between ductal maturation and gestational age. **Acta Pathol Jpn**, v. 35, n. 1, p. 23-34, 1985.

TAKAHASHI, Y. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors constrict the fetal lamb ductus arteriosus both in vitro and in vivo (vol 48, R1496, 2000). **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 6, p. Ra3-Ra3, 2000.

TAKAMI, T.; MOMMA, K.; IMAMURA, S. Increased constriction of the ductus arteriosus by dexamethasone, indomethacin, and rofecoxib in fetal rats. **Circ J**, v. 69, n. 3, p. 354-8, 2005.

TARCAN, A. *et al.* Persistent pulmonary hypertension in a premature newborn after 16 hours of antenatal indomethacin exposure. **J Perinat Med**, v. 32, n. 1, p. 98-9, 2004.

THEBAUD, B. *et al.* Oxygen-sensitive Kv channel gene transfer confers oxygen responsiveness to preterm rabbit and remodeled human ductus arteriosus: implications for infants with patent ductus arteriosus. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1372-9, 2004.

TOYOSHIMA, K. *et al.* Constriction of the ductus arteriosus by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 in near-term and preterm fetal rats. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 79, n. 1-2, p. 34-42, 2006.

TREVETT, T. N., JR.; COTTON, J. Idiopathic constriction of the fetal ductus arteriosus. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 23, n. 5, p. 517-9, 2004.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1685-96, 2000.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VAIDYANATHAN, J. B.; WALLE, T. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. **Drug Metab Dispos**, v. 30, n. 8, p. 897-903, 2002.

ZAMORA-ROS, R. *et al.* High urinary levels of resveratrol metabolites are associated with a reduction in the prevalence of cardiovascular risk factors in high-risk patients. **Pharmacol Res**, v. 65, n. 6, p. 615-20, 2012.

ZIELINSKY, P. *et al.* Fetal ductal constriction caused by maternal ingestion of green tea in late pregnancy: an experimental study. **Prenat Diagn**, v. 32, n. 10, p. 921-6, 2012.

ZIELINSKY, P. *et al.* Maternal consumption of polyphenol-rich foods in late pregnancy and fetal ductus arteriosus flow dynamics. **J Perinatol**, v. 30, n. 1, p. 17-21, 2010.

ZIELINSKY, P. *et al.* New insights on fetal ductal constriction: role of maternal ingestion of polyphenol-rich foods. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 8, n. 2, p. 291-8, 2010.

ZIELINSKY, P. *et al.* Reversal of fetal ductal constriction after maternal restriction of polyphenol-rich foods: an open clinical trial. **J Perinatol**, v. 32, p. 574-9, 2012.

ANEXO I

Carta de confirmação da submissão do artigo II

From: **Experimental and Toxicol. Pathology** <ExpToxicPathol@cultex-laboratories.com>

Date: 2013/3/20

Subject: Submission Confirmation

To: solange.garcia@ufrgs.br

Dear GarciaSC,

We have received your article "Nitric oxide and oxidative stress are modulated in the polyphenol-induced ductus arteriosus constriction in pregnant sheep" for consideration for publication in Experimental and Toxicologic Pathology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/etp/>

2. Enter these login details:

Your username is: solange.garcia@ufrgs.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/ETP/automail_query.asp.

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Experimental and Toxicologic Pathology

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO II A

Documento de aprovação no comitê de ética em pesquisa



INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Porto Alegre, 28 de agosto de 2006.

Ao Pesquisador
Coordenador do Projeto
Dr. Paulo Zielinsky
e/c
Coordenadora
Divisão de Produção Científica
Unidade de Pesquisa
Sra. Maria Del Carmem Stefani
Nesta Instituição

Ref. Projeto de Pesquisa – UP N° 3888.06 encaminhado para apreciação e julgamento ao Comitê de Ética em Pesquisa do IC/FUC.

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto de Pesquisa “*Constricção Ductal durante a Vida Fetal induzida por Ingestão Materna de Substâncias de Uso Comum: Um Estudo Experimental*”


Coordenador na Instituição: Dr. Paulo Zielinsky

Parecer: Aprovado em reunião extra de 02 de agosto de 2006.

Sem mais para o momento,

Importante: Documentação do Projeto em trâmite para ser arquivada na Unidade de Pesquisa.

Atenciosamente,


Dr. Ari Tadeu Lirio dos Santos
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
IC/FUC

Av. Princesa Isabel, 370 Bairro Santana – Porto Alegre – RS CEP: 90.620.001 - secretariageral-up@cardiologia.org.br

RECEBIMOS	06/09/06
Nº DE	600106
TR	Reunião CEP
DATA	28/08/06

ANEXO II B

Documento de aprovação no comitê de ética em pesquisa



INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Porto Alegre, 28 de agosto de 2006.

Ao Pesquisador
Coordenador do Projeto
Dr. Paulo Zielinsky
e/c
Coordenadora
Divisão de Produção Científica
Unidade de Pesquisa
Sra. Maria Del Carmem Stefani
Nesta Instituição

Ref. Projeto de Pesquisa – UP N° 3888.06 EMENDA encaminhada para apreciação e julgamento ao Comitê de Ética em Pesquisa do IC/FUC.

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou a Emenda referente ao Projeto de Pesquisa
“*Construção Ductal durante a Vida Fetal induzida por Ingestão Materna de Substâncias de Uso Comum: Um Estudo Experimental*”

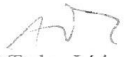
Coordenador na Instituição: Dr. Paulo Zielinsky

Parecer: Aprovado em reunião ordinária mensal de 16 de agosto de 2006.

Sem mais para o momento,

Importante: Documentação do Projeto em trâmite para ser arquivada na Unidade de Pesquisa.

Atenciosamente,


Dr. Ari Tadeu Lirio dos Santos
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
IC/FUC

Av. Princesa Isabel, 370 Bairro Santana – Porto Alegre – RS CEP: 90.620.001 – secretariageral-up@cardiologia.org.br

RECEBIDO:	06/09/06
Nº DE PROTOCOLO:	001/06
TRAMITE:	Revisão CEP