

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

GABRIELLY RODRIGUES SARRIA

**ADMINISTRAÇÃO DE CHÁ VERDE EM DIFERENTES
FASES DO DIA PARA CAMUNDONGOS FÊMEAS
SUBMETIDOS A DIFERENTES REGIMES
ALIMENTARES: INFLUÊNCIA SOBRE ASPECTOS
METABÓLICOS E EXPRESSÃO OVARIANA DA
PROTEÍNA NUCLEOLAR FIBRILARINA**

BAURU
2014

GABRIELLY RODRIGUES SARRIA

**ADMINISTRAÇÃO DE CHÁ VERDE EM DIFERENTES
FASES DO DIA PARA CAMUNDONGOS FÊMEAS
SUBMETIDOS A DIFERENTES REGIMES
ALIMENTARES: INFLUÊNCIA SOBRE ASPECTOS
METABÓLICOS E EXPRESSÃO OVARIANA DA
PROTEÍNA NUCLEOLAR FIBRILARINA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Biomedicina, sob orientação da Profa.
Dra. Rita Luiza Peruquetti.

BAURU
2014

Sarria, Gabrielly Rodrigues.

S247a

Administração de chá verde em diferentes fases do dia para camundongos fêmeas submetidos a diferentes regimes alimentares: influência sobre aspectos metabólicos e expressão ovariana da proteína nucleolar Fibrilarina / Gabrielly Rodrigues Sarria. -- 2014.

40f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Ritmo biológico. 2. Obesidade. 3. Fertilidade. 4. Chá verde. 5. Fibrilarina. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.

**ADMINISTRAÇÃO DE CHÁ VERDE EM DIFERENTES FASES DO DIA
PARA CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDOS A DIFERENTES
REGIMES ALIMENTARES: INFLUÊNCIA SOBRE ASPECTOS
METABÓLICOS E EXPRESSÃO OVARIANA DA PROTEÍNA
NUCLEOLAR FIBRILARINA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Juliana Garcia Oliveira
Universidade Sagrado Coração (USC)

Profa. Dra. Juliana Elaine Perobelli
Universidade Federal Paulista (UNIFESP)

Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti
Universidade Sagrado Coração (USC) (Orientadora)

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, irmãos, família e amigos que sempre me apoiaram durante o caminhar do projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que iluminou o meu caminho durante todo esse tempo.

Agradeço ao apoio da equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da USC, que me proporcionou todo suporte para trabalhar nesse projeto, Fernanda Pazotti Daher Arcangelo e Wilson Aparecido Orcini foram indispensáveis para meu crescimento no laboratório e na pesquisa. Agradeço a Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini, bem como sua aluna de Iniciação Científica Jéssica Cristina dos Santos, que colaboraram na extração de tecidos para o projeto.

Agradeço também aos meus amigos por todo incentivo e apoio constante.

Aos meus pais - Silvia e Célio, irmãos - Rafaelly e Matheus, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até esta etapa de minha vida.

Por final, agradeço a minha orientadora - Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti, que teve paciência e colaborou para que eu pudesse desenvolver e concluir este trabalho. A minha formação não teria sido a mesma sem a sua orientação. Obrigada por confiar no meu desempenho e me proporcionar tanto conhecimento.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

RESUMO

Ritmos Biológicos são alterações em variáveis fisiológicas e/ou comportamentais que se repetem de forma regular. Os ritmos que se repetem a cada 24h são denominados de circadianos, por exemplo, o ciclo de vigília e sono. Relógios centrais ou osciladores circadianos centrais são os maiores temporizadores desse sistema circadiano. Por um ponto de vista molecular, esse sistema também é controlado por mecanismos cíclicos de retro-alimentação negativa, transcricional e pós-traducional. Atualmente o estilo de vida tem afetado essa alternância de vigília e sono dos indivíduos, como também a forma de se alimentar, resultando em síndromes, como por exemplo, diabetes e obesidade. Essas alterações causadas pelo estilo de vida afetam o metabolismo. As alterações da alimentação como alteração na composição alimentar, podem desequilibrar a regulação circadiana de uma variedade de proteínas responsáveis pelo controle do metabolismo, além disso, um processo que pode ser afetado por ações desse ritmo circadiano é a reprodução. Uma relação entre o ritmo biológico e as fisiologias metabólicas e reprodutivas refere-se à influência da obesidade sobre as taxas de fertilidade, principalmente em mulheres. No que se refere ao controle da obesidade, termogênicos naturais são utilizados como método para perda de peso, sendo que o consumo de chá verde (*Camellia sinensis*) é o mais amplamente utilizado entre a população feminina na atualidade. Com vista do alto consumo de chá verde na busca de controle lipídico e glicêmico e seus possíveis efeitos sobre a taxa de fertilidade, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar como a administração de *C. sinensis* em diferentes momentos do dia, em camundongos fêmeas submetidos à dieta normal e hipercalórica, influenciou no apetite, peso corpóreo, taxa glicêmica e expressão da proteína nucleolar Fibrilarina, que pode se relacionar com o nível de atividade ovariana de cada animal. Os resultados indicam que os animais que possuíram uma dieta hipercalórica demonstraram um melhor resultado de ingestão do chá no período claro do dia, momento de descanso para eles (com perda de peso e expressão maior da proteína Fibrilarina). Entretanto, os animais que possuem uma alimentação balanceada obtiveram um melhor resultado da administração do chá na fase escura do dia (período de atenção dos animais), com maior expressão ovariana da proteína Fibrilarina.

Palavras-chaves: Ritmo biológico, obesidade, fertilidade, chá verde, alimentação, Fibrilarina.

ABSTRACT

Biological rhythms are physiological and/or behavioral cyclic alterations taking place at regular time period. Physiological, biochemical or behavioral cyclic alterations occurring at intervals of 24h are designated circadian rhythms and the sleep-wake cycle is the most well characterized of them. Central clocks or circadian oscillators controlling those activities are located in the SNC and in peripheral tissues. From a molecular stand-point, circadian rhythms are regulated by transcriptional and post-translational feedback loops generated by a set of interplaying clock proteins. Modern lifestyle has a direct effect on the food consumption habits of the population (i.e. quality or quantity of the food ingestion), which in turn influences the expression of a set of proteins expressed in a circadian manner. Reproductive physiology is also under control of circadian rhythms and the metabolic status of the individual seems to have direct effects on their fertility rates, mainly within the women population. The ingestion of polyherbal or natural drugs, such as green tea extracts (*Camellia sinensis*) has been increasing among the women population in the attempting of controlling obesity problems. Green tea ingestion seems to play a role on the body weight control by activating thermogenesis; indirect effects could play a role controlling glycemia levels and also fertility reestablishment. The aim of the present study was to follow the effects of green tea intake at different day phases on the glycemic levels, on the body weight control, on the food intake and also on the ovarian expression of nucleolar protein fibrillarin of female under different diet. Results show that individuals under hipercaloric diet had more benefits when in taking the green tea extracts at light period of the day (i.e., body weight lost; and higher expression of Fibrillarin). However, in individuals under control diet green tea extract consumption was more benefic when made at dark period of the day (i.e., higher expression of nucleolar protein Fibrillarin).

Key-words: Biological rhythms, obesity, fertility, green tea, diet, Fibrillarin.

SUMÁRIO

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	RITMOS BIOLÓGICOS E ADAPTAÇÕES	11
1.2	CICLO CIRCADIANO E METABOLISMO	12
1.3	CHÁ VERDE, METABOLISMO E ATIVIDADE OVARIANA.....	13
1.4	NUCLÉOLO E FIBRILARINA	15
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO GERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	18
4.2	INFUSÃO DE RAÇÃO E CHÁ VERDE (<i>CAMELLIA SINENSIS</i>)	20
4.3	MONITORAMENTO DO PESO CORPÓREO, CONSUMO DE RAÇÃO E GLICEMIA	20
4.4	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, <i>WESTERN BLOT</i> / <i>IMUNO BLOT</i>	21
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5	RESULTADOS	22
5.1	ANÁLISE DE VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL	22
5.2	ANÁLISE DE VARIAÇÃO DA GLICEMIA	23
5.3	ANÁLISE DE CONSUMO DE RAÇÃO	23
5.4	ANÁLISE DA PROTEÍNA EXTRAÍDA DO OVÁRIO: FIBRILARINA	24
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	32
8	REFERÊNCIAS	34
	Anexo 1	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 RITMOS BIOLÓGICOS E ADAPTAÇÕES

Os seres vivos estão a todo o momento expostos às variações cíclicas que ocorrem no meio onde vivem. Um exemplo é a alternância de dia e noite, variação de temperatura, entre outros. Todas essas variações propõem um desafio para a sobrevivência. Para uma adaptação, durante a evolução, mecanismos desenvolvidos permitem ajustar alguns processos fisiológicos às alterações rítmicas, cíclicas. O conjunto dessas adaptações é denominado Ritmos Biológicos (ACÚRCIO; RODRIGUES, 2009). Ritmos biológicos, assim podem se definir, como alterações em variáveis fisiológicas e/ou comportamentais que se repetem regularmente. Um exemplo é o ciclo de vigília e sono. Outro exemplo, o ciclo menstrual de mamíferos (MARQUES; MENNA - BARRETO, 1997).

Os ritmos biológicos que variam em torno de 24h são denominados de ritmos circadianos e podem ser eles eventos fisiológicos, bioquímicos ou comportamentais. Esses ritmos circadianos são controlados por luz, alimentação, entre outros sincronizadores externos, mas também podem persistir por fatores internos. Nos mamíferos são os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo que conferem a relação entre a temporalidade externa e a ordem interna (PEREIRA et al., 2009). Relógios centrais ou osciladores circadianos centrais são os maiores temporizadores desse sistema. Existem também outros temporizadores que são periféricos, eles se localizam em tecidos como fígado, intestino e tecido adiposo (MOTA, 2010).

Durante a década de 70 descobriu-se a primeira evidência genética da regulação dos ritmos circadianos, publicada por Konopka e Benzer (1971). Tais pesquisadores analisavam drosófilas mutantes e observaram então que esses animais possuíam um ritmo circadiano anormal de atividade locomotora. Logo depois, em 1988, Ralph e Menaker mostraram a primeira evidência da regulação genética envolvida com o ritmo circadiano (ciclo de sono-vigília em mamíferos) (PEREIRA et al. , 2009).

Molecularmente o ritmo circadiano é controlado por mecanismos cíclicos de retro-alimentação (transcricional e pós-traducional). Esses mecanismos são regulados por um conjunto de proteínas, conhecidas como proteínas *clock*'s. CLOCK e BMAL1 são as mais conhecidas e são fatores de transcrição que se heterodimerizam por meio de domínio PAS, e induzem a expressão de genes que são controlados pelo sistema endógeno, inclusive os que são ligados à atividade do controle metabólico, pois se ligam aos promotores desses genes em suas regiões denominadas E-boxes e controlam sua expressão (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

Genes que são controlados por *clock* e codificam proteínas reguladoras de forma negativa a maquinaria circadiana, são pertencentes às famílias Criptocromo (CRY1 e CRY2) e Período (PER1, PER2, PER3). Essas proteínas (CRY e PER) constituem um complexo que inibe transcrições mediadas pelas próprias CLOCK-BMAL1; com esse processo se fecha o mecanismo de retro-alimentação negativa. Por meio da degradação proteolítica de CRY e PER, o processo é liberado para que um novo ciclo de transcrição (regulado por CLOCK-BMAL1) recomece (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

1.2 CICLO CIRCADIANO E METABOLISMO

Componentes moleculares do sistema circadiano controlam vários mecanismos, alguns exemplos são aumento de temperatura corporal, atividade antecipatória à alimentação, secreção duodenal, processamento de metabólitos (STEPHAN, 2002). A alteração da alimentação (como por exemplo, uma dieta hipercalórica), além disso, (STOKKAN et al., 2001; HARA et al., 2001), ou modificações na composição da alimentação (KOHSAKA et al., 2007) parecem alterar totalmente a expressão circadiana de várias proteínas que são responsáveis pelo controle do metabolismo. Assim, os componentes desse sistema, atuam molecularmente no controle metabólico geral, principalmente através da ação da interação de moléculas denominadas de receptores nucleares (BELLET; SASSONE-CORSI, 2010). Esses receptores agem como fatores de transcrição, coordenando a expressão gênica quando houver sinais hormonais e/ou ambientais. Eles então se ligam às regiões de DNA hormônio-responsivas e recrutam uma variedade de

proteínas co-reguladoras e complexos de remodelamento de cromatina (SONODA et al., 2008; TROTTER; ARCHER, 2007). REV-ERB α e PPARs são alguns desses principais receptores nucleares relacionados ao controle dos ritmos circadianos e da regulação metabólica na maior parte dos tecidos periféricos (YANG et al, 2006). As moléculas importantes nessa interação de atividade metabólica e o sistema circadiano endógeno são os co-ativadores transcripcionais (PGC1 α e a deacetilase, pertencentes à família das sirtuínas, SIRT1). O PGC1 α é regulador do metabolismo energético, se expressando de maneira circadiana. Assim, ele controla a expressão dos genes desse sistema circadiano endógeno (que são BMAL1, CLOCK e PER2) (LIU et al.,2007).A deacetilase (SIRT1) passa a ser ativada conforme os níveis de NAD⁺ celulares, e pode atuar na deacetilação de BMAL1, limitando assim sua atividade, além disso, atua no controle de outras proteínas, essas envolvidas no metabolismo e proliferação celular (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

Aceita-se que uma patologia que se estabelece pode ou não ser influenciada por ritmo circadiano, mas a expressão de genes relacionados com o estabelecimento de diversas patologias pode sim ser alterada por esses eventos circadianos. O significado disso é que cada patologia demonstra ter o seu ritmo biológico, observando agravamento ou não em certas horas do dia, ou até meses e anos (ACÚRCIO; RODRIGUES, 2009).

Um tema atualmente estudado relacionado à ritmicidade circadiana é o comportamento alimentar complexo, que envolve aspectos tanto metabólicos, quanto fisiológicos e ambientais (KELLY; ALLISON; SARA, 2004). O ritmo social, que na sociedade contemporânea funciona 24h, tem um efeito inexorável na regulação alimentar, tanto na qualidade, quanto quantidade e horário. Um exemplo é a mudança de hábito alimentar para trabalhadores que trocam turno (WATERHOUSE et al., 2003). Essas mudanças exigem uma capacidade de adaptação mental, social e física, por isso tornam-se mais comuns no cotidiano maiores casos de estresse, ansiedade, alteração do ritmo do sono. Algumas pesquisas demonstram uma possível relação intrínseca que envolve essa síndrome com o processo de saúde-doença, essas de maior incidência à obesidade, diabetes (HARB et al., 2010).

1.3 CHÁ VERDE, METABOLISMO E ATIVIDADE OVARIANA

A fisiologia reprodutiva é altamente influenciada pelo sistema circadiano (BODEN; KENNAWAY, 2006). Em mamíferos, alguns fatores indicam que esse *clock* circadiano é quem regula a concentração de vários hormônios reprodutivos (LUCAS; ELEFTHERIOU, 1980; CLAIR et al., 1985; CHAPPELL et al., 2003; MILLER et al., 2004). A capacidade reprodutiva de camundongos, no qual a proteína BMAL1 não se expressa em nenhum dos tecidos, é comprometida e a esterilidade destes modelos foi detectada em ambos os sexos (ALVAREZ et al., 2008).

Uma outra evidência da relação entre ritmos biológicos e as fisiologias metabólicas e reprodutiva, é a relação entre essa fisiologia reprodutiva e a obesidade, um grande problema que colabora para a não ovulação. A obesidade possui um impacto negativo na fertilidade por meio de mecanismos uterino (DEUGARTE et al., 2010).

A obesidade é uma síndrome caracterizada por acúmulo abusivo de gordura corporal, comprometendo assim a saúde dos indivíduos, sendo ela comprometida fisicamente ou psicologicamente. É uma enfermidade crônica, a ponto de prejudicar e reduzir então a expectativa de vida (CARVALHO, 2002). Para controlar a obesidade, por meio da redução de peso, alguns termogênicos naturais, são utilizados (ALTERIO et al., 2007). Dentre esses fitoterápicos, o chá verde (*Camellia sinensis*) é o mais utilizado atualmente na população (WOLFRAM et al., 2006). O chá verde é produzido a partir de folhas secas de *C. sinensis*, contendo nele um grande número de substâncias bioativas e fitoquímicas, com inclusão de polifenóis (catequinas), cafeína (que pode afetar a regulação da vigília e sono) (OLINI; KURTH; HUBER, 2013), aminoácidos e alguns traços de lipídio e vitaminas (ALTERIO et al., 2007). As principais catequinas do chá verde são: EC (-)-epicatequina, (GEC) (-)-3-galato de epicatequina, (EGC) (-)-epigalocatequina e (GEGC) 3-galato de epigalocatequina (LAMARÃO; FIALHO, 2009). Há muitos benefícios do chá verde em relação à saúde, que são relacionados ao alto teor de polifenóis da bebida, devido a isso a GEGC é a mais importante das catequinas contidas nesta infusão (YANG; LANDAU, 2000 citado por HUANG et al., 2014). De acordo com o processamento, o chá verde não é fermentado e pode então reter a maior parte do conteúdo presente nas folhas frescas (HUANG et al., 2014). Entre várias funções, estudos sugerem que, o extrato do chá que contenha 25% da

catequina GEGC pode, além de aumentar o catabolismo de gorduras, também reduzir o apetite. Para surtir tal efeito, as doses mínimas recomendadas são de 3 copos por dia (XU et al., 2004 citado por LAMARÃO; FIALHO, 2009).

1.4 NUCLÉOLO E FIBRILARINA

O nucléolo é um compartimento do núcleo, nele é onde a biogênese do ribossomo ocorre (GERBI, 2003), por meio da transcrição de rDNA, processamento de pré-rRNA e a montagem dos rRNAs maduros (com proteínas ribossomais) (HADJIOLOV, 1985 citado por AMIN et al. 2007).

O nucléolo apresenta três domínios nucleolares maiores, são eles: centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e componente granular (CG) (ZATSEPINA et al., 1997). O centro fibrilar (CF) encontra-se ligado diretamente com a RON, e em sua periferia ocorre a transcrição do rRNA 45s. Já no CFD e CG pode se verificar o processamento do rRNA e sua união à proteínas e rRNA 5S, que irá formar assim subunidades ribossômicas maduras (THIRY; GOESSENS, 1996).

O nucléolo possui várias funções, um exemplo é a ligação e maturação de outros tipos de RNAs (pequenos RNAs nucleares – snRNAs) (GERBI, 2003). Quando esses snRNAs agregam-se à proteínas, formam pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snoRNPs) (LÜHRMANN, 1990). Em algumas ocasiões essas snoRNPs possuem funções importantes, principalmente no processamento do pré-RNA 45S (GERBI, 2003).

A proteína nucleolar Fibrilarina (B36, observada no CF e CFD) está relacionada ao estudo, pois é uma proteína importante para o processamento de rRNA (MORIELLE et al., 2004). Fibrilarina é uma proteína que faz parte do complexo box C/D e H/ACA snoRNP do nucléolo, que é um complexo responsável pelo processamento de pré-RNA por meio de modificações pos-transcricionais, metilação-2'-O e pseudouridilação (revisado por MORIMOTO; BOERKOEL, 2013). A Fibrilarina possui funções no processamento inicial e modificações do pré-rRNA (LAFONTAINE; TOLLERVEY, 2000; WATKINS et al., 2000; WU et al., 1998; SCHIMMANG et al., 1989 citado por AMIN, 2007), montagem ribossômica

(TOLLERVEY et al., 1993 citado por AMIN, 2007) e é então de grande importância para o desenvolvimento embrionário inicial (NEWTON; PETFALSKI; TOLLERVEY; CACERES, 2003).

O nucléolo é necessário tanto para produção de ribossomo quanto para controle da sobrevivência celular e sua proliferação (CARMO-FONSECA; MENDES-SOARES; CAMPOS, 2000), sendo portanto, a atividade nucleolar imprescindível para a atividade de proliferação folicular ovariana, que possibilita a atividade reprodutora feminina (MORIMOTO; BOERKOEL, 2013). Estudos indicam que em ratos o interrompimento da expressão de Fibrilarina leva à letalidade embrionária em seu desenvolvimento no estágio inicial (NEWTON; PETFALSKI; TOLLERVEY; CACERES, 2003). Sugere-se que a Fibrilarina, portanto, possui uma importante participação para o crescimento celular (AMIN, 2007).

Observa-se então que a proliferação celular depende de um fornecimento de proteínas contínuo, sendo esse o principal requisito para atingir o tamanho necessário para divisão celular. Os ribossomos e suas taxas de biogênese estão diretamente relacionados, na proliferação de células meristemáticas, com o crescimento das células para uma divisão celular, por exemplo. (BASERGA, 1984; HANNAN; ROTHBLUM, 1995). Os ribossomos são de grande importâncias para a tradução do mRNA (GREEN, R.; NOLLER, H. F., 1997) e as proteínas ribossomais são necessárias para a correta estrutura e função do ribossomo (SHAW; JORDAN, 1995). Vale ressaltar que o ciclo celular também é influenciado por ritmos circadiano, visto que, alterações funcionais do relógio biológico molecular podem levar à proliferação celular aberrante (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009)

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com estudos, sabe-se que o ritmo biológico é constituído por um sistema circadiano molecular que possui componentes que influenciam o controle geral do metabolismo. Sabe-se também que a fertilidade é, em parte, determinada por mecanismos controlados por esses ritmos circadianos, e que a presença da obesidade, atualmente um grande problema que afeta a saúde da população, é um fator que pode alterar também a taxa de fertilidade de indivíduos. Outro

conhecimento é que a Fibrilarina é uma proteína nucleolar que contribui para funcionamento e transcrição normal de genes e, conseqüentemente, para a eficiência do ciclo celular, devido ao seu papel no metabolismo de rRNA.

Atualmente, para controlar o problema da obesidade, o uso de termogênicos naturais utilizados em busca da perda de peso é constante. Um exemplo é o alto consumo do chá verde (*C. sinensis*), que tem efeito de oxidação lipídica e ação na taxa glicêmica.

Os estudos que visam analisar efeitos da administração de *C. sinensis*, em diferentes fases do dia em camundongos sob diferentes tipos de dietas, são de extrema importância, mesmo em curto prazo, pois resultados provenientes deste tipo de estudo podem trazer informações que esclarecem se o horário da administração do fitoterápico, acompanhado de uma dieta saudável ou não, pode interferir drasticamente na saúde (perda de peso, alteração de metabolismo, aumento ou diminuição de glicemia e influência sobre a atividade sintética ovariana). Estes resultados então foram obtidos por meio da análise da variação de peso corporal, do consumo alimentar, da taxa glicêmica e da expressão da proteína nucleolar Fibrilarina nos ovários.

Esse estudo pode auxiliar tanto no controle de qualidade, na forma de administração do fitoterápico chá verde, quanto esclarecer se a automedicação pode interferir nas fisiologias metabólicas e reprodutivas no indivíduo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do projeto foi o de avaliar o efeito, em curto prazo, da administração de chá verde em camundongos submetidos a diferentes dietas (hipercalórica e normal), em diferentes momentos do dia (manhã e noite). Assim analisando sua influência no peso corporal, consumo de ração, glicemia e, principalmente, na atividade ovariana desses camundongos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a administração do chá verde, em camundongos fêmeas, influenciou significativamente no peso corporal. Lembrando que esses animais foram submetidos a diferentes dietas (normal e hipercalórica), sendo o chá administrado em diferentes momentos do dia (fase clara e fase escura).

- Verificar se a administração do chá verde, em camundongos fêmeas submetido às mesmas condições anteriores, influenciou na taxa glicêmica e no consumo de ração dos animais de cada grupo experimental.

- Por fim, verificar se a administração de chá verde, em camundongos fêmeas, submetidos também às mesmas condições anteriores, influenciou na atividade sintética ovariana dos indivíduos, por meio da análise da expressão da proteína nucleolar Fibrilarina no ovário dos animais pertencentes aos diferentes grupos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 camundongos fêmeas (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, em idade reprodutiva (adultas), que na ocasião do experimento possuíam entre 3-4 meses de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante os experimentos os animais receberam cuidados de acordo com as *Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (2013)*, normalizada pelo *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)*. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração oferecidas ad libitum, com ambiente controlado (temperatura entre 21° a 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro). Ao final do período experimental os animais foram anestesiados por meio de injeção de barbitúricos e mortos por deslocamento cervical. Todos os procedimentos que foram utilizados estão de acordo com as *Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013)*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), sob o protocolo no. 004/2013 (Anexo 1).

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais de todos os grupos experimentais utilizados foram submetidos a um período de sete dias de aclimação em cada condição experimental. Foram utilizados 20 camundongos fêmeas, onde nos 20 primeiros dias foram submetidos às dietas e períodos de interesse. Foi monitorado semanalmente o peso e glicemia dos camundongos. A taxa de consumo de ração foi monitorada diariamente. Após esse período os grupos, que já estavam em suas devidas condições, começaram a receber a administração do chá.

Os grupos foram denominados em grupos 1, 2, 3 e 4. Os grupos que estavam na sala com luz normal (LN), a luz se acendia as 07h00min da manhã e apagava as 19h00min (o chá era administrado uma hora após a luz acender). Os grupos que estavam na sala com luz invertida (LI), a luz se apagava as 07h00min da manhã e acendia as 19h00min (o chá era administrado uma hora após a luz apagar).

O grupo 1 (Luz Normal, Ração Controle - LNCD) recebeu diariamente ração controle durante 40 dias, e nos últimos 20 dias após 1 hora de exposição à luz no biotério, foi administrado o chá verde (*C. sinensis*), por método de gavagem. O grupo 2 (Luz Invertida, Ração Controle - LICD) também recebeu diariamente a ração controle durante 40 dias, e nos últimos 20 dias após 1 hora em que as luzes se apagavam no biotério, ocorria a administração de chá verde por gavagem. O grupo 3 (Luz Normal, Ração Hipercalórica - LNHFD) recebeu diariamente ração hipercalórica nos 40 dias, e nos 20 últimos dias após 1 hora de exposição à luz no biotério, foi administrado o chá. O grupo 4 (Luz Invertida, Ração Hipercalórica - LIHFD) recebeu diariamente ração hipercalórica nos 40 dias, e nos últimos 20 dias após 1 hora de apagar as luzes do biotério, receberam a dose de chá verde.

Esse procedimento foi realizado durante 40 dias (sendo os 20 últimos com administração de chá verde), com monitoramento semanal de peso e glicemia do animal. A taxa de consumo de ração foi monitorada diariamente.

A dose (peso corporal/dosagem de infusão) de chá-verde que foi administrada durante o experimento foi calculada de acordo com Valenzuela, 2004; portanto, a dose utilizada no procedimento foi 5 mg/g, que é equivalente a 250mg/animal, pois cada animal possuía o peso de 50g. De acordo com a literatura, a diluição do chá obteve-se na proporção de 1g da erva em 100 mL de água quente, resultando em administração de 0,5mL ao dia. Acontece que não estava obtendo resultado

satisfatório por ser uma grande quantidade a ser ingerida pelos animais, então houve uma outra tentativa de diluição, de 50 mL de água quente apenas, e não mais 100 mL, possibilitando, assim, a administração de 0,25mL/dia. De acordo com a média feita a partir de dados dos autores (KHAN; MUKHTAR, 2007), isso representa o consumo de 3,5 copos/dia (para humanos).

Ao final do experimento, os camundongos foram eutanasiados, de acordo com procedimento já descrito anteriormente, e os tecidos foram colhidos para diferentes tipos de análise, principalmente os ovários para extração das proteínas totais e análise da expressão da proteína nucleolar Fibrilarina.

4.2 INFUSÃO DE RAÇÃO E CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*)

A ração hipercalórica foi preparada de acordo com receita adquirida (CONTRERA et al, 1991), onde era composta por 350g de açúcar tipo Cristal, 350g de pó de ração normal e 395g de leite condensado. Todos esses ingredientes foram misturados, aquecidos, secos e cortados em forma próxima á da ração original. A ração preparada calculou-se em quilocalorias, aproximadamente 2.683,75 kcal mais 1,095 kg de ração. Dessa forma a dieta dos animais dos grupos HFD foi enriquecida com uma grande quantidade de sacarose/glicose.

Já o chá verde utilizado para a infusão seguiu citação de Valenzuela, (2004). Folhas e brotos secos de *C. sinensis* foram colocados em contato com água fervente de 5 a 10 minutos aproximadamente e servido em temperatura ambiente em um volume de 0,25mL por dia (para animal), em uma concentração de 1g de folhas para 50 mL de água, durante 20 dias, administrando sempre uma hora após a luz ser acesa (no caso do grupo de Luz Normal – LN) e uma hora após as luzes serem apagadas (grupo de Luz Invertida – LI).

4.3 MONITORAMENTO DO PESO CORPÓREO, CONSUMO DE RAÇÃO E GLICEMIA.

O monitoramento de peso corpóreo e taxa glicêmica foram realizados no primeiro dia de cada semana com auxílio de uma balança e aparelho para aferição

de glicemia capilar humana adaptada para camundongos (onde o sangue foi coletado por um pequeno corte ao final da cauda de cada animal). Os animais foram pesados um a um, em uma balança analítica, dentro de um recipiente.

O consumo da ração foi feito também com a balança analítica e o recipiente já citado anteriormente, porém esse monitoramento foi feito diariamente. A ração era sempre completada de 70 a 80 gramas.

4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, WESTERN BLOT/IMUNO BLOT

Para extração de proteínas, utilizou-se os ovários, que foram homogeneizados em 1 mL de tampão RIPA, contendo inibidores (NaF 1M, PIC e PMSF 0.1M), com ajuda de um mixer. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 14000xg, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante de interesse foi transferido para novos tubos. A quantificação das proteínas totais extraídas foi realizada pelo método Bradford utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific®). As proteínas foram diluídas em tampão ripa com inibidores (para homogeneização das quantidades, normalização) e em seguida diluídas em 2x Laemmli Buffer. Foram armazenadas a -20°C até momento do uso.

Para realização do *Western blot*, cerca de 25µg de extrato de proteínas foram separados em gel de 10% SDS-policrilamida e transferidas para uma membrana de polivinilideno por meio de *eletroblotting*. Após transferência, as membranas foram lavadas com PBST e incubadas durante 1h, à temperatura ambiente em leite desnatado 5%/PBST (para bloqueio de marcações inespecíficas). Após a incubação as membranas foram lavadas novamente em PBST e incubada a 4°C com anticorpo primário Anti-Fibrillarín [38F3] antibody ab4566e anti- α -tubulina (T5168) (Sigma Aldrich), diluídos em leite desnatado 5%/PBST em concentração de 1:1000 e 1:8000, respectivamente, *overnight*. No dia seguinte as membranas foram lavadas novamente com PBST e em seguida incubadas com o anticorpo secundário (HRP Rabbitanti-mouse-Invitrogen 616520) em uma concentração de 1:8000, diluído também em leite desnatado 5%/PBST, por 1h à temperatura ambiente. Após esse período as membranas foram lavadas com PBST, secas e reveladas por meio de filmes fotográficos.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade de dados (peso, glicemia e consumo de ração) foi testada por meio de análise do Skewness e do Kurtosis (HA; HA, 2007) e a homogeneidade de variância pelo teste F Max (ZAR, 1999). Para chegar à normalidade dos dados foi utilizado o teste t independente (por questão de escolha), que avaliou a variação de consumo de ração, peso e taxa glicêmica, dos quatro grupos experimentais (LNCD, LNHFHD, LICD, LIHFHD), antes e depois da administração do chá *C. sinensis*. Os testes realizados eram de acordo com Zar (1999), e foram aplicados por meio do software Estatística – Versão 10. Os resultados considerados estatisticamente significantes foram os que apresentaram valor de $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Os dados coletados de cada grupo experimental foram analisados, considerando-se o peso no período inicial 1 (antes da administração de infusão do chá verde) e peso no período final 2 (após a administração infusão do chá verde).

A variação do peso dos camundongos do grupo de Luz Invertida Ração Controle (LICD) (Figura 1A), mostrou que, apesar de visualmente ter diminuído, teve como resultado estatístico uma diferença de $p = 0.828$, que não é considerado significativo. A variação do peso do grupo de Luz Invertida Ração Hipercalórica (LIHFHD) (Figura 1B), apesar de visualmente ter diminuído, teve como resultado estatístico uma diferença de $p = 0.467$, que não é considerado significativo. A variação do peso do grupo de Luz Normal Ração Controle (LNCD) (Figura 1C), apesar de também visualmente ter diminuído, teve como resultado estatístico uma diferença de $p = 0.424$, que não é considerado significativo. Por fim, a variação do peso do grupo de Luz Normal Ração Hipercalórica (LNHFHD) (Figura 1D), que teve visualmente uma diminuição, teve como resultado estatístico o $p = 0.099$, que é marginalmente significativo.

A significância do teste foi determinada com o valor de $p \leq 0.05$. Observando os resultados obtidos dos grupos, nenhum deles foi considerado significativo, porém o grupo LNHFDD foi o que apresentou maior tendência à perda de peso corpóreo, de acordo com valor estatístico de p . Observar Figura 1.

5.2 ANÁLISE DE TAXA GLICÊMICA

Os dados coletados de cada grupo experimental foram analisados, considerando-se o período inicial 1 (antes da administração de infusão do chá verde) e peso no período final 2 (após a administração infusão do chá verde).

O grupo LICD (Figura 2A), apesar da diminuição visual na figura, obteve estatisticamente uma diferença de $p=0.129$ que não é considerado significativo. O grupo LIHFDD (Figura 2B), não apresentou variação no nível glicêmico nos dois períodos, apresentando diferença estatística de $p=0.995$, não considerada significativa. O grupo LNCD (Figura 2C), apresentou um aumento visual na taxa glicêmica após o período de administração do chá, porém sem significância estatística com $p=0.172$. Por fim, o grupo LNHFDD (Figura 2D), apesar da diminuição visual, obteve diferença estatística de $p=0.818$, não considerada significativa.

Para um resultado estatístico ser considerado significativo, seu valor de p tem que ser determinado em $p \leq 0.05$. Nas análises feitas nenhum grupo obteve esse resultado, sendo assim não foram considerados estatisticamente significantes. Observar Figura 2.

5.3 ANÁLISE DO CONSUMO DA RAÇÃO

O consumo diário da ração dos diferentes grupos foi analisado também ao início do experimento (1) (antes da administração do chá verde) e após essa administração (2). A variação do consumo no grupo LICD (Figura 3A) obteve um resultado estatístico de $p=0.249$, não considerado significativo. A variação do grupo LIHFDD

(Figura 3B) obteve um resultado estatístico de $p=0.195$, também não considerado significativo. A variação do grupo LNCD (Figura 3C) obteve estatisticamente um $p=0.482$, sem significância. E a variação do grupo LNHFD (Figura 3D) obteve estatisticamente um $p=0.808$, também sem significância.

Diante dos resultados da variação estatística, foi possível observar que nenhum grupo obteve um valor de significância. Porém visivelmente é possível observar que o consumo da ração demonstra uma tendência grande à reduzir em todos os grupos. Observar Figura 3.

5.4 ANÁLISE DA PROTEÍNA EXTRAÍDA DO OVÁRIO: FIBRILARINA

A análise (por meio de *Western blot/Imuno blot*) da expressão ovariana da proteína Fibrilarina, apresentou algumas variações entre os grupos experimentais.

Os animais do grupo LNHFD (Luz normal, alimentação hipercalórica) e do grupo LICD (Luz invertida, ração controle) apresentaram uma expressão aumentada da proteína. Já os animais dos grupos LNCD (Luz normal, ração controle) e LIHFD (Luz invertida, ração hipercalórica) demonstraram uma expressão diminuída (Figura 4).

Um resumo de todos os resultados obtidos no presente trabalho pode ser encontrado na Tabela 1.

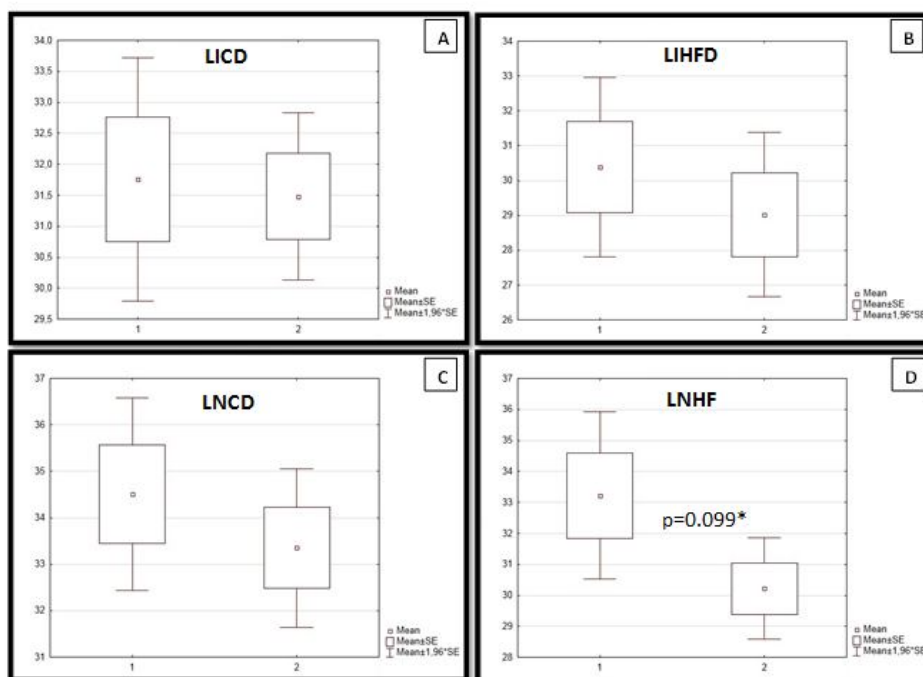


Figura 1 – VARIAÇÃO DE PESO CORPÓREO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Figura 1A: Representação da variação do peso corporal antes (1) e após (2) o início de administração do chá para o grupo LICD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período escuro do dia. Figura 1B: Representação da variação do peso corporal antes (1) e após (2) o início de administração do chá para o grupo LIHFD, que recebeu ração hipercalórica e administração de infusão de chá verde no período escuro do dia. Figura 1C: Representação da variação do peso corporal antes (1) e após (2) o início de administração do chá para o grupo LNCD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período claro do dia. Figura 1D: Representação da variação do peso corporal antes (1) e após (2) o início de administração do chá para o grupo LNHF, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período claro do dia.

Fonte: elaborado pela autora (2014).

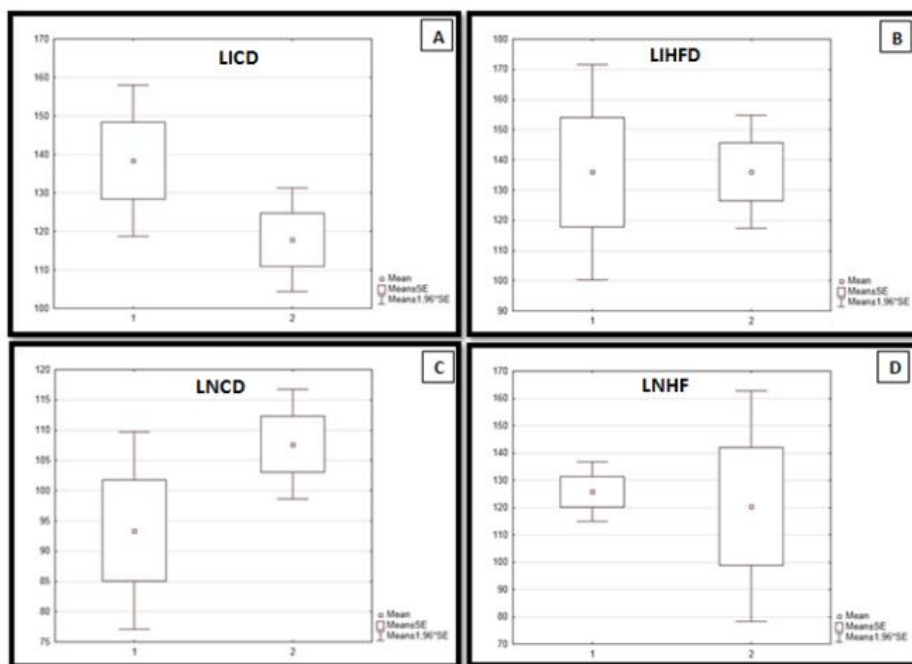


Figura 2 – VARIAÇÃO DA TAXA GLICÊMICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Figura 2A: Representação da variação da taxa glicêmica antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LICD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período escuro do dia. Figura 2B: Representação da variação da taxa glicêmica antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LIHFD, que recebeu ração hipercalórica e administração de infusão de chá verde no período escuro do dia. Figura 2C: Representação da taxa glicêmica antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LNCD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período claro do dia. Figura 2D: Representação da variação da taxa glicêmica antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LNHF, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período claro do dia.

Fonte: elaborado pela autora (2014).

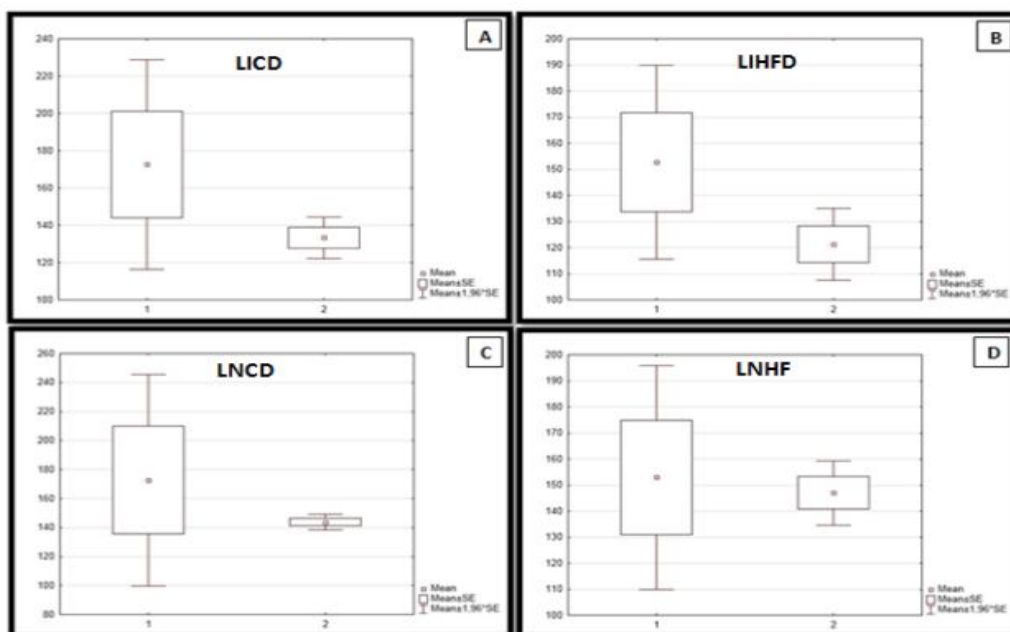


Figura 3 – VARIAÇÃO NO CONSUMO DE RAÇÃO DIÁRIA PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL. Figura 3A: Representação da variação do consumo de ração diária antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LICD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período escuro do dia. Figura 3B: Representação da variação do consumo de ração diária antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LIHFD, que recebeu ração hipercalórica e administração de infusão de chá verde no período escuro do dia. Figura 3C: Representação da variação do consumo de ração diária antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LNCD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período claro do dia. Figura 3D: Representação da variação do consumo de ração diária antes (1) e após (2) o início da administração do chá para cada o grupo LNHFD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período claro do dia.

Fonte: elaborado pela autora (2014).

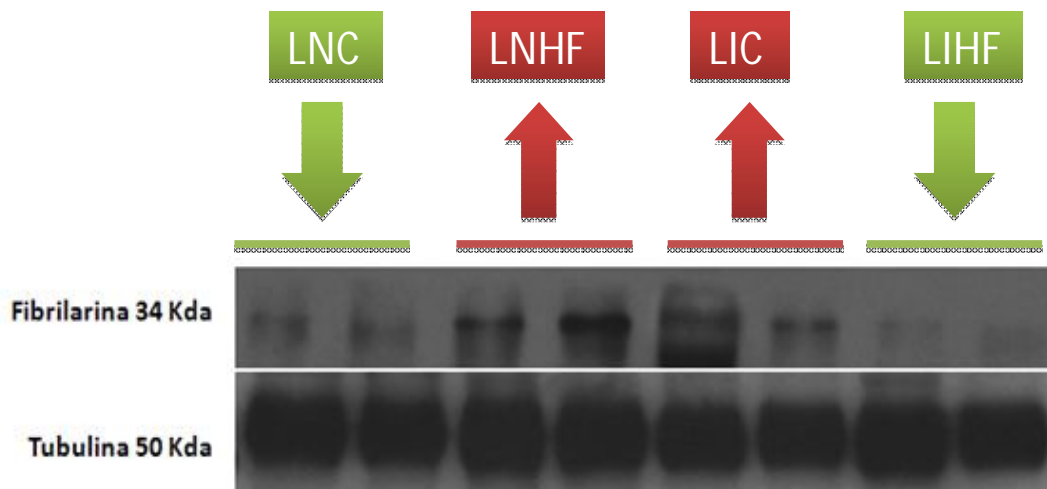


Figura 4 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FIBRILARINA EM OVÁRIOS DE ANIMAIS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL. Detecção da expressão de Fibrilarina para os grupos LICD (que recebeu ração controle e administração de infusão de chá-verde no período escuro do dia); LIHFD (que recebeu ração hipercalórica e administração de infusão de chá-verde no período escuro do dia); LNCD (que recebeu ração controle e administração de infusão de chá-verde no período claro do dia); e LNHF (que recebeu ração hipercalórica e administração de infusão de chá-verde no período claro do dia). Para cada grupo foram utilizadas amostras de 2 animais, cujas proteínas ovarianas totais foram extraídas ao final do período experimental. Os animais utilizados para amostragem foram escolhidos aleatoriamente. A expressão de tubulina foi utilizada como controle da reação.

Fonte: elaborado pela autora (2014).

VARIÁVEIS	LNCD	LNHFD	LICD	LIHFD
Peso corporal	=	↓ (*)	= ☆	=
Taxa glicêmica	=	=	=	=
Consumo de ração	↓	↓	↓	↓
Expressão Ovariana de Fibrilarina	Menor expressão	Maior expressão	Maior expressão	Menor Expressão

Tabela 1 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO.

Resumo dos resultados observados em cada variável analisada ao final do período experimental em cada grupo animal. O asterisco (*) indica diferença com marginal significância estatística.

Fonte: elaborado pela autora (2014).

☆ LICD, de acordo com trabalho paralelo da colaboradora Renata Pereira de Amorim (AMORIM; PERUQUETTI, 2014), apresentou redução na área de adipócitos.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os objetivos do presente trabalho, as análises de peso corporal, consumo de ração, taxa de glicemia e expressão da Fibrilarina em ovários, foram realizadas.

Em relação ao peso corporal, os animais submetidos aos 40 dias de consumo de ração, tanto hipercalórica quanto controle, e 20 dias de administração do chá verde em fases diferentes do dia, não apresentaram estatisticamente uma significativa perda de peso. Muitas pesquisas descrevem o método de utilização do chá verde como um grande auxiliar na perda de peso, entretanto é importante ressaltar que as pesquisas consultadas possuíram um tempo maior de experimento. Segundo Vera-cruz e colaboradores (2010), após seis meses, caracterizada a obesidade dos animais, foram subdivididos e tratados ou não com o chá verde, foi observada uma diferença significativa da redução de peso corporal dos animais tratados com o chá. Além disso, alguns estudos comprovam que a catequina GEGC, principal constituinte da infusão de chá verde, pode aumentar o catabolismo de gordura (XU et al., 2004 citado por LAMARÃO; FIALHO, 2009).

De acordo com os resultados obtidos no presente projeto, é possível observar uma tendência de perda de peso em todos os grupos, apesar de não ser significativo na forma estatística. É interessante observar, entretanto, que o grupo que esteve marginalmente significativo na variação entre o peso corporal antes e após o consumo do chá verde, foi o que recebeu infusão do chá em seu período de luz normal (lembrando que para os animais é o horário de repouso) associado à alimentação hipercalórica (grupo LNHFHD, ver Figura 1D e Tabela 1). Com isso é possível verificar que o mecanismo controlado pelo relógio biológico, através de modificações epigenéticas de acordo com alterações a cada momento do dia sobre os níveis metabólicos celulares (MASRI; SASSONE-CORSI, 2010) pareceu interferir nesta condição experimental, visto que o grupo que foi alimentado pelo mesmo tipo de dieta, mas recebeu chá verde em um diferente momento do dia (grupo LIHFHD), não apresentou a mesma tendência à perda de peso.

Em relação à taxa glicêmica, também no presente trabalho, não houve redução significativa. Várias podem ser as hipóteses para tal resultado, talvez uma delas decorrente do período curto de experimento e interferência de variações

genéticas de cada animal, já que antes de iniciar o experimento não foi feito o controle para identificar animais que pudessem possuir hiperglicemia, hipoglicemia ou glicemia na normalidade. Vale ressaltar, também, que houve outros estudos em que o efeito hipoglicêmico da infusão de *C. sinensis* também não foi notado (MACKENZIE; LEARY; BROOKS, 2007).

O terceiro fator analisado no presente estudo foi o consumo de ração pelos animais de cada grupo experimental, que apesar de também não demonstrar resultado estatístico significativo, foi visualmente menor em todos os grupos depois da administração do chá verde. Uma hipótese seria a redução de apetite por consequência do chá e suas propriedades. Alguns estudos evidenciaram a propriedade que a catequina GEGC possui, em certas concentrações, em reduzir o apetite (XU et al., 2004 citado por LAMARÃO; FIALHO, 2009). Outra hipótese é o gosto amargo do chá, que pode ter dificultado na alimentação após administração do mesmo.

Por fim, a última análise foi a expressão ovariana da proteína nucleolar Fibrilarina nos animais de cada grupo experimental. Fibrilarina é uma proteína que faz parte do complexo box C/D e H/ACA snoRNP do nucléolo, que é um complexo responsável pelo processamento de pré-RNAr por meio de modificações post-transcricionais, metilação-2'-O e pseudouridilação (revisado por MORIMOTO; BOERKOEL, 2013). O nucléolo ativo é necessário tanto para produção de ribossomo quanto para controle da sobrevivência celular e sua proliferação (CARMO-FONSECA; MENDES-SOARES; CAMPOS, 2000), sendo, portanto, a atividade nucleolar imprescindível para a atividade de proliferação folicular ovariana, que possibilita a atividade reprodutora feminina (MORIMOTO; BOERKOEL, 2013). De acordo com os dados, houve variação de expressão entre todos os grupos. O resultado sugeriu uma expressão maior da proteína nos grupos LNHFD e LICD em relação aos demais grupos. Relacionando esse resultado com perda de peso, a Fibrilarina teve sua expressão maior no grupo em que também houve uma perda de peso próximo da significância estatística, que foi o grupo LNHFD. É importante destacar que a obesidade é um fator que contribui fortemente para a redução da fertilidade feminina, sendo que quando os sintomas da obesidade são removidos restabelecem-se também as taxas de fertilidade na população que sofre com estes transtornos (BREWER; BALEN, 2010). Desta maneira, a maior expressão da

Fibrilarina em um grupo que apresentou queda significativa de peso corporal após a administração do chá, é uma evidência que corrobora dados da literatura, já que os animais tinham uma tendência ao aumento do peso. Já o grupo LICD que também possuiu uma expressão maior da proteína, pode ser relacionado com a análise histológica de área de adipócitos, onde o resultado ocorreu no mesmo grupo, de acordo com pesquisa da colaboradora Renata Pereira de Amorim. Segundo Amorim e Peruquetti (2014), os animais do grupo ração controle que recebiam chá verde no período escuro do dia tiveram uma área de adipócitos menor. Esse dado também corrobora o dado da literatura que associa redução de peso corporal (neste caso, redução de área de adipócitos) com restabelecimento da fertilidade em mulheres obesas (BREWER; BALEN, 2010).

Para a análise da expressão da Fibrilarina foi observado que o tipo de ração e o período de administração do chá isoladamente não influenciaram sobre sua expressão de forma direta. Porém, foi a associação entre eles que pareceu interferir na atividade sintética ovariana. Hipóteses ainda devem ser analisadas, um exemplo seria a variação genética de cada animal. Também vale lembrar que o ciclo celular é influenciado também por ritmos circadianos, sendo que varias vias moleculares (que envolvem os constituintes da maquinaria do ritmo biológico) estabelecem interpelações funcionais com os reguladores do ciclo (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009)

Todos esses dados indicam que a manutenção dos ritmos circadianos em relação ao consumo e gasto energético é realmente essencial para a homeostase energética (STAELS, 2006).

7 CONCLUSÃO

Conforme resultados do presente trabalho, foi possível concluir que o efeito do chá administrado para os camundongos, teve seu melhor desempenho nos grupos LNHFDD (diminuição de peso; e maior expressão de Fibrilarina ovariana) e LICD (maior expressão de Fibrilarina ovariana). Ou seja, para os animais que possuíram uma alimentação altamente calórica, o chá apresentou melhor efeito quando administrado na fase clara do dia (ou seja, no período de descanso). Já para

os animais que apresentaram uma dieta regular, a administração do chá foi mais eficiente quando realizada na fase escura do dia (ou seja, no período de atividade).

Este trabalho não é o suficiente para conclusões definitivas dos benefícios ou malefícios do chá verde. Além do que, alguns resultados apresentam apenas diferença estatística marginal. Faz-se necessária, então, a realização de novas pesquisas relacionadas a essa interação de tipo de alimentação, horário do chá verde e atividade sintética do ovário.

8 REFERÊNCIAS

ACÚRCIO, A. R.; RODRIGUES, L. M. **Os Ritmos da Vida - Uma Visão Atualizada da Cronobiologia Aplicada**. Rev. Lusofona de Ciências e Tecnologias da Saúde. n 2. p. 216-234, 2009.

ALTERIO, A. de A.; FAVA, D. A. F.; NAVARRO, F. **Interação da ingestão diária de chá verde (*Camelliasinensis*) no metabolismo celular e na célula adiposa promovendo emagrecimento**. São Paulo: Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento v.1, n.3, p.27-37, 2007.

ALVAREZ, D.; HANSEN, A.; ORD, T.; BEBAS, P.; CHAPPELL, P.E.; GIEBULTOWICZ, J.M.; WILLIAMS, C.; MOSS, S.; SEHGAL, A. **The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice**. Journal of Biological Rhythms, v. 23,n.1, p. 26- 36, 2008.

AMIN, M. A.; MATSUNAGA, S.; MA, N.; TAKATA, H.; YOKOYAMA, M.; UCHIYAMA, S.; FUKUI, K. **Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells**. Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita 565-0871, Osaka, Japan, p. 320 – 326, 2007

AMORIM, R. P.; PERUQUETTI, R. L. **Efeito a curto prazo da administração de infusão de *Camelliasinensis* (chá verde) em diferentes fases do dia sobre aspectos metabólicos de camundongos submetidos a diferentes regimes alimentares**. Monografia apresentada à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Sagrado Coração (USC), para conclusão de Iniciação Científica. USC - Bauru - SP, 45p.,2014.

BASERGA, R. **Growth in size and cell DNA replication**. Exp Cell Res151(1):1–5, 1984.

BELLET, M. M.; SASSONE-CORSI, P. **Mammalian circadian clock and metabolism – the epigenetic link.** Journal of Cell Science, v.123, p. 3837-3848, 2010

BODEN, M. J.; KENNAWAY, D. J. **Circadian rhythms and reproduction.** Reproduction, v.132, p. 379-392, 2006

BREWER, C. J.; BALEN, A. H. **The adverse effects of obesity on conception and implantation.** Reproduction, v.140, n.3, p.347-364, 2010.

CARMO-FONSECA, M.; MENDES-SOARES, L.; CAMPOS, I. **To be or not to be in the nucleolus** . Nat Cell Biol. Jun;2(6):E107-12., 2000

CARVALHO, K. M. B. **Obesidade.** In: **Cuppari L.** São Paulo: Guias de medicina ambulatorial e hospitalar - nutrição clínica no adulto. Manole. p. 131-150, 2002

CHAPPELL, P. E.; WHITE, R. S.; MELLON, P. L. **Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1- 7 cell line.** J Neurosci, v.23, p. 11202-11213, 2003.

CLAIR, P.; CLAUSTRAT, B.; JORDAN, D.; DECHAUD, H.; SASSOLAS, G. **Daily variations of plasma sex hormone-binding globulin binding capacity, testosterone and luteinizing hormone concentrations in healthy rested adult males.** Horm Res, v.21, p. 220-223, 1985.

CONCEA – Diretrizes de Prática de Eutanásia, 2013.

CONCEA - Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos – DBCA, 2013.

CONTRERAS, R. J.; KING, S.; RIVES, L.; WILLIAMS, A.; WATTLETON, T. **Dietary obesity and weight cycling in rats: a model of stress-induced hypertension?**. Am. J. Physiol. 261 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 30): R848-R&57, 1991.

DEUGARTE, D.A., DEUGARTE, C.M.; SAHAKIAN,V. **Surrogate obesity negatively impacts pregnancy rates in third-party reproduction**. Fertility and Sterility.Vol. 93, No. 3, p.1008-1010.DeUgarteet al., 2010

GERBI, S. A.; BOROVJAGIN, A. V.; LANGE, T. S. **The nucleolus: a site of ribonucleo protein maturation**. Current Opinion in Cell Biology, v. 15, p. 318-325, 2003.

GREEN, R.; NOLLER, H. F. **“Ribosomes and translation”**. Annual Review of Biochemistry,vol. 66, pp. 679–716, 1997

HANNAN, R. D., ROTHBLUM, L. I. **Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatalcardiomyocyte hypertrophy**. Cardiovasc Res, 30(4):501–510, 1995.

HA, R. R.; HA, J. C. **Integrative statistics for behavioral science**. Pearson Custom Publishing, Boston, 2007.

HARA, R.; WAN, K.; WAKAMATSU, H.; et al. **Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus**. Genes and Cells, v. 6, p. 269-278, 2001

HARB, A. B. C; CAUMO, W.; RAUPP, P.; HIDALGO, M. P. L.; **Síndrome do comer noturno: aspectos conceituais, epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos**.Rev. Nutr., Campinas, 23(1):127-136, jan./fev., 2010.

HUANG, J.; WANG, Y.; XIE, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; WAN, X. **The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies.**

European Journal of Clinical Nutrition (2014) 68, 1075–1087

© Macmillan Publishers Limited, 2014

KELLY, C.; ALLISON, A. J. S. M.; SARA, L. **Overcoming Night Eating Syndrome.**

In: Publications NH, editor. Overcoming night eating syndrome. A Step-by-step guide to breaking the cycle. Oakland (CA): New Harbinger Publications;. v.1, p.192, 2004

KHAN, N.; MUKHTAR, H. **Tea polyphenols for healthpromotion.**

LifeSciences,v.81,p.519-533, Jul, 2007

KOHSAKA, A.; LAPOSKY, A. D.; RAMSEY, K. M.; et al. **High-fat diet disrupts**

behavioral and molecular circadian rhythms in mice. Cell Metabolism, v. 6, p. 414-421, 2007.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. **Clock Mutants of Drosophila Dielanogaster.**USA:

ProcNatlAcadSci. 68(9):2112-6, 1971

LAMARAO, R. C.; FIALHO, E. **Aspectos funcionais das catequinas do chá verde**

no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. Rev. Nutr., Campinas, 22(2):257-269, mar./abr., 2009

LIU, C.; LI, S.; LIU, T.; et al. **Transcriptional co activator PGC-1alpha integrates**

the mammalian clock and energy metabolism. Nature, v. 447, p. 477- 481, 2007.

LUCAS, L.A.; ELEFTHERIOU, B.E. **Circadian variation in concentrations of**

testosterone in the plasma of male mice: A difference between BALB/cBy and C57BL/6By inbred strains. J Endocrinol, v.87, p. 37-46, 1980.

LÜHRMANN, R. **Functions of U-snRNPs.** Molecular Biology of Reproduction, v. 14,

p. 183-192, 1990

MACKENZIE, T.; LEARY, L.; BROOKS, W. B. **The effect of an extract of green and black tea on glucose control in adults with type 2 diabetes mellitus: double-blind randomized study.** *Metabolism*.v.56, p.1340-1344, mai/ 2007.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações.** São Paulo: EDUSP, Editora Fiocruz, 1997

MASRI, S.; SASSONE-CORSI, P. **Plasticity and specificity of the circadian epigenome.** *Nature Neuroscience*, New York, v.13, p. 1324-1329, Out, 2010.

MILLER, B. H.; OLSON, S.L.; TUREK, F.W.; LEVINE, J.E.; HORTON, T.H.; TAKAHASHI, J.S. **Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy.** *Curr Biol*, v.14, p. 1367-1373, 2004.

MORIMOTO; BOERKOEL, 2013. **The Role of Nuclear Bodies in Gene Expression and Disease.** *Biology*, 2, 976-1033; doi:10.3390/biology2030976, 2013

MORIELLE, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. **O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular.** Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, para exame Geral de Qualificação de Doutorado. UNESP - São José do Rio Preto - SP, 34p., 2004.

MOTA, D. **Importância dos ritmos circadianos na Nutrição e Metabolismo,** PORTO: monografia. Faculdade de Ciências da nutrição e alimentação; Universidade do Porto, 2010.

NEWTON, K.; PETFALSKI, E.; TOLLERVEY, D.; CACERES, J.F. **Fibrillarlin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse,** *Mol. Cell Biol.* 23 p. 8519–8527, 2003.

OLINI, N.; KURTH, S.; HUBER, R. **The Effects of Caffeine on Sleep and Maturational Markers in the Rat.** PLoS ONE 8(9): e72539. doi:10.1371/journal.pone.0072539, 2013.

PEREIRA, D. S. et al. **Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos.** Rev Bras Psiquiatr, p. 63-71, 2009.

SAHAR, S.; SASSONE-CORSI, P. **Metabolism and cancer: the circadian clock connection.** Nature Reviews: Cancer, v.9, p. 886-896, 2009.

SHAW, P. J.; JORDAN, E. G. **"The nucleolus,"** Annual Review of Cell and Developmental Biology, vol. 11, pp. 93–121, 1995.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. **Nuclear receptors: decoding metabolic disease.** FEBS Letters, v. 582, p. 2-9, 2008.

STAEL, S. B. **When the Clock stops sticking, metabolic syndrome explodes.** New York: Nature Medicine. v.12, n. 1, p.54-55; discussion55, 2006.

STEPHAN, F. K. **The "other" circadian system: food as a Zeitgeber.** Journal of Biological Rhythms, v. 17, p. 284-292, 2002.

STOKKAN, K. A.; YAMAZAKI, S.; TEI, H.; et al. **Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding.** Science, v. 291, p. 490-493, 2001.

THIRY, M.; GOESSENS, G. **The nucleolus during the cell cycle.** Springer, 146p., 1996.

TROTTER, K. W.; ARCHER, T. K. **Nuclear receptors and chromatin remodeling Machinery.** Molecular Cellular Endocrinology, v.265-266, p.162-167, 2007.

VALENZUELA, A. **El consumo tey la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria.** Santiago: Revista Chilena de Nutrición.

v.31,p.72-82,ago,2004.

Disponível em:<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000200001>. Acesso em: 10 ago, 2013.

VERA-CRUZ, M.; NUNES, E.; MENDONÇA, L.; CHAVES, ÉRIKA.; FERNANDES, M. L. L. A.; **Efeito do chá verde (*Camelia sinensis*) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica.** Bras Patol Med Lab. v. 46. n. 5. p. 407-413. Out/2010

WATERHOUSE, J.; BUCKLEY, P.; EDWARDS, B.; REILLY, T. **Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers.** Chronobiol Int. 20(6):1075-92, 2003.

WOLFRAM, S.; WANG, Y.; THIELECKE, F. **Antiobesity effects of green tea: from bedside to bench.** Molecular Nutrition & Food Research. v. 50 (2),p. 176-187, 2006.


YANG, X.; DOWNES, M.; YU, R.T.; et al. **Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism.** Cell, v. 126, p. 801-810, 2006.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M. **Effects of tea consumption on nutrition and health.** JNutr; 130: 2409–2412, 2000.


ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis.** Prentice Hall, New Jersey, 1999.

ZATSEPINA, O. V.; DUDNIC, O. A.; TODOROV, I. T.; THIRY, M.; SPRING, H.; TRENDELENBURG, M. F. **Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells.** Chromosoma, v. 105, n. 7-8, p. 418-30, 1997.

ANEXO 1



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



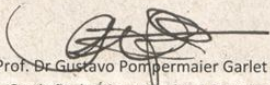
CEEPA-Proc. Nº 004/2013
Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que após análise por um relator e, tendo sido atendida a solicitação dessa Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, o projeto de pesquisa **Efeito da administração de infusão de Camellia Sinesis (chá verde) em diferentes fases do dia sobre aspectos metabólicos de camundongos obesos induzidos por dieta**, de autoria de Renata Pereira de Amorim, sob sua orientação, foi novamente avaliado pelo relator e considerado **APROVADO**, por esta Comissão em reunião realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Rita Luiza Peruquetti
Docente do Departamento de Ciências da Saúde da USC

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>