

**EFEITO DA INGESTÃO DO CHÁ BRANCO (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA VEGF NO CORPO LÚTEO E
PROLIFERAÇÃO CELULAR NO ENDOMÉTRIO DE RATAS SUPEROVULADAS**

FRANCISLAINE ANELIZE GARCIA SANTOS

**EFEITO DA INGESTÃO DO CHÁ BRANCO (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA VEGF NO CORPO LÚTEO E
PROLIFERAÇÃO CELULAR NO ENDOMÉTRIO DE RATAS SUPEROVULADAS**

FRANCISLAINE ANELIZE GARCIA SANTOS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora:
Prof^a. Dra^a. Ines Cristina Giometti

636.089 26 Santos, Francislaine Anelize Garcia.

S237e

Efeito da ingestão do chá branco (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sobre a expressão gênica do sistema VEGF no corpo lúteo e proliferação celular no endométrio de ratas superovuladas / Francislaine Anelize Garcia Santos. – Presidente Prudente, 2015. 46 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientadora: Ines Cristina Giometti.

1. Fator de crescimento endotélio-vascular. 2. Chá branco. 3. Ovário. 4. RT-PCR. 5. AgNOR. I. Título.

FRANCISLAINE ANELIZE GARCIA SANTOS

**EFEITO DA INGESTÃO DO CHÁ BRANCO (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA VEGF NO CORPO LÚTEO E
PROLIFERAÇÃO CELULAR NO ENDOMÉTRIO DE RATAS SUPEROVULADAS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 11 de dezembro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra^a. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Botucatu - SP

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo Dom da Vida. A Nossa Senhora, por ser minha fiel intercessora e ao meu anjo da guarda, por me proteger e zelar.

Aos meus pais, José e Elza por todo apoio, paciência e amor dedicado constantemente.

À minha irmã Miriam, por todo carinho e companheirismo.

Aos meus tios Valdir e Edna que contribuíram muito para meu crescimento, cada incentivo foi primordial.

Aos meus queridos primos Valdir e Vinicius, pelo convívio e amizade, no qual tenho um carinho imenso.

À Lídio, Sandra e Mariane pelo acolhimento, carinho e cuidado de sempre.

Ao meu namorado Fernando, por todo amor, incentivo e paciência, seu auxílio foi fundamental.

A todos meus queridos amigos e amigas, por me proporcionar momentos de alegria e fraternidade.

Ao meu avô (in memoriam) que me incentivava e me ensina sobre a vida.
Saudades.

À minha querida avó (in memoriam), por ver sua alegria ao ser selecionada para o mestrado, pelas ligações diárias de preocupação e pelo seu imensurável amor.
Minha saudade por você será eterna.

AGRADECIMENTOS

À minha estimada orientadora Profa. Dra. Ines Cristina Giometti, por todo seu conhecimento compartilhado, no qual contribuiu para minha formação. Ressalto todo zelo, dedicação e incentivo durante este período. Foi uma honra tê-la conhecido e vivenciado momentos com esta admirável pessoa, profissional, e hoje amiga. À você minha admiração e respeito.

A todos os docentes do programa de Mestrado em Ciência Animal, por compartilhar seus conhecimentos, competências e habilidades, no qual colaboraram para minha formação profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Luciana Machado Guaberto, por ser a primeira a me revelar e incentivar pela fascinante área da pesquisa e por permitir que laboratório de genética molecular e citogenética – Unoeste, sempre estivesse disponível.

A todos os discentes que estiveram comigo no decorrer deste período, em especial Cristina Kuba, Juliana Santiago, Ana Karênina Sabela, Ronaldo Sena, Guilherme Bastos e Vanessa Gossler.

A todos os funcionários que contribuíram de algum modo para o desenvolvimento deste trabalho, em especial Keid Ribeiro Kruger e Andressa Veronezi.

À Universidade do Oeste Paulista e ao Programa de Mestrado em Ciência Animal, por me proporcionar crescimento em amplos aspectos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior- CAPES, pela bolsa cedida.

'Ama-se mais o que se conquista com esforço'

Benjamin Disraeli

RESUMO

Efeito da Ingestão do Chá Branco (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze) sobre a Expressão Gênica do Sistema Vegf No Corpo Lúteo e Proliferação Celular no Endométrio de Ratas Superovuladas

O chá é uma das bebidas mais populares e a segunda mais consumida no mundo. A população ingere chás em média, de duas a três vezes ao dia, sendo em sua maioria oriundos da planta *Camellia sinensis*. São bem conhecidos os efeitos benéficos para a saúde do consumo dos chás provenientes dessa planta, como a prevenção de câncer, de doença cardiovascular e da osteoporose. Apesar disso, pouco se sabe sobre a ação do chá branco na reprodução, sendo importante avaliar as possíveis consequências do seu consumo no desenvolvimento luteal e endometrial. Visto que a principal catequina, a epigallocatequina galato (EGCG) presente neste chá influencia a expressão gênica do Vegf em tumores e este é um importante fator angiogênico dos órgãos reprodutivos, este estudo teve como objetivo verificar o efeito da ingestão do chá branco sobre a abundância relativa do mRNA do Vegf e dos seus receptores, sobre a proliferação celular do endométrio de ratas superovuladas. Para tanto, as ratas foram distribuídas em dois grupos, grupo controle (n=30) que recebeu água e grupo com ingestão de chá branco (n=30). Os ovários e os úteros foram coletados ao final de cada mês de ingestão de chá branco ou água de 10 animais de cada grupo, durante três meses consecutivos, sendo os ovários armazenados em trizol no freezer a -80°C e posteriormente a abundância relativa de mRNA do Vegf, do Flt-1 e do Kdr foram avaliadas. Além disso, os úteros foram analisados histologicamente pelo método de coloração de prata para detecção de proliferação celular. Os dados foram avaliados quanto ao pressuposto de normalidade (Shapiro-Wilk) e as comparações estatísticas foram realizadas por meio dos testes t não pareado entre os grupos nos diferentes momentos de colheitas ($p < 0,05$). A abundância relativa de mRNA do Vegf e dos seus receptores foi alterada pelo consumo de chá e houve um menor número de regiões organizadoras de nucléolo nas células do endométrio. Conclui-se que a ingestão prolongada de chá branco altera a expressão dos genes do sistema Vegf no corpo lúteo e diminui a proliferação celular do endométrio de ratas Wistar.

Palavras-chave: AgNOR, Fator de crescimento endotélio-vascular, Flt-1, Kdr, RT-PCR.

ABSTRACT

Effects of White Tea Intake (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze) on the Gene Expression of Vegf System in the Corpus Luteum and Cell Proliferation in the Endometrium of Superovulated Rats

Tea is an extremely popular drink, being the second most commonly consumed in the world. People ingest teas on average two to three times a day, the majority being derived from the *Camellia sinensis* plant. The beneficial health effects of the consumption of tea from this plant are well known, such as the prevention of cancer, cardiovascular disease and osteoporosis. Despite this, little is known about the action of white tea on reproduction. It is important to evaluate the possible consequences of consumption on luteal and endometrial development since the main catechin, epigallocatechin gallate (EGCG), present in the tea influences the gene expression of VEGF in tumors and this is an important angiogenic factor in the reproductive organs. This study aimed to verify the effects of prolonged intake of white tea on the relative abundance of VEGF mRNA and its receptors, as well as in cell proliferation in the endometrium of superovulated rats. For this purpose, the rats were divided into two groups, control group (n = 30), which received water, and white tea intake group (n = 30). The ovaries and uteri were collected from 10 animals in each group at the end of every month, for three consecutive months, stored in Trizol in a freezer at -80 ° C and the relative abundance of VEGF mRNA, Flt-1 and KDR were subsequently evaluated. In addition, the uteri were histologically analyzed using the silver staining method to detect cell proliferation. The data were evaluated for the assumption of normality (Shapiro-Wilk) and statistical comparisons were performed using the unpaired t test between groups at different collection moments ($p < 0.05$). The relative abundance of VEGF mRNA and its receptors was changed by the tea consumption and there were a lower number of nucleolar organizer regions in endometrial cells. It was concluded that prolonged consumption of white tea interferes the expression of the VEGF system genes in the corpus luteum and decreases cell proliferation in the endometrium of Wistar rats.

Key-words: AgNOR, Vascular endothelial growth factor, Flt-1, Kdr, RT-PCR.

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO.....	9
ANEXOS 1 - NORMAS DA REVISTA MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT.....	40

ARTIGO CIENTÍFICO

1. PÁGINA DE TÍTULO

Chá branco (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) diminui a proliferação celular endometrial e altera a expressão de fatores angiogênicos em corpos lúteos de ratas

Efeito do chá branco em útero e ovário de ratas

Francislaine Anelize **Garcia Santos**¹; Samuel Aparecido **Freire**¹, Deyvid Parreira **Vieira**², Ronaldo Sena e **Silva**¹, Paula de Carvalho **Papa**³, Érica Solange Caetano **Kikuchi**⁴, Caliê **Castilho**¹, Lilian Francisco Arantes de **Souza**¹, Osimar de Carvalho **Sanches**⁵, Luciana Machado **Guaberto**¹, Cecília Braga **Laposy**¹, Rosa Maria Barilli **Nogueira**¹, Ines Cristina **Giometti**^{1*}.

1. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Campus II, Rod. Raposo Tavares, Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente (SP), 19067-175.
2. Clínica Veterinária Naviraí (NAVET), A. Dourados, 1475 – Jardim União, Naviraí (MS), 79950-000.
3. Universidade de São Paulo (USP), Av. Profº. Dr. Orlando Marques Paiva, 87, São Paulo (SP), CEP: 05508-270.
4. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via Domingos Sartori, Rubião Júnior - SP, Botucatu (SP), 18607-741.
5. Centro de Diagnóstico Veterinário (CDAPVET), Rua Rui Barbosa – 1021, Centro, 19015000 - Presidente Prudente, SP.

* inesgiometti@yahoo.com.br / Telefone: (18) 3229-2115.

Agradecimentos: Ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), número de protocolo 2010/20100-1.

Pela bolsa de Mestrado, os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor (Processo: 2014/1).

Lista de Abreviaturas

AgNor - Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas

CB - Chá Branco

cDNA - DNA complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CL - Corpo lúteo

CT - Controle

EC - Epicatequina

ECG - Epicatequina galato

eCG - gonadotrofina coriônica equina

EGC - Epigalocatequina

EGCG - Epigalocatequina galato

Flt-1 - receptor 1 da tirosina quinase do tipo fms

GAPD - Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

hCG - gonadotrofina coriônica humana

HPRT-1 - Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase 1

KDR - receptor contendo domínio quinase inserido

NORs - Regiões organizadoras de nucléolos

PARP - Polimerase poli-ADP-ribose

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RPS-18 - Proteína ribossomal 18S

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

VEGF - Fator de crescimento endotélio-vascular

µm - Micrometros

µm² - Micrometros quadrados

1. RESUMO

O chá é uma das bebidas mais populares e a segunda mais consumida no mundo, a população ingere chás em média de duas a três vezes ao dia, sendo em sua maioria oriundos da planta *Camellia sinensis*. Os chás provenientes dessa planta têm vários efeitos benéficos para a saúde, como a prevenção de câncer, doença cardiovascular e da osteoporose. Apesar disso, pouco se sabe sobre a ação do chá branco na reprodução, sendo importante avaliar as possíveis consequências do seu consumo no desenvolvimento luteal e endometrial. Visto que a principal catequina presente neste chá influencia a expressão gênica do Vegf em tumores e este é um importante fator angiogênico dos órgãos reprodutivos. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da ingestão prolongada do chá branco sobre a abundância relativa do RNAm do Vegf e dos seus receptores, bem como na proliferação celular do endométrio de ratas superovuladas. Para tanto, as ratas foram distribuídas em dois grupos, grupo controle (n=30) que recebeu água e grupo com ingestão de chá branco (n=30), os corpos lúteos e os úteros foram colhidos. O consumo de chá alterou a abundância relativa de mRNA do Vegf e dos seus receptores nos corpos lúteos. Os úteros foram analisados histologicamente pelo método de coloração de prata e um menor número de regiões organizadoras de nucléolo foi detectado. Conclui-se que a ingestão prolongada de chá branco altera a expressão dos genes do sistema Vegf no corpo lúteo e diminui a proliferação celular do endométrio de ratas Wistar.

Palavras-chave: AgNOR, Fator de crescimento endotélio-vascular, Flt-1, KDR, RT-PCR.

2. TEXTO

Introdução

Os chás branco, preto e verde são produzidos a partir da planta *Camellia sinensis*, sendo diferenciados pelo tipo de processamento e pela atividade biológica dos chás, sendo que esta é geralmente atribuída aos polifenóis que eles possuem (Apostolides et al., 1997; Mukhtar et al., 1992; Pereira et al., 2014; Shiraki et al., 1994). Quatro catequinas (epicatequina – EC, epicatequina galato – ECG, epigalocatequina – EGC, e epigalocatequina galato - EGCG) são componentes abundantes dos polifenóis desses chás, com ação antioxidativa, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anti-trombótica, anti-tumoral, bactericida e redução lipídica (Balentine et al., 1997; Velayutham et al., 2008).

O chá branco é um chá não fermentado, produzido a partir de brotos jovens, os quais são protegidos da luz solar para evitar a degradação dos polifenóis; e por isso, contém maiores níveis de catequinas, polifenóis e atividade antioxidante que os outros chás provenientes da mesma planta (Hilal et al., 2007; Teixeira et al., 2012; Venditti et al., 2010).

Apesar dos múltiplos benefícios do consumo do chá branco, é importante avaliar também as possíveis consequências do seu consumo na reprodução; nenhum trabalho foi encontrado na literatura que avaliasse o efeito direto do consumo do chá branco em órgãos reprodutivos. O que se sabe, é que a principal catequina presente no chá branco, a EGCG, induz a redução nos níveis de hormônios sexuais esteroides (Kao et al., 2000; Basini et al. 2005), com possíveis efeitos negativos na eficiência reprodutiva.

A esteroidogênese pode ser afetada pela inibição da biossíntese de colesterol, já que a EGCG inibe a esqualeno-epoxidase (Abe et al., 2000),

importante enzima na produção de colesterol e a concentração sérica de colesterol diminui no organismo de ratas que consumiram chá branco (Vieira, 2012).

A EGCG é conhecida por inibir a produção do fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) tanto em tumores, diminuindo o seu desenvolvimento (Jung et al., 2001; Sartippour et al., 2002), quanto em células da granulosa de suíno cultivadas *in vitro* (Basini et al., 2005).

O VEGF está envolvido no desenvolvimento dos folículos e dos corpos lúteos (CL) (Danforth et al., 2003; Dissen et al., 1994; Ferrara et al., 1998; Fraser, 2006; Kaczmarek et al., 2005; Stouffer et al., 2001). Com o bloqueio da atividade biológica do VEGF, há a interrupção da foliculogênese e da formação do CL (Danforth et al., 2003; Zimmermann et al., 2001b).

A EGCG também induz a apoptose em células linfocíticas da leucemia da linhagem B *in vitro*, por meio da ativação da caspase-3 e da parcial inibição da fosforilação dos receptores do VEGF, receptor 1 da tirosina quinase do tipo fms (FLT-1, também conhecido como VEGFR-1) e o receptor contendo domínio quinase inserido (KDR, também conhecido como FLK1 ou VEGFR2) (Ghosh et al., 2009).

Apesar da EGCG, a principal catequina do chá branco, estar envolvida de forma negativa no sistema VEGF, é importante avaliar a ingestão do próprio chá branco e se seus efeitos podem ser similares aos relatados na literatura com a catequina purificada. Uma vez que não foi observada diminuição no peso dos ovários e no número de corpos lúteos de ratas superovuladas que ingeriram chá branco (Vieira, 2012).

Juntos, esses estudos ressaltam a influência que o chá branco pode ter no sistema VEGF no ovário e na proliferação celular reprodutiva. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da ingestão do chá branco na

abundância relativa do mRNA de Vegf e seus receptores em CL e na proliferação celular do endométrio em ratas superovuladas .

Resultados

O tratamento com ingestão de chá branco em todos os períodos analisados induziu uma maior abundância relativa do mRNA de Vegf no CL em todos os momentos do experimento, $p < 0,05$ (Figura 1). Com relação aos receptores (Kdr e Flt-1), a abundância relativa do mRNA de Kdr foi maior no grupo tratado com chá branco (CB) aos 30 dias em relação ao grupo controle (CT), porém não houve diferença entre os dois grupos aos 60 e 90 dias do experimento, $p < 0,05$ (Figura 2). Já a abundância relativa do RNAm de Flt-1 no CL, foi maior no grupo CB em todos os momentos avaliados, $p < 0,05$ (Figura 3).

Quando foi comparada a abundância relativa dos RNAm de Vegf, Kdr e Flt-1 no período total avaliado, observou-se uma maior expressão ($p < 0,05$) desses genes no grupo CB em relação ao controle (Figura 4).

Em relação à proliferação celular, o grupo controle apresentou maior número de NORs em relação ao grupo tratado com chá branco ($P < 0,05$), em todos os momentos (Figura 5). E quanto à área total de NORs por célula, o grupo CT teve menores áreas (μm^2) de NORs em todos os momentos analisados ($p < 0,05$), (Figura 6).

Em relação à razão entre a área do núcleo pela área das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) nos grupos controle e tratado com chá branco, o grupo CT apresentou maior razão em todos os momentos avaliados ($P < 0,05$), (Figura 7).

Discussão

Este trabalho demonstrou pela primeira vez o efeito da ingestão do chá branco na expressão gênica do sistema VEGF em ovário e na proliferação endometrial *in vivo* e não *in vitro*.

O Vegf-A é expresso nas células da granulosa em todos os estádios dos folículos e nas células da teca em ovários de rata (McFee et al., 2009). Alguns estudos em tumores demonstram que a catequina EGCG presente no chá branco diminui o VEGF e a vascularização tumoral (Jung et al., 2001; Sartippour et al., 2002). Nossa hipótese de que o VEGF seria inibido no ovário com a ingestão prolongada do chá branco, não se confirmou no presente trabalho, sendo observado um aumento na abundância de mRNA do Vegf nos CLs de ratas Wistar tratadas com chá branco por 30, 60 e 90 dias.

A grande maioria das células em proliferação no CL são endoteliais (Jablonka-Shariff et al., 1993; Nicosia et al., 1995; Reynolds et al., 1994). O VEGF-A induz o aumento da vascularização como um mecanismo para formar novas redes vasculares (Ferrara et al., 1997), portanto se ocorrer uma redução do fluxo sanguíneo ovariano por inadequada vascularização, a função luteínica é prejudicada (Reynolds et al., 1992, 1994).

Embora já tenha sido demonstrado que a EGCG inibe a produção de VEGF e a proliferação das células da granulosa de suíno cultivadas *in vitro* (Basini et al., 2005), não se observa alteração no número de ovulações e peso dos ovários em ratas que consumiram chá branco (Vieria, 2012).

O VEGF-A executa suas funções se ligando a dois receptores, FLT-1 e KDR. As células endoteliais e seus precursores expressam Kdr e são importantes no estabelecimento da vascularização inicial (vasculogênese) e no desenvolvimento da

nova vascularização de veias sanguíneas já existentes (angiogênese) (Bott et al., 2006; Yamaguchi et al., 1993).

Os receptores do VEGF são expressos no ovário em estádios diferentes do ciclo estral em ratas (Sugino et al., 2001). O receptor que parece ter um importante papel na angiogênese do ovário é o KDR (Pauli et al., 2005). A utilização do inibidor de KDR diminui o número e o tamanho dos CLs (Wedge et al., 2005) e, além disso, prejudica a angiogênese no CL (Zimmermann et al., 2001a).

Ao avaliar a abundância relativa de mRNA do Kdr neste presente trabalho, observou-se um aumento de sua expressão no CL ovariano somente no primeiro mês de ingestão do chá branco, com 60 e 90 dias o grupo CB não diferiu do controle. Isso pode ser devido a uma adaptação do metabolismo do animal ao consumo do chá branco. De todos os modos, observa-se que o gene Kdr foi o que teve maior variação no período de 30 dias na expressão gênica do grupo tratado com chá branco e uma menor expressão gênica relativa no total do tempo dos 3 genes-alvo analisados.

Entretanto no trabalho de Viera (2012), não foi observada diferença no número de corpos lúteos e no tamanho dos ovários de ratas que ingeriram chá branco. Possivelmente a função luteal dos ovários das ratas do presente estudo não tenha sido prejudicada, pois a abundância relativa de mRNA do KDR não diminuiu e foi similar ao grupo controle no segundo e terceiro mês de ingestão do chá branco.

A ligação do VEGF-A ao KDR promove sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e migração (Claesson-Welsh, 2003; Ferrara e Gerber, 2001; Ferrara, 2001; Karkkainen e Petrova, 2000). O crescimento celular promovido pelo KDR deve ser pelo seu efeito antiapoptótico (Dias et al., 2000; Gerber et al., 2002; Santos e Dias, 2004).

O Flt-1 não é considerado um receptor essencial na transmissão de sinal mitogênico, mas um receptor modulador capaz de regular negativamente a atividade do VEGF no endotélio vascular, sequestrando-o e tornando esse fator menos disponível para o KDR, um mediador das funções mitogênicas do VEGF (Keyt et al., 1996; Millauer et al., 1994; Park et al., 1994). O Flt-1 pode modular negativamente a formação de vasos sanguíneos por enfraquecimento da sinalização através do KDR (Roberts et al., 2004).

Por esta razão, é importante ressaltar que o aumento da abundância relativa do Flt-1 no presente trabalho pode ter sido provocado para regular a liberação do KDR em resposta ao aumento da abundância relativa de mRNA do VEGF, sendo que o Flt-1 modula o sinal de KDR (Roberts et al., 2004). Podendo assim indicar uma regulação na atividade do KDR, visto que se trata de um mediador da ação mitogênica, angiogênica, proliferativa de células endoteliais e permeabilidade vascular do VEGF-A (Ferrara et al., 2003).

A utilização da coloração de prata pela técnica de AgNOR se mostra de importante valia para verificar a proliferação celular (Prathiba e Kuruvilla, 1995). Santos et al. (2011), em estudo com tumor venéreo transmissível canino, observaram que maior número de pequenos NORs indica maior atividade proliferativa da célula. O número e a área das NORs representam parâmetros que refletem o grau da atividade proliferativa das células, por meio da coloração de nitrato de prata que marca as proteínas argirofílicas nucleolares (AgNORs) ligadas à transcrição das NORs, pois quanto mais AgNORs coradas, maior é a atividade proliferativa do tipo celular (Coleman et al., 1996; Pich et al., 2000; Rivero et al., 2004; Trerè, 2000) e quando há baixa proliferação, as áreas de NORs são maiores e em pequeno número (Silva et al., 2003). Portanto, a análise da proliferação

celular feita através do número e da área de NORs no presente estudo demonstra uma menor proliferação de células no útero das ratas tratadas com chá branco.

A modulação da diminuição da proliferação celular endometrial pelo consumo do chá branco pode ser ainda pela inibição de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes que levam à mitose celular. Como no caso observado em alguns cânceres, em que a EGCG modula a apoptose suprimindo a atividade de fatores de transcrição pró-mitogênicos, como fator nuclear Kappa β (NF-K β)¹⁴⁶⁷⁶⁸²⁹ e da proteína ativadora 1 (AP-1) (Huang *et al.*, 1997).

Além disso, alguns estudos demonstram que a EGCG também pode regular o ciclo celular pela inibição das ciclinas (reguladores positivos do ciclo celular) e pela estimulação dos inibidores quinase dependentes de ciclina (CKI) em células de câncer (Chen e Zhang, 2007; Hastak *et al.*, 2005; Nihal *et al.*, 2005). A EGCG também pode inibir a expressão do Bcl-2 e aumentar as caspases induzindo a apoptose celular (Chen e Zhang, 2007; Manna *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2006).

Mais além, as catequinas do chá também podem diminuir a concentração de estradiol, por reduzir a atividade da aromatase (Basini *et al.*, 2005; Kao *et al.*, 2000). E sabe-se que o estradiol está envolvido nos mecanismos de proliferação celular endometrial (Vermeirsch *et al.*, 1999).

Podendo este ser um achado importante para mulheres com endometriose, pois estas apresentam um tecido endometrial fora da cavidade uterina pelo aumento da capacidade proliferativa tecidual, ocasionando dor e infertilidade.

No presente estudo foi utilizado o extrato da planta e não a catequina, em uma concentração de 2,5 g/ 100 mL, dada as limitações do modelo experimental ser *in vivo*, não foi possível afirmar que as catequinas atingiram o ovário, mas o trabalho de Chu *et al.*, (2007) apresenta forte evidência disso, pois foi demonstrado que se

administrada a catequina oralmente para ratas prenhes, os filhotes apresentam catequina em todos os órgãos avaliados.

Os dados da expressão gênica demonstram que o sistema VEGF foi alterado, não confirmando a hipótese de diminuição do VEGF e de seus receptores. Contudo, o efeito da administração do chá branco pode ser diferente da administração da catequina purificada, pois contem outros componentes bioativos (Chen et al., 1997).

Conclui-se, que a ingestão prolongada de chá branco altera a expressão gênica do VEGF e de seus receptores no corpo lúteo, e diminui a proliferação celular do endométrio de ratas Wistar. Acredita-se que somente com mais estudos é que se pode confirmar a segurança dessa bebida para a reprodução, por meio das análises de ação dos segundos mensageiros dos receptores, fluxo sanguíneo, diferenciação e proliferação celular ovarianos.

Material e métodos

1) Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, em idade reprodutiva (11 semanas), peso médio de 150 g, nulíparas, divididas em dois grupos: CT (controle, n=30) e CB (tratado com chá branco, n=30), provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). As ratas foram pesadas, identificadas e mantidas em caixas, com 5 animais por caixa, com temperatura (média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e iluminação controladas (12 horas de luz e 12 horas de escuridão), das 7 horas da manhã às 7 horas da noite. Os animais de ambos os grupos tiveram acesso livre à ração (Supralab®, Raça Forte, Brasil). Enquanto o grupo CT recebeu água *ad libitum* no bebedouro, o grupo CB recebeu chá branco (Amor à Vida®,

Amor à Vida Produtos Naturais, Brasil) em uma situação experimental de ingestão prolongada, como descrita por Yang et al. (2003) e Niwattisaiwong et al. (2004). O chá foi preparado diariamente em uma concentração de 2,5% pela adição de água fervente no extrato puro de chá branco e posteriormente filtrado. O consumo de líquido foi verificado diariamente através da medição do volume restante no bebedouro (CT: 29,13±2,72 mL/dia e CB: 32,37±2,70 mL/dia, $p < 0,05$).

2) Superovulação

O tratamento com chá ocorreu durante 3 meses, ao final de cada mês, 10 ratas de cada grupo (CT e CB) foram superovuladas. A superovulação foi feita seguindo o protocolo hormonal de superovulação de Kito *et al.* (2010), que consistiu de uma injeção intraperitoneal de 150 UI/Kg de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil) e 48 horas após, aplicação de uma injeção intra-peritoneal de 150 UI/Kg de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor®, Hertape Calier, Brasil). Após 48h da aplicação da hCG, as ratas foram pesadas, anestesiadas com éter, e então mortas por exsanguinação. Os úteros foram coletados e armazenados em solução de Davidson para análise de proliferação celular. Os ovários foram dissecados e os CLs armazenados em Trizol® à -80°C para avaliar a abundância relativa de mRNA do Vegf e dos seus receptores (Flt-1 e Kdr) por meio da RT-qPCR (reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase).

3) Protocolos para expressão do mRNA (RT- qPCR)

Os CLs armazenados em Trizol foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo Trizol® (Invitrogen) de extração de RNA total. A

concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria. Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas à RT-qPCR, conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade® (Invitrogen™, Termo Fisher Scientific, Brasil). Depois foram realizadas as transcrições reversas utilizando o oligoDT como oligonucleotídeo iniciador e a enzima Superscript® III (Invitrogen™, Termo Fisher Scientific, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Foi realizada a PCR em tempo real dos cDNAs utilizando o aparelho ABIPrism® 7500 (Applied Biosystems®, Termo Fisher Scientific, Brasil). As reações foram realizadas utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems®, Termo Fisher Scientific, Brasil). As PCRs foram conduzidas em duplicatas com o uso de 2,5µl de cDNA de cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação em relação ao gene controle, através do programa LinRegPCR® (Ramakers et al., 2003), seguido do método de Pfaffl (Pfaffl et al., 2001).

Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes em estudo foram Vegf, Flt-1 e Kdr e para os genes endógenos foram beta-actina, Gapdh (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), Hprt-1 (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase) e Rps-18 (proteína ribossomal 18S). Todos os oligonucleotídeos e sondas foram obtidos da Applied Biosystems® (Termo Fisher Scientific, Brasil) e estão apresentados na Tabela 1. Para a escolha do endógeno mais estável foi utilizado o programa NormFinder software® (MOMA, Dinamarca), para a normalização dos resultados obtidos pelos genes-alvo da reação. Quando comparado os diferentes genes endógenos utilizados, a combinação do Rps-1 e do Hprt-1 resultaram em menor variabilidade para todos os genes-alvo avaliados no CL, os valores de estabilidade

foram de 0,335 para Vegf, de 0,367 para Kdr e 0,323 para o Flt-1 e por isso, foram utilizados para a normalização da expressão dos 3 genes-alvo (Vegf, Kdr e Flt-1).

4) Proliferação Celular (coloração pelo método de AgNOR - “Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions”)

Os úteros foram armazenados em solução de Davidson (ácido acético- 10 ml, formol- 20 ml, etanol a 95%- 30 ml e água destilada- 30 ml), sendo lavados em água corrente após 24 horas e armazenados em álcool 75°. Nesta solução foram mantidos até a inclusão das amostras em parafina. Após a inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5µm de espessura e as lâminas foram confeccionadas utilizando micrótomo. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em água deionizada e posteriormente colocadas em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50%, na proporção de 1:2. As lâminas permaneceram imersas nessa solução durante 45 minutos em estufa a 37°C. Após, foram lavadas em água deionizada por 1 minuto, desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (Kravis et al., 1996; Simoes et al., 1994; Vajdovich et al., 2004). Para definir a área de AgNOR, as lâminas foram fotografadas por uma câmera acoplada ao microscópio óptico em objetiva de 100x com o auxílio do óleo de imersão. As áreas de regiões organizadoras nucleolares (NORs), coradas com nitrato de prata e visualizadas em tons marrom-acastanhados foram marcadas e quantificadas utilizando o software MOTIC Imageplus 2.0® (MOTIC, China), em dez campos diferentes de cada lâmina, onde foram mensurados 10 núcleos em cada campo, conforme Sanches (2010) (Figura 8). Este método constitui um recurso para analisar a proliferação celular, uma vez que as estruturas coradas estão relacionadas com o nível de atividade

celular e nuclear. Nas células em proliferação, aumenta o número de NORs, tornando-se possível a associação entre a área de NORs e a proliferação celular (Crocker, 1996; Derenzini, 2000).

5) Análise estatística

Todos os parâmetros foram avaliados pelo pressuposto de normalidade de Shapiro-Wilk, considerando dados normais quando $p > 0,05$. Para comparação entre as médias dos grupos controle e tratado com chá branco nos diferentes momentos foi utilizado o teste T. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises foi o SAS[®]. E os dados foram apresentados em valores médios e erro padrão da média (EPM).

6) Comitê de Ética

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo CEUA número 336 e 2501).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, número de protocolo 2010/20100-1.

Pela bolsa de Mestrado, os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor (Processo: 2014/1).

Referências Bibliográficas

Abe I, Seki T, Umehara K, Miyase T, Noguchi H, Sakakibara J, Ono T. 2000. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochemical and biophysical research communications* 268(3): 767–771.

Apostolides Z, Balentine DA, Harbowy ME, Hara Y, Weisburger JH. 1997. Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 389(2-3): 167–172.

Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Critical reviews in food science and nutrition* 37(8): 693–704.

Basini G, Bianco F, Grasselli F. 2005. Epigallocatechin-3-gallate from green tea negatively affects swine granulosa cell function. *Domestic Animal Endocrinology* 28(3): 243–256.

Bott RC, McFee RM, Clopton DT, Toombs C, Cupp AS. 2006. Vascular endothelial growth factor and kinase domain region receptor are involved in both seminiferous cord formation and vascular development during testis morphogenesis in the rat. *Biology of reproduction* 75(1): 56–67.

Chen L, Lee MJ, Li H, and Yang CS. 1997. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 25:1045–1050.

Chen L, Zhang H-Y. 2007. Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Molecules (Basel, Switzerland)* 12(5): 946–57.

Chu KO, Wang CC, Chu CY, Choy KW, Pang CP, Rogers MS. 2007. Uptake and distribution of catechins in fetal organs following in utero exposure in rats. *Human Reproduction* 22(1): 280–287.

Claesson-Welsh L. 2003. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem.Soc.Trans.* 31(Pt 1): 20–24.

Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT. 1996. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic cysts and ameloblastomas. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 25(8): 436–40.

Crocker J. 1996. Molecular and biochemical aspects of interphase nucleolar organiser regions. *Clinical molecular pathology* 49(1): M8–M11.

Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biology of reproduction* 68(5): 1736–1741.

Derenzini M. 2000. The AgNORs. *Micron* 31(2): 117–120.

Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. 2000. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *The Journal of clinical investigation* 106(4): 511–521.

Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR. 1994. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 134(3): 1146–1154.

Ferrara N. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(6): C1358–1366.

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat.Med.* 4(3): 336–340.

Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 19(1): 61–9.

Ferrara N, Gerber HP. 2001. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta haematologica* 106(4): 148–156.

Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 9(6): 669–76.

Fraser HM. 2006. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 4: 18.

Gerber H-P, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417(6892): 954–958.

Ghosh AK, Kay NE, Secreto CR, Shanafelt TD. 2009. Curcumin inhibits prosurvival pathways in chronic lymphocytic leukemia B cells and may overcome their stromal protection in combination with EGCG. *Clinical Cancer Research* 15(4): 1250–1258.

Hastak K, Agarwal MK, Mukhtar H, Agarwal ML. 2005. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(7): 789–91.

Hilal Y, Engelhardt U. 2007. Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2(4): 414–421.

- Huang C, Ma WY, Hanenberger D, Cleary MP, Bowden GT, Dong Z. 1997. Inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 (AP-1) activity by aspirin in AP-1-luciferase transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 272(42): 26325–31.
- Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP. 1993. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 133(4): 1871–1879.
- Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE, Ellis LM. 2001. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *British journal of cancer* 84(6): 844–850.
- Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reproductive biology* 5(2): 111–136.
- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. 2000. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 141(3): 980–987.
- Karkkainen MJ, Petrova T V. 2000. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 19(49): 5598–5605.
- Keyt BA, Nguyen H V., Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N. 1996. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors: Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 271(10): 5638–5646.
- Kito S, Yano H, Ohta Y, Tsukamoto S. 2010. Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 59(1): 35–45.
- Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK, Volk LM. 1996. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209(8): 1418–1420.
- Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. 2008. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertility and Sterility* 90(1): 148–155.
- Machado DE, Berardo PT, Palmero CY, Nasciutti LE. 2010. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to

cancer diseases. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 29: 4.

Manna S, Banerjee S, Mukherjee S, Das S, Panda CK. 2006. Epigallocatechin gallate induced apoptosis in Sarcoma180 cells in vivo: mediated by p53 pathway and inhibition in U1B, U4-U6 UsnRNAs expression. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11(12): 2267–76.

McFee RM, Artac RA, McFee RM, Clopton DT, Smith RAL, Rozell TG, Cupp AS. 2009. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signal transduction blocks follicle progression but does not necessarily disrupt vascular development in perinatal rat ovaries. *Biology of reproduction* 81(5): 966–977.

Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. 1994. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367(6463): 576–579.

Mukhtar H, Wang ZY, Katiyar SK, Agarwal R. 1992. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Preventive medicine* 21(3): 351–360.

Nicosia S V., Diaz J, Nicosia RF, Saunders BO, Muro-Cacho C. 1995. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 25(2): 143–157.

Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. 2005. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 114(4): 513–21.

Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Sekoguchi S, Ishii M, Takashima H, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Okanou T. 2006. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *Journal of hepatology* 44(6): 1074–82.

Niwattisaiwong N, Luo XX, Coville PF, Wanwimolruk S. 2004. Effects of Chinese, Japanese and Western tea on hepatic P450 enzyme activities in rats. *Drug metabolism and drug interactions* 20(1-2): 43–56.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem* 269:25646–25654.

Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, Sauer M V., Kitajewski J, Zimmermann RC. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 146(3): 1301–1311.

Pereira V., Knor F., Velloso JC., Beltrame F. 2014. Determination of phenolic

compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16(3): 490–498.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:2002-2007.

Pich a, Chiusa L, Margaria E. 2000. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* (Oxford, England : 1993) 31(2): 133–41.

Prathiba D, Kuruvilla S. 1995. Value of AgNORS in premalignant and malignant lesions of the cervix. *Indian journal of pathology & microbiology* 38(1): 11–6.

Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JA, Abrao MS. 2007. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 99(1): 33–7.

Ramakers J, Ruijter JM, Deprez RLH, Moorman AFM. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Letters* 339:62-66.

Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA. 1994. Mitogenic factors of corpora lutea. *Progress in growth factor research* 5(2): 159–175.

Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6(3): 886–892.

Rivero ERC, Caliarì MV, Tarquínio SBC, Loyola AM, de Aguiar MCF. 2004. Proliferative activity in oral salivary gland tumors: the role of PCNA and AgNOR assessed by a double staining technique. *Journal of oral science* 46(2): 87–92.

Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R, Bautch VL. 2004. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *The American journal of pathology* 164(5): 1531–1535.

Sanches OC. Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica. 2010. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Santos FGA, Moro L, Cassali GD, Paixão TA, Campos PP, Silva SS, Vasconcelos AC. 2011. Cell proliferation markers in the transplanted canine transmissible venereal tumor. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 63(6): 1345–

1352.

Santos SCR, Dias S. 2004. Internal and external autocrine VEGF/KDR loops regulate survival of subsets of acute leukemia through distinct signaling pathways. *Blood* 103(10): 3883–3889.

Sartippour MR, Shao Z-M, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL, Brooks MN. 2002. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *The Journal of nutrition* 132(8): 2307–2311.

Shiraki M, Hara Y, Osawa T, Kumon H, Nakayama T, Kawakishi S. 1994. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutation research* 323(1-2): 29–34.

Silva CM, Serakides R, Nascimento EF, Nunes VA, Ribeiro AFC, Ocarina NM. 2003. Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55(1): 113–116.

Simoes JPC, Schoning P, Butine M. 1994. Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Veterinary Pathology*, 637–647.

Smith SK. 1998. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Human Reproduction Update* 4(5): 509–519.

Smith SK. 2001. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12(4): 147–151.

Stouffer RL, Martínez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. 2001. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of Medical Research*, 567–575.

Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube-Harada A, Kato H. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in rat corpus luteum: regulation by oestradiol during mid-pregnancy. *Reproduction (Cambridge, England)* 122(6): 875–881.

Teixeira LG, Lages PC, Jасolka TL, Aguilár EC, Soares FLP, Pereira SS, Beltrão NRM, Matoso R de O, Nascimento AM do, Castilho RO de, Leite JIA. 2012. White tea (*Camellia sinensis*) extract reduces oxidative stress and triacylglycerols in obese mice. *Food Science and Technology (Campinas)* 32(4): 733–741.

Trerè D. 2000. AgNOR staining and quantification. *Micron (Oxford, England : 1993)* 31(2): 127–31.

Vajdovich P, Psáder R, Tóth ZA, Perge E. 2004. Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Veterinary pathology* 41(4): 338–345.

- Velayutham P, Babu A, Liu DM. 2008. Green tea catechins and cardiovascular health: An update. *Current Medicinal Chemistry* 15(18): 1840–1850.
- Venditti E, Bacchetti T, Tiano L, Carloni P, Greci L, Damiani E. 2010. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? *Food Chemistry* 119(4): 1597–1604.
- Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H, Coryn M. 1999. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology* 51(4): 729–743.
- Vieira DP. 2012. Ingestão prolongada de chá branco em ratas wistar superovuladas. Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente (SP), Brasil.
- Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, Smith NR, James NH, Dukes M, Curwen JO, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Kilburn LL, Barnett S, Richmond GHP, Wadsworth PF, Walker M, Bigley AL, Taylor ST, Cooper L, Beck S, Jürgensmeier JM, Ogilvie DJ. 2005. AZD2171: A highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Research* 65(10): 4389–4400.
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. 1993. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development (Cambridge, England)* 118(2): 489–498.
- Yang M, Yoshikawa M, Arashidani K, Kawamoto T. 2003. Effects of green tea on carcinogen-induced hepatic CYP1As in C57BL/6 mice. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 12(5): 391–395.
- Zimmermann RC, Hartman T, Bohlen P, Sauer M V, Kitajewski J. 2001a. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microvascular research* 62(1): 15–25.
- Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer M V., Lobo R, Kitajewski J, Ferin M. 2001b. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(2): 768–772.

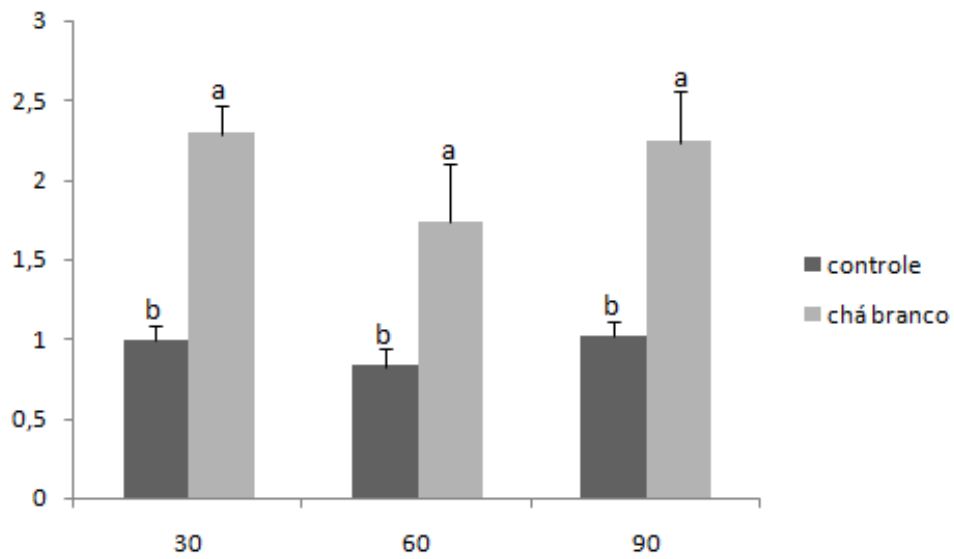


Figura 1: Efeito da ingestão do chá branco na abundância relativa de RNAm do Vegf nos ovários de ratas consumindo água (controle) ou chá branco por 30, 60 e 90 dias. Dois endógenos (Rps-18 e Hprt-1) foram utilizados para normalização dos dados. Letras diferentes representam diferença entre grupos em cada momento ($p < 0,05$).

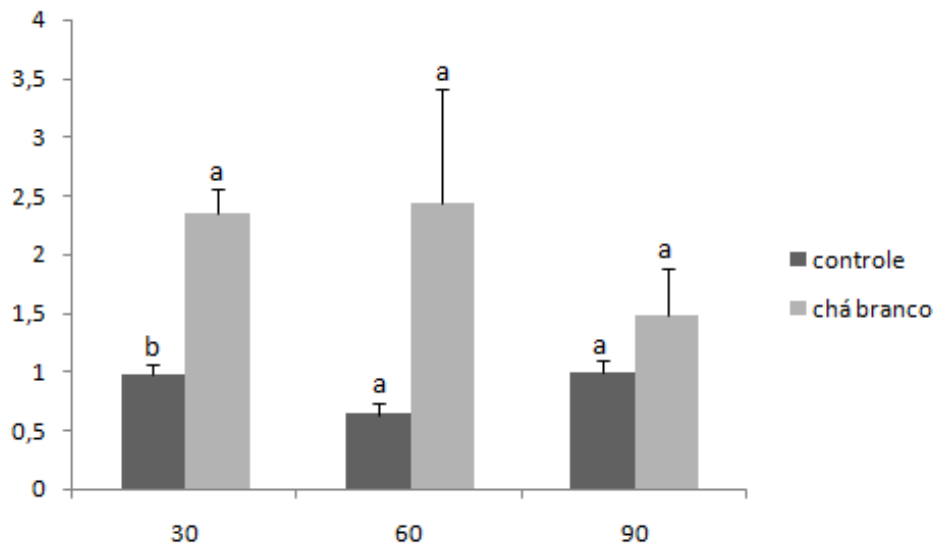


Figura 2: Efeito da ingestão do chá branco na abundância relativa de RNAm do Kdr nos ovários de ratas consumindo água (controle) ou chá branco por 30, 60 e 90 dias. Dois endógenos (Rps-18 e Hprt-1) foram utilizados para normalização dos dados. Letras diferentes representam diferença entre grupos em cada momento ($p < 0,05$).

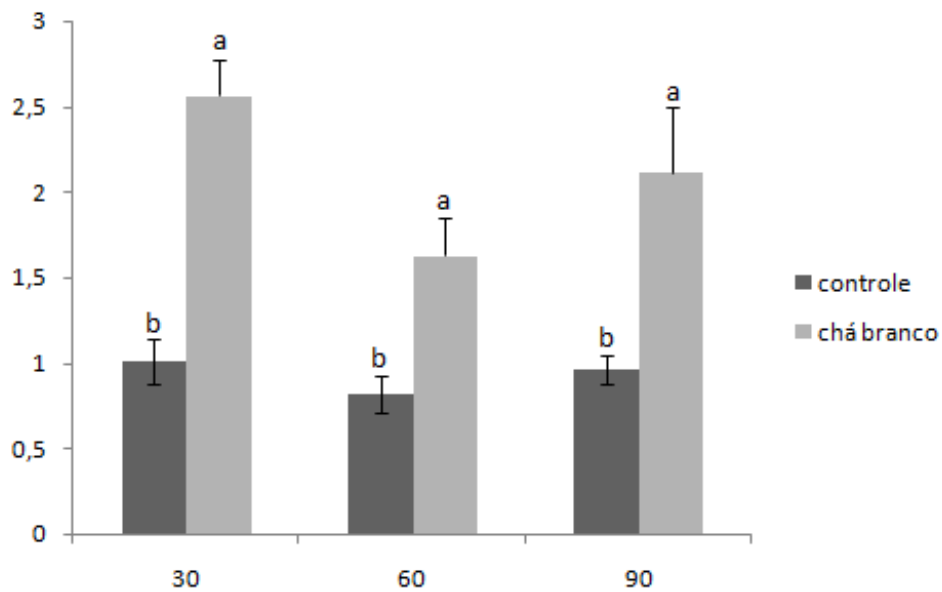


Figura 3: Efeito da ingestão do chá branco na abundância relativa de RNAm do Flt-1 nos ovários de ratas consumindo água (controle) ou chá branco por 30, 60 e 90 dias. Dois endógenos (Rps-18 e Hprt-1) foram utilizados para normalização dos dados. Letras diferentes representam diferença entre grupos em cada momento ($p < 0,05$).

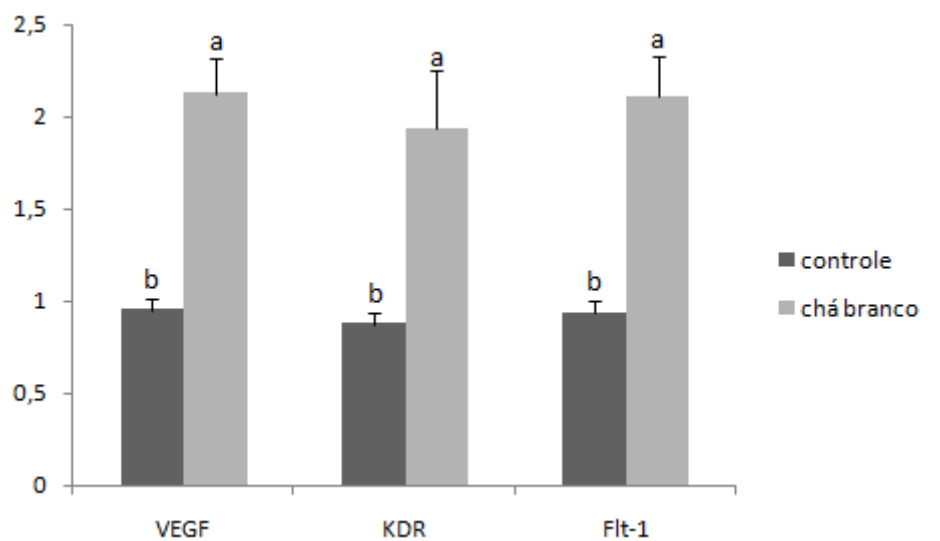


Figura 4: Efeito da ingestão do chá branco na abundância relativa dos genes Vegf, Kdr e Flt-1 nos ovários de ratas consumindo água (controle) ou chá branco por um período total de 3 meses. Dois endógenos (Rps-18 e Hprt-1) foram utilizados para normalização dos dados. Letras diferentes representam diferença entre grupos para cada gene ($p < 0,05$).

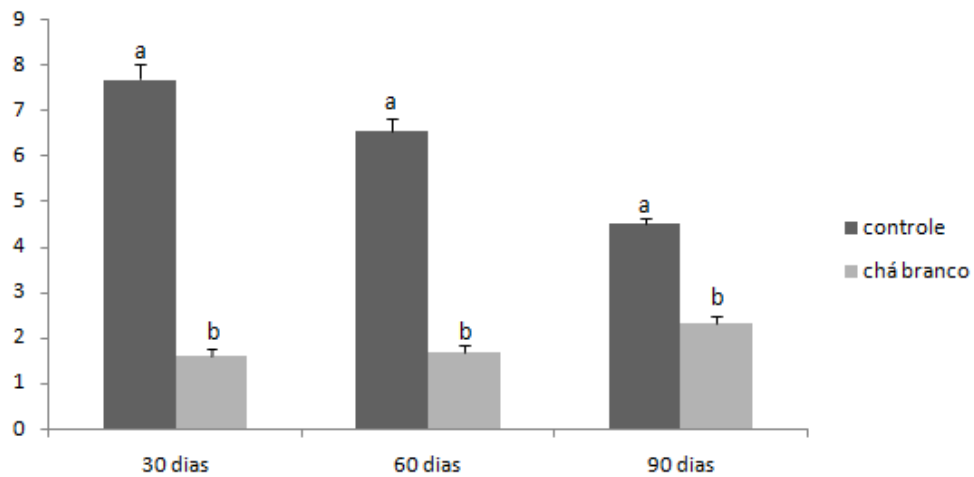


Figura 5: Média e erro padrão de número de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) nas células uterinas de ratas tratadas com chá branco por 3 meses ou tratadas com água (grupo controle). Letras diferentes representam diferença entre grupos para cada gene ($p < 0,05$).

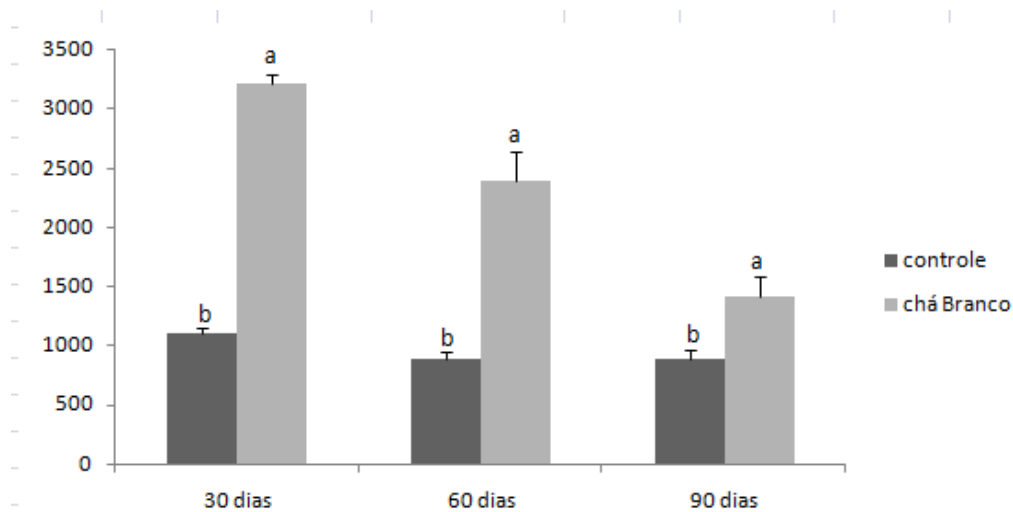


Figura 6: Média e erro padrão da área (μm^2) total de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) nos grupos controle (ingestão de água) e tratado (ingestão de chá branco) pelos períodos de 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes representam diferença entre grupos para cada gene ($p < 0,05$).

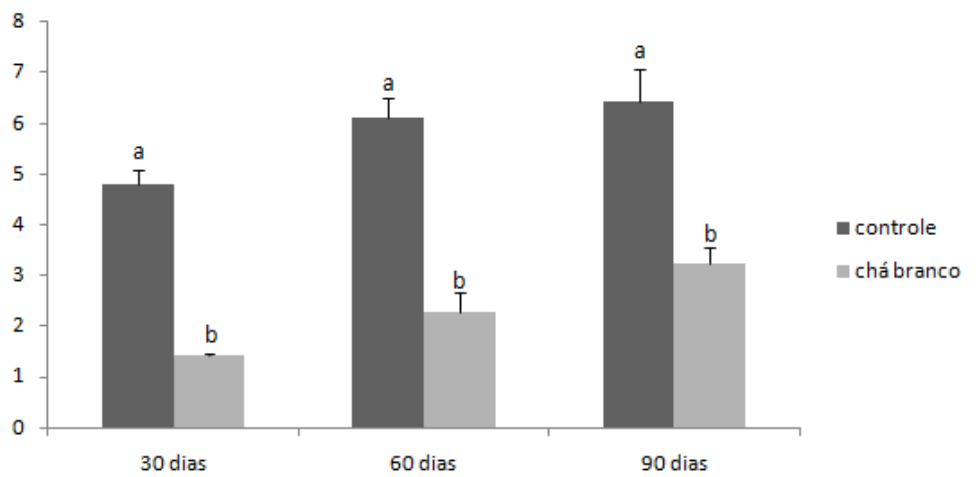


Figura 7: Média e erro padrão da razão entre a área (μm^2) do núcleo pela área das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) nos grupos controle (ingestão de água) e tratado (ingestão de chá branco) pelos períodos de 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes representam diferença entre grupos para cada gene ($p < 0,05$).

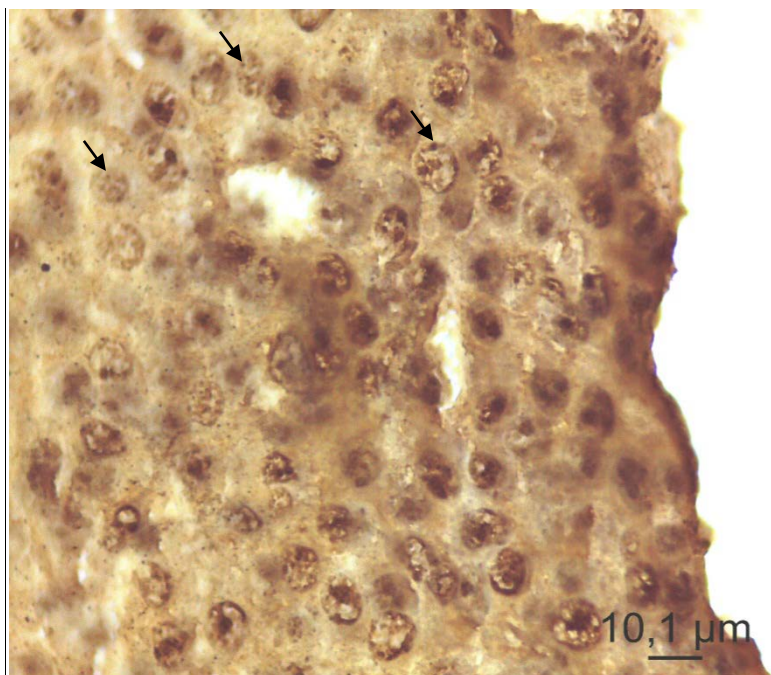


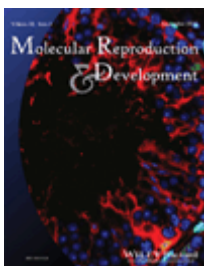
Figura 8: Fotomicrografia: Regiões organizadoras de nucléolo (NORs) em útero de rata Wistar que consumiu chá branco, aumento de 1000x. Coloração de prata.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores dos genes-alvo e dos genes endógenos utilizados na PCR em tempo real.

Genes	GeneBank	Produto
Vegf-a	NM_031836.2	69pb
Flt-1	NM_019306.1	60pb
Kdr	NM_013062.1	75pb
Gapdh	NM_017008.3	175pb
Beta actina	NM_031144.2	91pb
Rps18	NM_213557.1	62pb
Hprt-1	NM_012583.2	64pb

ANEXO 1

NORMAS DA REVISTA MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT



Link: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2795](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2795)

SUBMISSION

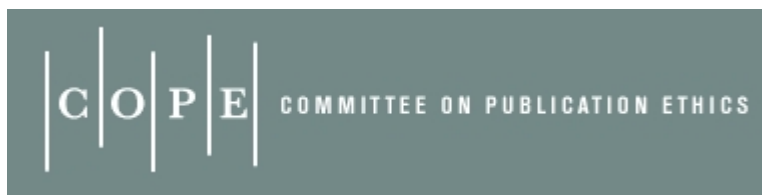
1. **Online submission is required at <http://mc.manuscriptcentral.com/mrd>.** If you have not already done so, create an account for yourself in the system by clicking on the "Create an Account" button. Please study the site's Instructions and Forms, and then let the system guide you through the submission process. If you have any questions, online help is available to you at support@scholarone.com.
2. Files uploaded to MRD's online submission system are ultimately used in final production through a completely paperless system. We therefore ask for production-quality files at submission. The manuscript preparation guidelines below must be followed, otherwise manuscripts will be returned to the author without review.
3. All text pages must be double-spaced and have one-inch margins, including the abstract, text, references, and legends. Number all pages in sequence, beginning with the title page.

All Manuscripts submitted to *Molecular Reproduction and Development* must be submitted solely to this journal, may not have been published in any part or form (except as an abstract for a meeting) in another publication of any type, professional or lay, and become the property of the publisher. Claims of novelty in data or methods should be phrased in ways that indicate how the field will be advanced by the results presented. Upon acceptance of a manuscript for publication, the author will be required to sign an agreement transferring copyright to the publisher, who reserves copyright. No published material may be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. The journal will not be responsible for the loss of manuscripts at any time. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors, who will review proofs thoroughly before publication. No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in the journal.

Reprints: Reprints may be purchased at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=mrd>.

Authors in Japan please note: Wiley-Japan can provide authors in Japan with a list of recommended services to check and improve the English of their papers before submission. Please visit <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html> for more information.

Authors in China please note: Authors in China can visit the [Author Resources site](#) on WileyChina.com for additional resources, including tips for English writing skills, and bilingual, short presentations on different topics of interest.



Molecular Reproduction and Development is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics (COPE) (www.publicationethics.org).

Conflict of Interest

Molecular Reproduction and Development requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter (if applicable) to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the footnotes, Conflict of Interest or Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

DESCRIPTION OF SUBMISSION TYPES:

VISIONS: The Art of Science

"VISIONS: The Art of Science" highlights the visual impact inherent in the field of reproduction and development. Researchers are encouraged to submit individual figures of visual scientific interest that convey important concepts or lessons without requiring significant text for this section of the journal. Each image should be submitted through the ScholarOne Manuscripts website. Figure formatting must be at least 22 x 28 cm at a resolution of 600 dpi, and must include a title and a legend of less than 250 words that describes the image sufficiently to be understood by a broad audience of researchers. The Editorial Board will evaluate these submissions for their visual impact and scientific content.

CORRESPONDENCE

CORRESPONDENCE is a section of short (500 words or less, or about one column length total) communication for the research field. This section is devoted to short research results, announcements of interest to the community, new databases or software program availability, or other research results not appropriate for full-length papers. A single figure may be included when essential, but these figures will be published at no larger than one column width squared (9 x 9 cm), inclusive of the figure legend text. CORRESPONDENCES should start with one-to-two sentences of introduction or integration into the major point of the communication, and end with the major conclusion obtained. Up to three references may be included (not part of the 500 word limit), with formatting as below for Manuscripts. CORRESPONDENCES should be submitted through the ScholarOne Manuscripts website. These submissions are evaluated by the Editorial Board and by external reviewers.

REVIEWS and ESSAYS

Submissions of REVIEWS and ESSAYS are encouraged. The topics of the manuscript are flexible, but they are intended to reach a broad audience of readers in molecular reproduction and development—from investigators in the field, to students learning the material for the first time. Therefore, it is important that the reviews start generally or with a historical perspective to integrate the topic into a larger context. The bulk of the review should

be a critical analysis of the current field and should end with important yet-unresolved questions, speculations, and directions for the field in the future. All other formats for the review are as listed below for manuscripts. ESSAYS follow a similar guideline, but the topics may be more speculative, of historical emphasis, or may integrate more than scientific content.

RESEARCH ARTICLES

Molecular Reproduction and Development is an international journal devoted to an integrated approach towards understanding the dynamic continuum of reproductive and developmental processes. As such, the journal is interested in RESEARCH ARTICLES that advance the field by mechanistic discoveries, and by functional understanding. Manuscripts reporting purely descriptive science must be of particular interest to be considered for the journal. MRD particularly encourages manuscripts with a convergence of disciplines, including systems biology, computational modeling, nanoscience, organic chemistry, bioengineering, evolutionary and synthetic biology — all within the framework that describes or reveals a mechanistic aspect of reproduction and development. These submissions are evaluated by the Editorial Board and by external reviewers in accordance with the Peer Review Policy of MRD (see <http://mc.manuscriptcentral.com/mrd>).

MANUSCRIPT ORGANIZATION

1. **Title page.** The manuscript should have an informative title that defines the major findings described within the work. The title page must include the names and affiliations of all authors, the institution at which the work was performed, the name and address for all correspondence, telephone, telex, or fax number must be present. Include a short title of not more than 40 characters to be used as a Running Head, and three-to-six Keywords (not used in the title), which will appear below the abstract. Abbreviations used in the manuscript must be listed, and grants that support the work in the manuscript should be clearly acknowledged here.

2. **Abstract.** This section should be a factual condensation of the entire work and should include statements of the problem, methods of study, results, and conclusions as appropriate. All quantitative data in the abstract must also appear in the manuscript text or tables. The abstract may not exceed 250 words.

3. **Text.** Text of Research Articles should follow the format: Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Acknowledgments, References, and Figure Legends. All sections should be concise, and the manuscript as a whole should avoid unnecessary repetition of citations, ideas, or data. In particular, Discussion sections should clearly place the data into context and address the question of how the field is advanced by these findings; paraphrasing or reiterating the Results in more than a short paragraph within the Discussion section is discouraged.

If the work includes data derived from human subjects, a statement that informed, written consent was obtained is mandatory. Use subheadings and paragraph titles whenever possible. Authors should ensure that clear and idiomatic English is used prior to submission. All uncommon abbreviations must be defined. Please see below for guidelines on accepted gene symbol and nomenclature use.

Abbreviate measurements (cm, ml) according to Style Manual for Biological journals, American Institute for Biological Sciences, 3900 Wisconsin Avenue, N.W., Washington, D.C. Place acknowledgments as the last element of the text, before references. Submit your text in DOC, DOCX, or RTF format. Do not embed figures or tables in this document; submit figures and tables as separate files. Also, see “Additional information and data handling” for studies involving vertebrates and/or humans.

Revisions, when requested, should not contain tracking within the main document(s). If tracking is requested by the handling Editor, a separate version containing tracking should be uploaded as a supplemental file for review.

4. **References.** References should be cited in the text by the name and date system (when there are more than two authors, use only the first name and "et al."), and those containing more than one reference should be listed in chronological order (e.g. "Smith et al, 1980; Ash et al, 2000). In the final bibliography, references should be in alphabetical order, and chronological for more than one reference with the same authorship. Use a letter suffix if more than one author reference is for the same year. Begin each reference with the names of all authors and the year of publication. For references to Journals, give all author names, the titles of articles in full, abbreviate journal names according to the system used by Index Medicus, and provide inclusive pagination. For references to books, include all authors' names, chapter title (if any), editor (if any), book title, city of publication, publisher's name, and year of publication. In the following examples, note the punctuation; do not use all capitals, do not underline:

Journal articles

Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 35:302-315.

Books

Wagner RP, Maguire MP, Stallings RL. 1993. *Chromosomes: A Synthesis*. New York: Wiley-Liss. p 1-182.

Chapters in books

Erickson RP. 1993. Molecular genetics of mammalian spermatogenesis. In: Gwatkin RBL, editor. *Genes in Mammalian Reproduction*. New York: Wiley-Liss. p 21-26.

5. **Legends.** A descriptive legend completes an illustration and permits it to be useful without reference to the text. A legend must accompany each illustration and must define any abbreviations used therein. Legends must be typed double spaced on a separate list at the end of the manuscript.

6. **Tables.** Each table must have a self-explanatory title, be numbered in order of appearance with Arabic numerals, and be keyed into the text (e.g., in MS Word table format). Tables must be submitted as separate MS Word files with the titles and legends included.

7. **Figures.** All figures must be numbered in order of appearance in the text with Arabic numerals, and text should be in a legible size. Preferable fonts for the labeling sub-panels include Arial or Helvetica. Figures should be submitted as close to final print size as possible. The maximum width for single-column figures is 8.0 cm (3.1 in.) and for double-column figures is 17.5 cm (6.9 in), and the maximum length is 19.5 cm (7.7 in). For proper conversion into PDF form for review, figures cannot exceed 40 megapixels (length x width, in pixels) and individual files must be less than 200 MB in size. The total submission cannot exceed 350 MB in size. We recommend saving TIFF files with LZW compression to reduce the file sizes prior to submission. Figure resolution information is as follows:

Illustrations. To ensure the highest quality print production, upload complete figures as separate image files using TIFF or EPS formats only. The dimensions of the figures should as closely approximate the final print size (maximum of 8x10 inches or 20x25 cm for the composite – e.g. containing all subpanels) and the text used should be legible (at least size 9 font, preferably using Arial, Helvetica, or a similar style). Images should follow the minimum resolution of 600 dpi; if the total file size exceeds 25 MB, please save the files with LZW compression (TIFF). All photomicrographs should include scale bars, with clear indication of the dimension in the corresponding figure legend. Figures created in Adobe Illustrator should be submitted in EPS format. **Color Illustrations.** Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential

scientific information. All color figures will be reproduced in full color in the online edition (RGB) of the journal at no cost to authors. Color figures should be submitted in RGB colorspace for optimal online and print quality. If the authors wish to have color figures in the print article, the first page of color per article is free and subsequent color pages within an article cost \$500 each. It might be possible to publish several color images on one page, depending on their size.

Cover Illustrations. Authors of manuscripts submitted to MRD are encouraged to submit figures and corresponding descriptions for consideration for cover art of an issue. Every effort is made to use cover art related to an article within an issue, and thus authors are encouraged to submit images with the final manuscript submission. Follow the submission guidelines for "VISIONS: The Art of Science" submissions, above, for all cover art suggestions. These suggestions are evaluated by the Editorial Board for their visual impact and scientific content.

ADDITIONAL INFORMATION, DATA HANDLING, DATA RELEASE

Nomenclature. Gene names and usage should follow current nomenclature established for the organism referenced in the context of the sentence (please see <http://www.genecards.org> for current usage). An example for the insulin gene (or the closest ortholog) is in the first table followed by examples for piwi gene orthologs in the second table. The sites that follow should be used as the definite reference for each organism.

	Gene symbol	mRNA	Protein
primates and humans	<i>INS</i>	<i>INS</i>	INS
domestic species (cow, pig, etc)	<i>INS</i>	<i>INS</i>	INS
rodents (mouse, rat, etc.)	<i>Ins</i>	<i>Ins</i>	INS
birds (chicken, etc.)	<i>Ins</i>	<i>Ins</i>	INS
amphibians (frog, etc.)	<i>Ins</i>	<i>Ins</i>	Ins
fish (zebrafish, etc.)	<i>Ins</i>	<i>Ins</i>	Ins
insects (flies, mosquito, etc.)	<i>Ilp1</i>	<i>Ilp1</i>	Ilp1
worms (nematodes)	<i>Ins-1</i>	<i>Ins-1</i>	INS-1
	Gene symbol	mRNA	Protein
humans	<i>HIWI</i>	<i>HIWI</i>	HIWI
mouse	<i>Miwi</i>	<i>Miwi</i>	MIWI
chicken	<i>Ciwi</i>	<i>Ciwi</i>	CIWI
frog (Xenopus)	<i>Xiwi</i>	<i>Xiwi</i>	Xiwi

zebrafish	<i>Ziwi</i>	<i>Ziwi</i>	<i>Ziwi</i>
Drosophila	<i>Piwi</i>	<i>Piwi</i>	<i>Piwi</i>
nematodes	<i>Prg-1</i>	<i>Prg-1</i>	<i>Prg-1</i>

Reference sites by organism include:

- <http://www.genenames.org> (humans, non-human primates, domestic species)
- <http://www.informatics.jax.org/mgihome//nomen/strains.shtml> (mice, rats)
- <http://genenames.roslin.ac.uk> (chicken)
- <http://www.xenbase.org> (*Xenopus*)
- <http://zfin.org> (zebrafish)
- <http://spinebase.org> (echinoderms)
- <http://flybase.org/> (fruitflies)
- <http://www.wormbase.org/> (nematodes)

Materials release. As a condition for the publication of a manuscript in MRD, the authors must make the relevant materials used to generate the results of the paper freely available to other investigators. The requests must be within reason taking into account cost of production, limited supply, and expenses in shipping. Materials held by a third party distributor should be documented in the manuscript.

Dataset accessibility. All datasets used in manuscripts for MRD must be publically available, either in the manuscript itself, or deposited in publically available databases e.g. GenBank, EMBL – Bank, Data Bank of Japan, miRBase, etc. in compliance with their nomenclature. Manuscripts generating and/or using such datasets should not be published without the corresponding links. A partial listing of such databases follows:

- Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL-Bank): <http://www.ebi.ac.uk/ena/>
- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- NCBI Sequence Read Archive: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?>
- dbEST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>
- miRBase: <http://www.mirbase.org/>
- Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
- Database of Genotype and Phenotype (dbGaP): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>
- European Genome-phenome Archive (EGA): <https://www.ebi.ac.uk/ega/>
- Database of Genomic Variants archive (DGVa): <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- Protein Data Bank (PDB): <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- IntAct: <http://www.ebi.ac.uk/intact/>
- Proteome Commons: <http://databib.org/repository/462>
- Chorus Spectrometry: <https://chorusproject.org/pages/index.html>

Research with vertebrates and humans. Research involving live vertebrates, experiments must comply with all relevant institutional and national animal welfare laws, guidelines and policies and/or be conducted under guidelines approved by an Institutional Animal Care and Use Committee or equivalent body and performed in accordance with the NIH and National Research Council's publication "Guide for Care and Use of Laboratory Animals". The institutional committee(s) overseeing such guidelines must be identified in the Materials and Methods section of the manuscript. If the work includes data derived from human subjects, a statement that informed, written consent was obtained is mandatory and should be submitted with the cover letter. Authors must list the institutional committee(s) that have approved experiments involving human subjects or human tissue in the Materials and Methods section of their paper and include with their submission a statement to confirm that informed consent was obtained from all subjects or tissue donors.

Free Table Of Contents Alerts.

Follow the steps below to sign up for email table of contents alerts and be the first to know when new research has published.

1) Log into Wiley Online Library. If you are not already a registered user, you can create your profile now. Registration is free. If you are a new registrant, return to the journal homepage at wileyonlinelibrary.com/journal/MRD

2) Select "Get New Content Alerts" from Journal Tools on the top of the left-hand side menu.

3) Submit your preferences and you are done. You will now receive an email when a new issue of *MRD* publishes.