

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ISABELA PAZOTTI DAHER

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE INFUSÃO DE
CHÁ VERDE EM DIFERENTES FASES DO DIA NA
EXPRESSÃO DO RECEPTOR LXR EM OVÁRIOS DE
CAMUNDONGOS FÊMEAS ALIMENTADOS COM
DIFERENTES TIPOS DE DIETA**

BAURU

2014

ISABELA PAZOTTI DAHER

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE INFUSÃO DE
CHÁ VERDE EM DIFERENTES FASES DO DIA NA
EXPRESSÃO DO RECEPTOR LXR EM OVÁRIOS DE
CAMUNDONGOS FÊMEAS ALIMENTADOS COM
DIFERENTES TIPOS DE DIETA**

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 Prof. Dra.
Rita Luiza Peruquetti.

BAURU

2014

D129i

Daher, Isabela Pazotti.

Influência da administração de infusão de chá verde em diferentes fases o dia na expressão do receptor LXR em ovários de camundongos fêmeas alimentados com diferentes tipos de dieta / Isabela Pazotti Daher. -- 2014.

41f.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

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

1. Ritmos biológicos. 2. Metabolismo. 3. Obesidade. 4. Fertilidade. 5. Chá verde. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.

ISABELA PAZOTTI DAHER

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE INFUSÃO DE CHÁ VERDE
EM DIFERENTES FASES DO DIA NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR
LXR EM OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS ALIMENTADOS
COM DIFERENTES TIPOS DE DIETA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina sob orientação da Prof. Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini
Universidade do Sagrado Coração (USC)

Profa. Dra. Juliana Elaine Perobelli
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

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

Bauru, 5 de dezembro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais José Luiz e Silvana que sempre estiveram ao meu lado me educando e me incentivando a realizar meus objetivos; aos meus irmãos Fernanda e José Victor que fazem parte da minha história e que sempre me deram forças para seguir em frente; a minha avó Edna, meus tios Sergio e Solange que sempre participaram da minha educação; e ao meu namorado Jorge por toda paciência e carinho comigo, além de sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar meus pais, irmãos, familiares, amigos, namorado, professores do passado e atuais e todos aqueles que compartilharam seus conhecimentos comigo, porque diretamente ou indiretamente, contribuíram para a construção dos meus valores. Em segundo lugar agradeço muito a minha orientadora, Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti, por primeiramente ter me aceitado como sua orientada, por toda paciência e compreensão, conseguindo lidar com meu desespero e preocupação, e por todo o carinho e ensinamentos passados por ela, e também pela essencial ajuda para a correta realização deste trabalho. Em terceiro lugar agradeço a equipe de colaboração deste trabalho, Wilson Aparecido Orcini, Fernanda Pazotti Daher Arcangelo, Renata Pereira Amorim, Gabrielly Rodrigues Sarria, Elisa Gomes Santos, Tais Gonçalves Berbel e Larissa Fiamengui de Pauli, pois sem a ajuda de todos eles não seria possível à realização do mesmo, dando grande ênfase para minha irmã Fernanda, que sem ela este trabalho não teria sido pensado e nem executado, assim como o Wilson, por toda paciência e ajuda no laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da USC. Sem vocês este trabalho não teria sido realizado de modo tão eficiente. Agradecendo também o importante auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do presente trabalho sob a forma de bolsa de Iniciação Científica (Processo FAPESP no. 2014/07243-9). E em último, mas não menos importante, a minha amiga Gabrielly que esteve comigo nesses quatro anos de faculdade em todas as atividades, sendo elas grupo de pesquisa, iniciação, TCC, estágios, fazendo toda a diferença em todos esses momentos, passando junto comigo por todas as dificuldades, momentos de alegria e aprendizagem.

RESUMO

Os ritmos biológicos são definidos como mudanças em variáveis fisiológicas ou comportamentais que se repetem regularmente, como a alternância entre a vigília e o sono, ou ciclo menstrual dos mamíferos. Esta organização temporal é composta por ritmos de diversas frequências, como o ciclo circadiano, que são ciclos endógenos de duração de 24 horas que afetam e modulam processos fisiológicos, induzindo a expressão de uma variedade de genes, como por exemplo, genes ligados à atividade de controle do metabolismo. Porém, atualmente, o estilo de vida contemporâneo tem afetado drasticamente os hábitos de vida, inclusive os hábitos alimentares da população, o que vem gerando maior índice de síndromes metabólicas, como por exemplo, a obesidade, que por sua vez exerce um impacto importante na fertilidade feminina, pois contribui para a não ovulação. Como consequência a população em geral vem ingerindo fitoterápicos, como infusão de *Camellia sinensis*, conhecida como chá verde, que é utilizado por causa de seu efeito no controle da oxidação lipídica e na taxa glicêmica. Objetivo: Avaliar como a administração da infusão de *C. sinensis*, em diferentes momentos do dia, para camundongos submetidos a diferentes tipos de dieta (normal e hipercalórica), influenciou no controle do peso corporal, nos níveis glicêmicos, no consumo de ração, bem como expressão da proteína LXR nos ovários. Materiais: Foram utilizados 20 camundongos fêmeas divididos em 4 diferentes condições experimentais (dieta controle ou dieta hipercalórica) com a administração da infusão do chá verde em diferentes fases do dia (fase clara ou escura). Resultados e Discussão: Os resultados mostraram que os animais que foram alimentados com ração hipercalórica e receberam administração do chá verde uma hora após acender as luzes (no período de descanso para eles) mostraram um nível maior de perda de peso. Também foi observado que todos os grupos animais não mostraram diferença nos níveis glicêmicos, e apresentaram uma nítida diminuição no consumo alimentar após a administração do chá. E no receptor LXR não ocorreu variação da expressão desta proteína entre os grupos experimentais. Conclusão: A perda de peso foi o único parâmetro afetado pelas condições experimentais propostas no presente trabalho.

Palavras-chave: Ritmos Biológicos; Ciclo Circadiano; Metabolismo; Obesidade; Fertilidade; Chá verde.

ABSTRACT

Biological rhythms are regulatory mechanisms allowing the organisms predicting and changing their physiological and behavioral activities in response to environmental stimulus. Circadian cycles are regulatory responses occurring within a 24 hour period. The central circadian control of the physiological activities is located in the suprachiasmatic nucleus (SNC) in the hypothalamus, but similar mechanisms of circadian control were also found in peripheral tissues (i.e. fat, liver, and gut). From a molecular stand-point, circadian rhythms are regulated by transcriptional and post-translational feedback loops generated by a set of interplaying clock proteins. The two main clock system proteins are CLOCK and BMAL1, which are transcription factors that heterodimerize and induce the expression of clock-controlled genes, such as metabolic genes. Modern lifestyle has a direct effect on the food consumption habits of the population. Alterations on those habits are leading to an increase in the prevalence of metabolic syndromes, such as obesity. It is known that obesity can affect the fertility rates in women population mainly by causing anovulatory menstrual cycle. The ingestion of polyherbal or natural drugs, such as green tea extracts (*Camellia sinensis*) has been increasing among the population in the attempting to control obesity problems due its effects on the lipid oxidation and glycaemia. Aim: To check the influence of the green tea consumption at different day phases on the glycaemia levels, on the body weight control, on the food consumption as well as, on the expression of LXR ovary receptor. Material and methods: The experiments were performed by keeping 20 adult female under different diet (control and high calorie diet) followed by treatment with green tea at different day phases (light and dark phases). Results and Discussion: The group feed with high calorie diet and treated with green tea extracts at light phase showed a considerable body weight lost when compared to the other groups. All the groups showed a reduction in the food intake after treated with green tea although there were no statistic differences. There was also no difference among all the groups in the expression of LXR in the ovaries. Conclusion: Among all the parameters tested in the present study only body weight seemed to be influenced by our experimental conditions.

Key-words: Biological rhythms; Circadian Cycle; Metabolism; Obesity; Fertility; Green tea.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Ritmos biológicos.....	10
1.2 Ciclo circadiano e controle metabólico.....	12
1.3 Ciclo circadiano, metabolismo e fertilidade.....	14
1.4 Fitoterápicos termogênicos.....	15
1.5 Justificativa.....	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Delineamento Experimental.....	19
3.2 Preparo ração hipercalórica e da infusão <i>C. sinensis</i>	20
3.3 Controle do peso corpóreo; da taxa glicêmica; e da ingestão da ração.....	21
3.4 Análise estatística.....	22
3.5 Extração de proteínas totais e <i>ImunoBlot</i>	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Análise da variação do peso corpóreo.....	23
4.2 Análise da taxa glicêmica.....	24
4.3 Análise do consumo da ração.....	24
4.4 Análises da expressão ovariana da proteína LXR α / β	25
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	36
8. Anexo 1	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ritmos biológicos

A maioria das funções fisiológicas e comportamentais é manifestada nos seres humanos, assim como em outros organismos, ritmicamente através dos dias e das noites. Automaticamente, todos os seres humanos saudáveis apresentam o hábito de dormir à noite e acordar pela manhã. Ao encontrar um novo dia, o corpo do ser humano se prepara para as novas tarefas tais como aumentar a frequência cardíaca, a pressão arterial e a temperatura, por outro lado, os mesmos diminuem no final do dia (RANA, MAHMOOD, 2010).

São definidos como Ritmos Biológicos (RBs), mudanças em variáveis fisiológicas ou comportamentais que se repetem regularmente, como a alternância entre a vigília e o sono, ou o ciclo menstrual dos mamíferos. Os autores King, Takahashi (2000) citam que os relógios biológicos são denominados como mecanismos de sincronização que permitem que os organismos se adaptem, e até antecipem, as suas respostas frente aos estímulos externos. Os RBs manifestam-se em diferentes períodos, apresentando ou não relação com os ciclos ambientais (HIDALGO et al., 2009). Esta organização temporal é composta por ritmos de diversas frequências, embora o mais estudado seja denominado ciclo circadiano (CC), que possui em torno de 24 horas de duração, sendo o mais evidente o ciclo do sono e da vigília (MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997). Existem ritmos circadianos endógenos que afetam e modulam processos fisiológicos e comportamentais encontrados em organismos desde bactérias até mamíferos (WILLIANS et al., 2012), como por exemplo, a concentração de cortisol sérico que apresenta pico nas primeiras horas da manhã e cai ao longo do dia (HIDALGO et al., 2009).

Devido a isto, os organismos podem se antecipar as mudanças previsíveis no ambiente e orquestrar seu metabolismo, fisiologia e comportamento, através da modulação da transcrição gênica (WILLIANS et al., 2012). Durante o processo evolutivo os organismos, desde leveduras unicelulares até plantas e vertebrados, têm desenvolvido esses mecanismos moleculares, que permitem a sincronização de sua fisiologia com o ciclo diário de 24 horas (claro/escuro) (FROY, 2010). Assim, esses ritmos que possuem essa periodicidade de 24h recebem o nome de ritmos

circadianos, termo que provêm do latim "*circa diem*", que significa "*Cerca de um dia*" (RANA; MAHMOOD, 2010).

O relógio circadiano endógeno é autossustentável, o que significa que mesmo na ausência de estímulos externos, os ritmos podem continuar, o que fornecem mecanismos adaptativos antecipatórios as mudanças previsíveis diárias em seu ambiente, como luz, temperatura, servindo para sincronizar múltiplos processos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais moleculares aos organismos (RANA; MAHMOOD, 2010). Como exposto anteriormente, a maioria dos processos fisiológicos estão sujeitos à regulação circadiana, como por exemplo, nos mamíferos o ciclo de sono-vigília, a temperatura corporal, batimentos cardíacos, pressão arterial, secreção endócrina, atividade renal e metabolismo do fígado estão todos sob o controle de um sincronizador circadiano (HASTINGS, 1997; PORTALUPPI et al., 1996; RABINOWITZ, 1996; LAVERY; SCHIBLER, 1993; *apud* BALSALOBRE, 1998). O período do relógio é determinado geneticamente, enquanto que sua fase é fortemente influenciada *pelos zeitgebers* (estímulos) ambientais, que são fatores externos que auxiliam a sincronização do sistema circadiano, sendo o principal as variações da presença ou ausência de luz no ambiente, ou seja, os ciclos de claro e escuro. Entre outros processos fisiológicos, eles agem interferindo nas funções digestivas e de absorção, e nas variações da concentração de carboidratos, aminoácidos e lipídios na corrente sanguínea ao longo do dia. (KULCZYKOWSKA et al., 2010).

Uma descoberta importante sobre os ritmos circadianos nos últimos anos é que o Sistema Nervoso Central (SNC) não é o único relógio circadiano no organismo. A maioria dos tecidos, incluindo as regiões do cérebro extra-SNC e órgãos periféricos, possuem relógios circadianos periféricos. Além disso, estes osciladores podem funcionar de forma independente do SNC, porém são sensíveis a vários estímulos químicos ou ciclos de temperatura (RANA; MAHMOOD, 2010). Portanto, são denominados de relógio central ou osciladores circadianos centrais, os maiores temporizadores do sistema circadiano, que compreende grupos de células que se localizam no núcleo supraquiasmático do hipotálamo no SNC; e relógios circadianos periféricos ou osciladores circadianos periféricos os que se localizam nos tecidos periféricos como fígado, intestino e o tecido adiposo (MOTA, 2010).

O controle circadiano de um ponto de vista molecular é regulado por mecanismos cíclicos de retro-alimentação transcricional e pós-traducional, gerados

por um conjunto de proteínas que são denominadas proteínas *Clock*. Suas principais proteínas são conhecidas como CLOCK e BMAL1, que são fatores de transcrição que se heterodimerizam através de um domínio PAS e induzem a expressão de uma variedade de genes controlados por esse sistema de controle endógeno, inclusive genes ligados à atividade de controle do metabolismo, pois se ligam aos promotores desses genes, em suas regiões E-boxes, e controlam sua expressão (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

Outros genes controlados por *Clock* são os genes das famílias criptocromo (CRY1 e CRY2) e período (PER1, PER2, PER3) que codificam proteínas que regulam negativamente a maquinaria circadiana (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009). As proteínas CRY e PER são sintetizadas no citoplasma e se associam antes de entrar no núcleo (RANA; MAHMOOD, 2010). Essa associação age na inibição de transcrições mediadas por CLOCK-BMAL1, por meio da translocação das proteínas CRY e PER para o núcleo, fechando o mecanismo cíclico de retro-alimentação negativa. É necessário que esse complexo seja liberado por meio da degradação proteolítica de CRY e PER, para que um novo ciclo de transcrição regulado por CLOCK-BMAL1 recomece (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

1.2 Ciclo circadiano e controle metabólico

Tem sido amplamente avaliado o papel que o sistema circadiano molecular, tanto central quanto periférico, desempenha no controle das atividades metabólicas (ASHER; SCHIBLER, 2011; BELLET; SASSONECORSI, 2010; FROY, 2010; MAURY et al., 2010; MARCHEVA et al., 2009). Os mecanismos antecipatórios que precedem a obtenção do alimento, como o aumento da temperatura corporal, e a secreção duodenal, até o processamento dos metabolitos por si, são controlados pelos componentes moleculares desse sistema (STEPHAN, 2002). Alterações na disponibilidade de alimento, como por exemplo, a restrição alimentar (STOKKAN et al., 2001; HARA et al., 2001), e também modificações na composição da alimentação ingerida como por exemplo ingestão de dieta hipercalórica (KOHSAKA et al., 2007), também parecem alterar, não apenas periféricamente, mas também no SNC, a expressão circadiana de algumas proteínas responsáveis pelo controle metabólico.

No ponto de vista molecular os componentes do sistema circadiano atuam no controle geral do metabolismo, principalmente através da ação de moléculas

denominadas receptores nucleares. Os receptores nucleares formam uma classe de reguladores com função de interligar os componentes do controle circadiano e metabolismo, realizando um papel vital em vários processos biológicos, incluindo o desenvolvimento até a homeostase metabólica, funcionalmente sendo os sensores de hormônios lipídicos solúveis, como de lipídios provenientes da dieta (BELLET; SASSONE-CORSI, 2010).

Os receptores nucleares só vão coordenar a expressão gênica quando houver sinais ambientais e hormonais, agindo como fatores de transcrição se ligando diretamente a regiões de DNA hormônio-responsivas e recrutando várias proteínas co-reguladoras e os complexos de remodelamento de cromatina (SONODA et al., 2008; TROTTER; ARCHER, 2007). Estão relacionados com o controle dos ritmos circadianos, e com a regulação metabólica na maioria dos tecidos periféricos, alguns dos principais receptores nucleares, como por exemplo, o vírus eristoblastose reverso α (REV-ERB α) e os receptores da família receptor de peroxissomo proliferador-ativado (PPARs) (YANG et al, 2006).

Sendo assim, a expressão de REV-ERB α é determinada pelo heterodímero formado por CLOCK-BMAL1, onde sua expressão reprime a transcrição de BMAL1, via dois elementos de respostas ROR (retinoic acid receptor-related orphan receptor) em seu promotor (PREITNER et al., 2002). Já a interação entre REV-ERB α com outro componente do sistema circadiano molecular endógeno, a proteína PER2, que também participa da regulação de homeostase de glicose, modulando particularmente o metabolismo de glicogênio e glicogênese (SCHMUTZ et al., 2010).

Também estão relacionados com o metabolismo de lipídios e homeostase energética, atuando como coordenadores destas atividades nos tecidos periféricos os três membros da família PPAR (PPAR α , PPAR γ , PPAR δ) (YANG et al., 2006), além de participarem no controle da ativação do complexo CLOCK-BMAL1 (ASHER; SCHIBLER, 2011). As moléculas coativador transcripcional PGC1 α e a deacetilase da família das sirtuínas, SIRT1, são outras moléculas importantes para a interação da atividade metabólica e o sistema circadiano endógeno. O coativador transcripcional PGC1 α regula o metabolismo energético e se expressa de maneira circadiana controlando a expressão dos genes do sistema circadiano endógeno *Bmal1*, *Clock* e *Per2* (LIU et al., 2007). E a deacetilase da família das sirtuínas, SIRT1, é ativada de acordo com os níveis de NAD⁺ celulares, e podem atuar na deacetilação de BMAL1 limitando sua atividade, atuando também na deacetilação e

controle de outras proteínas envolvidas em metabolismo e proliferação celular (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2009).

1.3 Ciclo circadiano, metabolismo e fertilidade

A reprodução é outro importante processo biológico, que pode ser afetado por alterações dos ritmos biológicos (BODEN; KENNAWAY, 2006). Em várias espécies de insetos, o *clock* circadiano é necessário para que ocorra a ovulação, produção de espermatozoides e também para a determinação da fertilidade (GIEBULTOWICZ et al., 1989; BEAVER et al., 2002; BEAVER et al., 2003; BEAVER; GIEBULTOWICZ, 2004). Evidências indicam que, em mamíferos, o *clock* circadiano regula a concentração de muitos hormônios reprodutivos (LUCAS; ELEFTHERIOU, 1980; CLAIR et al., 1985; CHAPPELL et al., 2003; MILLER et al., 2004). Como por exemplo, a produção do hormônio luteinizante (LH) necessário para a ovulação em roedores, que ocorre no mesmo momento do dia em cada ciclo estral, requer um *clock* funcional (BARBACKA-SUROWIAK et al., 2003). É estabelecida em humanos e camundongos no início da puberdade um claro ritmo diurno dos níveis de gonadotrofina sérica (ANDREWS; OJEDA, 1981; JEAN-FAUCHER et al., 1986; DUNKEL et al., 1992; APTER et al., 1993). Além disso, a produção diária de melatonina, em conjunção com outros sinais circadianos hormonais ou neuronais, regulam o início da fertilidade sazonal (BODEN; DENNAWAY, 2006).

A obesidade atualmente é um grande problema epidemiológico que afeta a saúde global. A determinação da obesidade se dá pelo cálculo da massa corporal (IMC) que utiliza a fórmula $\text{peso/altura}^2(\text{kg/m}^2)$. A obesidade tem demonstrado ser de impacto importante na fertilidade, pois ela contribui para a não ovulação, podendo também aumentar as taxas de aborto espontâneo, além do que mulheres obesas possuem maior chance de desenvolver diabetes gestacional e pré-eclâmpsia, precisando de cesarianas, dando maior custo de saúde periparto. Entretanto a obesidade também tem um impacto negativo na fertilidade através de um mecanismo uterino (DEUGARTE et al., 2010)

A obesidade foi associada à fecundidade prejudicada, onde mulheres obesas sofrem perturbações no eixo hipotálamo-hipófise-ovários, que causa distúrbios do ciclo menstrual e que são até três vezes mais propensas a sofrer a não ovulação. Um equilíbrio hormonal regula o desenvolvimento folicular e a maturação dos oócitos, que pode ser alterado pela obesidade por este meio hormonal. A leptina

como exemplo, é um hormônio produzido pelos adipócitos e apresenta-se elevado em mulheres obesas, porém a leptina aumentada tem sido associada com a fecundidade prejudicada, onde a obesidade prejudica a ovulação e o desenvolvimento do endométrio e de implantação (BREWER; BALEN, 2010).

O receptor X do fígado conhecido como (LXR), é responsável pela proteção de células da sobrecarga de colesterol, estimulando assim a expressão de enzimas transportadoras de colesterol e a conversão do mesmo em ácidos biliares e excreção biliar. Os LXRs existem em duas isoformas, o LXR alfa ($LXR\alpha$) que é altamente expresso no fígado, rim, intestino delgado, tecido adiposo e em macrófagos, e expresso a um nível mais baixo nos outros tecidos, que desempenha um papel essencial para o equilíbrio do colesterol. E o LXR beta ($LXR\beta$), que em contraste parece ser menos importante para o metabolismo do colesterol no organismo, mas ambos $LXR\alpha$ e $LXR\beta$ são expressos nos ovários, com expressão maior em oócitos do que nas células do *cumulus*. Sabe-se que $LXR\beta$ aumentam durante a fase lútea e, além disso, são expressos a um nível superior ao $LXR\alpha$ em células granulosa humana, isolados a partir do fluido folicular de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (BETOWSKI; SEMCZUKB; 2010). Portanto, o LXR desempenha um papel complexo no sistema reprodutor dos mamíferos regulando o equilíbrio do colesterol em células específicas, sendo um componente celular que pode apresentar-se altamente alterado em casos de obesidade e infertilidade. Esses receptores afetam a gametogênese e esteroidogênese nas gônadas no metabolismo hepático de esteroides sexuais e na contratilidade uterina.

1.4 Fitoterápicos termogênicos

Para o controle da obesidade, algumas ferramentas como o uso de termogênicos naturais, estão sendo utilizados como estratégias para a perda e manutenção de peso (ALTERIO et al., 2007). O chá verde (*Camellia sinensis*), dentre todos os fitoterápicos comumente utilizados no controle do peso corporal, é um dos mais difundidos entre a população (WOLFRAM et al., 2006). Sendo considerada uma bebida saudável, o chá apresenta propriedades medicinais desde tempos remotos, mas que recentemente tem despertado grande interesse no meio científico devido sua atividade como antioxidante. O chá verde é produzido a partir de folhas secas de *C. sinensis* colhidas de diferentes partes da planta, o que

determina os vários tipos de chás disponíveis, contendo grande número de substâncias bioativas, fitoquímicas, incluindo polifenóis, cafeínas, aminoácidos e traços de lipídios e vitaminas, fazendo dele um alimento funcional pela presença dos flavonóides e catequinas (ALTERIO et al., 2007). O chá verde contém componentes polifenólicos que incluem os flavanóis, flavandióis, flavonoides e ácido fenólicos que totalizam cerca de 30% o peso das folhas secas. Sendo assim, a maioria dos polifenóis encontrados no chá verde se apresenta como flavanóis, e entre eles, predominam as catequinas (LAMARAO; FIALHO, 2009). Podemos destacar dentre as principais catequinas pertencentes ao grupo dos flavonóides, que compõe a folha fresca e a infusão de *C. sinensis*, a epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina gallato (ECG) e epigallocatequina gallato (EGCG) sendo, esta última, a mais abundante no chá verde e a que concentra maiores interesses e investigações (FREITAS; NAVARRO, 2007). Os flavonóides são amplamente reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, visto que sua atividade está relacionada à prevenção de várias doenças, incluindo obesidade, arteriosclerose, vários tipos de câncer e da hipertensão (PIMENTEL-SOUZA et al., 2012). Sendo assim, a infusão do chá verde, segundo vários estudos, mostram que ele é consumido diariamente pela população em geral em doses que variam entre 3 e 10 copos/diários, sendo consumido principalmente após as grandes refeições diárias, visando a perda de peso corporal, mas também outros efeitos atribuído aos componentes dessa infusão como prevenção de doenças cardiovasculares, combate a vários tipos de câncer, controle de diabetes, combate ao envelhecimento, e feitos antibacterianos e antivirais (KHAN; MUKHTAR, 2007).

A preparação de uma típica infusão de chá verde com 1g de folhas da erva *C. sinensis* em 100mL de água quente, proporciona aproximadamente 250-350 mg de material sólido, constituído por 35-45% de catequinas e 6% de cafeína (VALENZUELA, 2004). Sendo estimado que uma xícara de 240 mL de chá verde contém cerca de 200 mg de EGCG, o polifenólico em maior quantidade encontrado no chá verde (LAMARAO; FIALHO, 2009). Os principais mecanismos de ação da ingestão da infusão de *C. sinensis* segundo estudos para a manutenção do peso corporal estão relacionados com o aumento da termogênese e da oxidação lipídica (DIEPVENS et al., 2006); assim como a correção efetiva de índices elevados de colesterol, triglicérides, LDL no sangue, assim como a inibição da adipogênese e o

aumento da morte celular por apoptose (ALTERIO et al., 2007) com o aumento do gasto energético e diminuição do quociente respiratório (DULLOO et al., 1999).

1.5 JUSTIFICATIVA

Pesquisas científicas nos últimos anos têm demonstrado que: os componentes do sistema circadiano molecular atuam no controle geral do metabolismo, realizando um papel vital em vários processos biológicos, incluindo o desenvolvimento da homeostase metabólica, como de lipídios provenientes da dieta; a obesidade atualmente é um grande problema que afeta a saúde global; essa síndrome metabólica tem demonstrando ser importante na infertilidade feminina contribuindo para a não ovulação; a reprodução é um processo biológico que também é fortemente influenciado pelos ritmos circadianos; o receptor LXR é responsável pela proteção de células da sobrecarga do colesterol, sendo que ambas as isoformas de LXR, alfa e beta, são expressas nos ovários; no controle da obesidade algumas ferramentas, como o uso de termogênicos naturais, estão sendo utilizados como estratégias para a perda e manutenção de peso, sendo que o alto consumo de chá verde vem sendo utilizado pelas pessoas cada vez mais, por causa do seu efeito no controle da oxidação lipídica e na taxa glicêmica. Levando em consideração todos os fatores supracitados, percebe-se que estudos que visem analisar a expressão diferencial do receptor LXR em ovários de camundongos fêmeas que receberam a administração da infusão de *C. sinensis* em dois diferentes momentos do dia e que foram alimentados com diferentes tipos de dietas, são de extrema importância. Este tipo de estudo contribuiria para a obtenção de maiores informações sobre os benefícios do consumo deste produto natural no controle ou na perda de peso corporal, no índice glicêmico, no consumo alimentar e, por consequência, sua contribuição para a manutenção da atividade ovariana feminina, por meio de sua associação com o controle da obesidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar como a administração da infusão de *C. sinensis*, em diferentes momentos do dia, para camundongos fêmeas submetidos a diferentes tipos de dieta (normal e hipercalórica), influencia no controle de peso corporal; nos níveis de glicemia; no consumo de ração, bem como na expressão ovariana de LXR.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se administração de infusão de *C.sinensis* para camundongos fêmeas que estão em diferentes regimes de alimentação, sendo um composto por dieta normal e outro composto por dieta hipercalórica, durante diferentes fases do dia, ou seja, fase clara e fase escura do dia, influenciou no controle do peso corporal de cada grupo experimental.

- Avaliar se administração de infusão de *C.sinensis* para camundongos fêmeas que estão em diferentes regimes de alimentação, sendo um composto por dieta normal e outro composto por dieta hipercalórica, durante diferentes fases do dia, ou seja, fase clara e fase escura do dia, influenciou no controle da glicemia de cada grupo experimental.

- Avaliar se administração de infusão de *C.sinensis* para camundongos fêmeas que estão em diferentes regimes de alimentação, sendo um composto por dieta normal e outro composto por dieta hipercalórica, durante diferentes fases do dia, ou seja, fase clara e fase escura do dia, influenciou no consumo de ração de cada grupo experimental.

- Avaliar se administração de infusão de *C.sinensis* para camundongos fêmeas que estão em diferentes regimes de alimentação, sendo um composto por dieta normal e outro composto por dieta hipercalórica, durante diferentes fases do dia, ou seja, fase clara e fase escura do dia, influenciou a atividade ovariana de cada grupo experimental, por meio da análise da expressão do receptor LXR α e β nos ovários.

3. MATERIAL 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*, 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).

3.1 Delineamento Experimental

Foi utilizado um grupo de 20 camundongos fêmeas que foram subdivididos em quatro grupos, sendo chamados de grupos Luz Normal *Control Diet* (LNCD); Luz Normal *High Fat Diet* (LNHFD); Luz Invertida *Control Diet* (LICD) e Luz Invertida *High Fat Diet* (LIHFD). Cada gaiola continha 5 animais, sendo identificados por cores diferentes (rosa, roxo, azul, verde e sem cor). As gaiolas foram identificadas com etiquetas de acordo com o grupo dos animais, sendo assim os grupos LNCD e LNHFD foram selecionados para serem da sala com fotoperíodo normal (acendimento das luzes às 07:00h e desligamento das luzes às 19:00h), e os grupos LICD e LIHFD foram selecionados para serem da sala com fotoperíodo invertido (acendimento das luzes às 19:00h e desligamento das luzes às 07:00h). Entretanto, na sala fotoperíodo normal o grupo chamado de LNCD recebia ração normal, e o grupo chamado de LNHFD recebia ração hipercalórica. Já os grupos da sala de fotoperíodo invertido, o grupo chamado de LICD recebia ração normal, e o grupo chamado de LIHFD recebia ração hipercalórica.

Houve um período de 07 dias de aclimação de cada grupo experimental nas condições descritas acima. Durante os 20 primeiros dias experimentais de controle, cada grupo recebeu respectivamente sua ração, onde ocorreu o monitoramento semanal do peso, e da glicemia, e diariamente ingestão alimentar dos camundongos. Após os 20 primeiros dias que foram usados como período controle, foi iniciada a administração do chá verde (*C. sinensis*) diariamente pelo método de gavagem por mais 20 dias, onde continuou sendo realizado o monitoramento semanal do peso, e da glicemia, e diariamente ingestão alimentar dos camundongos.

Sendo assim, na sala fotoperíodo normal, o grupo LNCD continuou recebendo a ração normal e uma hora após acender as luzes recebia a administração do chá verde; e o grupo LNHFD continuou recebendo a ração hipercalórica e uma hora após acender as luzes recebia a administração do chá verde. Na sala fotoperíodo invertido o grupo LICD continuou recebendo a ração normal e uma hora após apagar as luzes recebia a administração do chá verde; e o grupo LIHFD continuou recebendo a ração hipercalórica e uma hora após apagar as luzes recebia a administração do chá verde.

Ao final dos experimentos, os camundongos foram eutanaziados, de acordo com a descrição inicial, sendo coletados os ovários para extração de proteínas totais e análise da expressão de LXR α e β por *ImunoBlot*.

3.2 Preparo ração hipercalórica e da infusão de *C. sinensis*

A confecção da ração hipercalórica foi realizada sendo preparada seguindo um padrão onde 350g do pó de ração normal era acrescido com 395g de leite condensado e mais 350g de açúcar tipo cristal. A mistura foi homogeneizada sob uma temperatura de aproximadamente 100°C. Após o resfriamento, o homegeinizado era fragmentado em pedaços que se assemelhavam ao tamanho do *pellet* da ração normal. Em quilocalorias calcula-se, aproximadamente, que 1kg de ração foi enriquecida com cerca de 2.683,75 kcal. Desta forma a dieta foi enriquecida com grande quantidade de sacarose/glicose, ocasionando aumento calórico (CONTRERAS et al., 1991).

A infusão de chá verde foi preparada a partir da dose (peso corporal/ dosagem da infusão), que foi administrada durante o procedimento experimental sendo calculada de acordo com o autor Valenzuela, 2004, que indica que uma infusão

típica de chá verde deve ser preparada com 1g de folhas da erva *C. sinensis*. Folhas e brotos secos foram colocados com 100 mL de água fervente por 5 a 10 minutos que foram administradas na quantidade de 0,5mL/dia. A concentração utilizada foi administrada a partir de cálculos que se basearam no peso dos animais para o consumo de 3,5 copos/dia (baseado em humanos), uma média feita a partir dos dados encontrados pelos autores Khan e Mukhtar (2007). Essa concentração por peso de animal (mg/Kg) seria de 5mg/g, o que é aproximadamente 250mg/animal, pois cada animal pesava em média 50g. Na prática primeiramente foi administrada 0,5mL ao dia do chá, porém esta quantidade não funcionou, o que levou a diluição, de 1 g das folhas secas do chá em 50mL de água fervente, sendo administrados 0,25mL/dia, ou seja, foi realizada uma administração em uma porção menor, porém com a mesma concentração servida em temperatura ambiente.

3.3 Controle do peso corpóreo; da taxa glicêmica; e da ingestão da ração.

Os 20 primeiros dias experimentais foram utilizados como período de controle, onde foi realizado o monitoramento semanal do peso, da glicemia e diariamente da ingestão alimentar dos camundongos. O monitoramento do peso corpóreo, para todos os grupos de animais, foi realizado todas as segundas-feiras, em horário próximo, pesando os animais um de cada vez em uma balança analítica, em um recipiente que permanecia tarado até a mensuração do peso, sendo sempre anotados os resultados, servindo como dado para o experimento.

O controle da taxa glicêmica também foi realizado todas as segundas-feiras, utilizando método de aferição de glicemia capilar humana, adaptada para camundongos, onde os mesmos eram submetidos à punção sanguínea na extremidade posterior da cauda e o sangue colhido era depositado em fita para coleta, o qual ficava inserido no aparelho de aferição glicêmica. As coletas foram realizadas nos mesmo horários que das outras semanas e dos outros grupos.

O controle da ingestão alimentar foi realizado todos os dias pesando a quantidade de ração que havia sobrado em cada caixa, em uma balança analítica, subtraindo da quantidade de ração que havia sido colocado no dia anterior, para ser realizado o cálculo de consumo, e então a ração eram completados para o peso de 70 a 80 gramas de ração, sendo realizado este procedimento todos os dias, aproximadamente às 9 horas da manhã.

Posteriormente aos 20 primeiros dias experimentais de controle, foi iniciada a administração do chá verde (*C. sinensis*) diariamente pelo método de gavagem, por mais 20 dias diários, onde continuou sendo realizado o monitoramento semanal do peso e da glicemia, e diariamente da ingestão alimentar de cada animal como descritos a cima.

3.4 Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada por meio da análise do Skewness e do Kurtosis (HA; HA, 2007) e a homogeneidade de variância pelo teste F max (ZAR, 1999). Posteriormente à checagem da normalidade dos dados, o teste de escolha foi o teste t independente que avaliou a variação de peso, o consumo de ração e, também, a variação da taxa glicêmica, nos quatro grupos experimentais (LNCD, LNHF, LICD e LIHFD), antes e após a administração da infusão de *C. sinensis*. Os testes foram realizados de acordo com Zar (1999). Os testes foram aplicados por meio do software *Statística – Versão 10*. Foram considerados resultados estatisticamente significantes os que apresentaram valor de $p \leq 0,05$.

3.5 Extração de proteínas totais e *ImunoBlot*

A extração de proteínas totais foi realizada a partir de cada ovário homogeneizando os mesmos em tampão RIPA com inibidores de protease. Foi utilizado para cada amostra 400 μL do tampão RIPA com inibidores, sendo utilizado um homogeneizador automático para fragmentação do tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 14000xg, 4°C, por 15 minutos. Após a centrifugação era coletado o sobrenadante de cada amostra onde estavam contidas as proteínas totais de interesse. A quantificação das proteínas totais extraídas foi realizada pelo método Bradford utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). A leitura de todas as amostras no espectrofotômetro foi realizada utilizando o branco que era constituído de RIPA + inibidores; os padrões e as amostras que foram diluídas em 200 μL de Bradford + 1 μL da amostra, apresentando uma curva como resultado o gráfico das concentrações de cada amostra. E em seguida foi realizado a normalização de todas as amostras para concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, seguindo a fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, que foi realizado pegando a concentração exata calculada de cada amostra, completando o volume com 200 μL de RIPA + inibidores.

Após a normalização foi adicionado a cada amostra 50 μ L de Laemmli Buffer, e as mesmas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para a realização do *imunoblot* primeiramente foi realizado a montagem do gel 10% SDS-poliacrilamida, e colocado 15 μ L de extrato de proteínas normalizadas dos ovários, que foram colocadas nos poços em sequência ao marcador. Após a corrida das proteínas no gel, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de polivinilideno por meio de *eletroblotting*. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBST 1x e tratadas com leite desnatado 5%/PBST 1x por 1 hora a temperatura ambiente, para ocorrer o bloqueio de marcações inespecíficas. Após a retirada do leite as membranas eram lavadas com PBST 1x. A incubação com anticorpo primário LXR $\alpha\beta$ (H-7): sc-377260 (Santa Cruz Biotechnology) e anti- α -tubulina (T5168) (Sigma Aldrich) foi realizada *overnight* a 4°C . O anticorpo primário utilizado foi utilizado na concentração de 1:100 e 1:8000, respectivamente, em leite desnatado 5%/PBST 1x. Após a incubação *overnight* as membranas foram lavadas com PBST 1x, 3 vezes por 5 minutos; e em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário (HRP Rabbit anti-mouse-Invitrogen 616520) diluído em leite desnatado 5%/PBST 1x, na concentração de 1:8000, por 1 hora, a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas em PBST 1x, por mais 3 vezes, secas e colocadas em solução reveladora, sendo reveladas por meio de filmes fotográficos para detecção das proteínas.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da variação do peso corpóreo

A partir dos dados coletados durante a pesagem semanalmente de cada animal, foi realizada a análise da variação do peso corpóreo dos animais em cada grupo experimental, considerando o peso do início do período experimental, e do final do período experimental. A variação do peso dos animais do grupo LICD (Figura 1A) teve como resultado estatístico $p=0,828$; no grupo LIHFD (Figura 1B), teve como resultado estatístico $p=0,467$; a variação de peso no grupo LNCD (Figura 1C) teve como resultado estatístico $p=0,424$; e o grupo LNHFD (Figura 1D) teve como resultado estatístico $p=0,099$. Como o valor de significância do teste foi determinado em $p\leq 0,05$, nenhum dos resultados foi considerado estatisticamente significativo, porém observa-se que o grupo LNHFD apresentou resultado marginalmente significativo, mostrando uma

maior tendência à perda de peso corpóreo depois do período de administração de infusão de chá-verde (Figura 1D).

4.2. Análise da taxa glicêmica

A partir dos dados coletados durante a aferição da glicemia semanalmente de cada animal, foi analisada a variação da taxa glicêmica dos animais em cada grupo experimental considerando-se a glicemia no início do período experimental e, posteriormente, no final do período experimental. A variação da taxa glicêmica do grupo LICD (Figura 2A) teve como resultado estatístico $p=0,129$; a variação da glicemia do grupo LIHFD (Figura 2B) teve como resultado estatístico $p=0,995$; o grupo LNCD (Figura 2C) teve como resultado estatístico $p=0,172$; e a variação glicêmica no grupo LNHFD (Figura 2D) teve como resultado estatístico $p=0,818$. Todos os dados foram submetidos ao teste T independente do software estatística – versão 10. Como o valor de significância do teste foi determinado em $p \leq 0,05$, pode-se observar que nenhum dos resultados foi considerado estatisticamente significativo. Mesmo não havendo diferença estatística foi possível observar que o grupo LICD apresentou uma diminuição nos níveis glicêmicos após o início da administração do chá, enquanto que o grupo LNCD apresentou um ligeiro aumento neste parâmetro após o início de administração do chá.

4.3. Análise do consumo da ração

A partir dos dados coletados diariamente durante todo o experimento, foi analisada a quantidade de ração consumida pelos animais de cada grupo experimental considerando a ração consumida no início do período experimental e, posteriormente, no final do período experimental. A variação do consumo de ração pelos animais do grupo LICD (Figura 3A) teve como resultado estatístico $p=0,249$; o consumo de ração pelos animais do grupo LIHFD (Figura 3B) teve como resultado estatístico $p=0,195$; o grupo LNCD (Figura 3C) teve como resultado estatístico $p=0,482$; e a variação no consumo de ração no grupo LNHFD (Figura 3D) teve como resultado estatístico $p=0,808$. Como o valor de significância do teste foi determinado em $p \leq 0,05$, pode-se observar que nenhum dos resultados foi considerado

estatisticamente significativa. Mesmo não ocorrendo diferença estatística é possível observar que o consumo de ração foi visivelmente reduzido em todos os grupos experimentais (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D) após o período de administração de infusão de chá-verde, em qualquer fase do dia e sob qualquer regime alimentar.

4.4. Análise da expressão ovariana da proteína LXR $\alpha\beta$

Pela análise do *Western Blott* (WB), foi observado que a expressão da proteína LXR $\alpha\beta$ nos ovários das fêmeas dos quatro grupos experimentais não se mostrou alterado (Figura 4). Sendo assim, analisamos que a administração do chá verde em todos os grupos (LNCD, LNHFCD, LICD e LIHFCD) não promoveu diferença de expressão desta proteína. Ou seja, concluímos que tanto nos diferentes tipos de dieta, tanto a administração do chá verde em diferentes fases do dia, não alteraram a expressão desta proteína nos ovários, mostrando assim que elas permaneceram a exercer sua função principal que é a proteção dos ovários da sobrecarga do colesterol, mas que nessas condições experimentais não alteraram a sua expressão.

Todos os resultados descritos estão resumidos na Tabela 1.

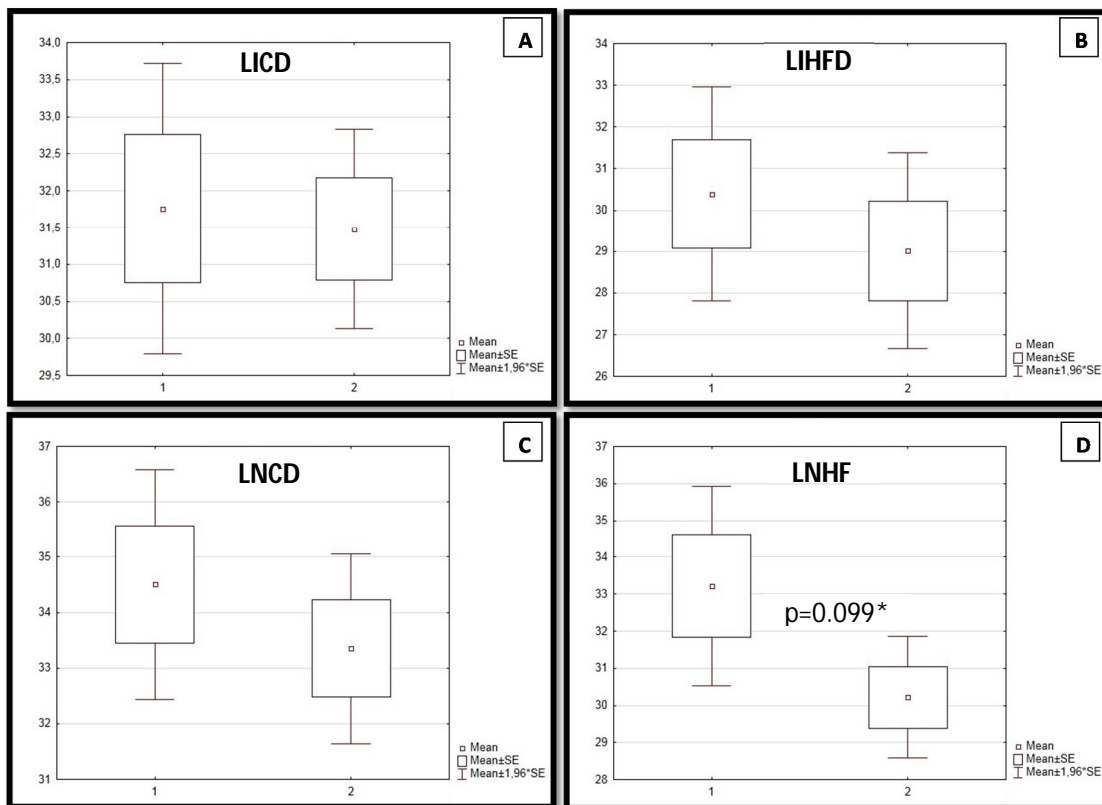


Figura 1 – VARIAÇÃO DE PESO CORPÓREO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

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.

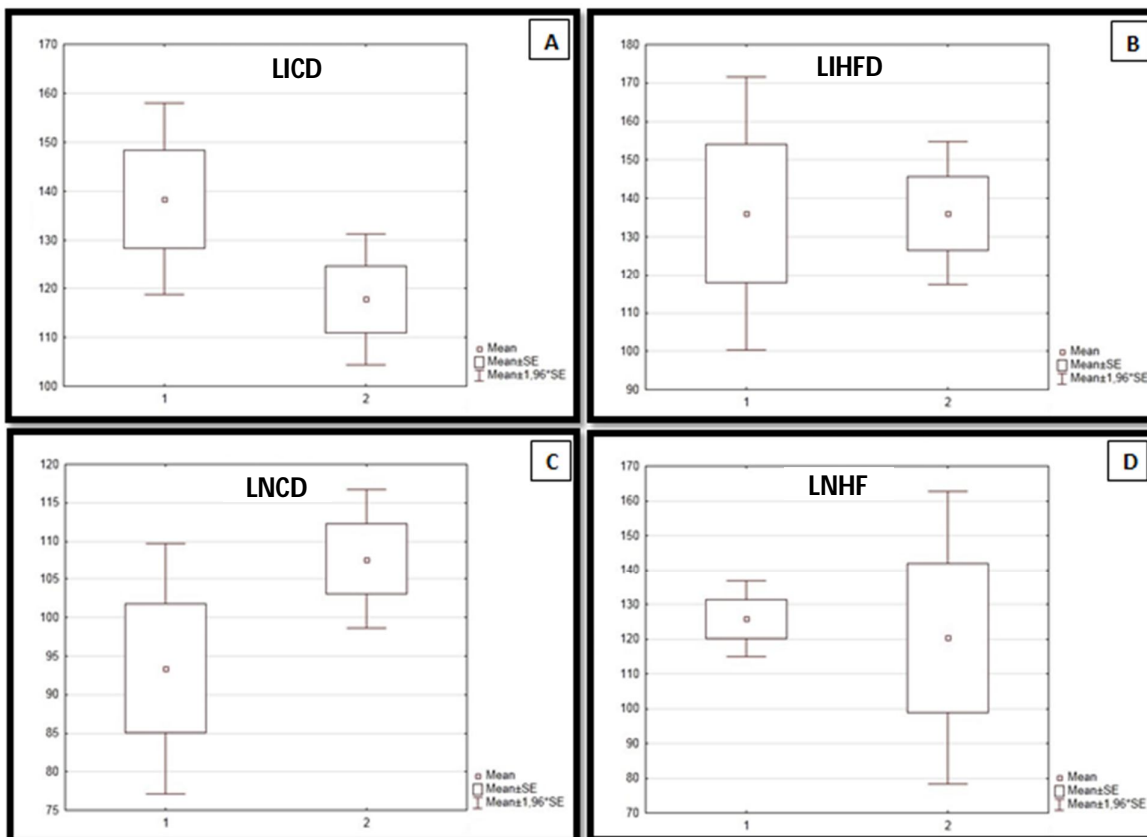


Figura 2 – VARIAÇÃO DA TAXA GLICÊMICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

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.

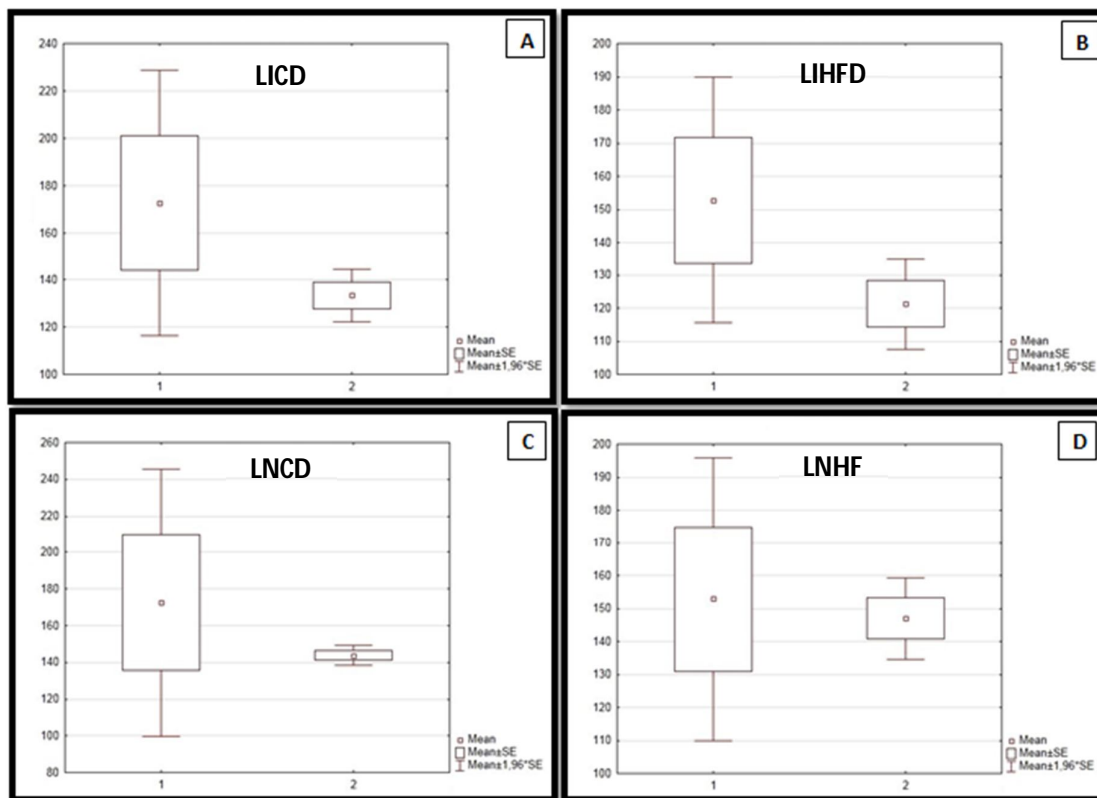


Figura 3 – VARIAÇÃO NO CONSUMO DE RAÇÃO DIÁRIA PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL. Figura 3A: Representação da variação do consumo de ração diária antes (1) e após (2) o início da administração do chá para o grupo LICD, que recebeu ração controle e administração de infusão de chá verde no período escuro do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

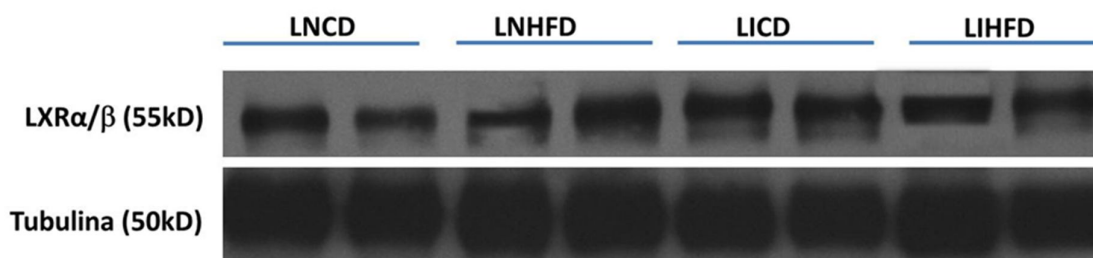


Figura 4 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LXRαβ EM OVÁRIOS DE ANIMAIS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL.

Detecção da expressão de LXRαβ 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 LNHFD (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 randomicamente. A expressão de tubulina foi utilizada como controle da reação.

Fonte: elaborado pela autora.

VARIÁVEIS	LICD	LIHFD	LNCD	LNHFD
Peso corporal	=	↓	↓	↓(*?)
Glicemia	↓	=	↑	=
Consumo ração	↓	↓	↓	↓
Expressão ovariana de LXR $\alpha\beta$	=	=	=	=

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. **SIMBOLOGIA:** (=): não apresentou alteração significativa; ↓(*?): ocorreu diminuição marginalmente significativa estatisticamente. ↓: ocorreu diminuição visual. ↑: ocorreu aumento visual.

Fonte: elaborado pela autora

5. DISCUSSÃO

Os experimentos realizados no presente trabalho objetivaram avaliar os efeitos, a curto prazo, da administração da infusão de *C. sinensis* em diferentes momentos do dia, para camundongos fêmeas submetidos a diferentes tipos de dieta (normal e hipercalórica), no controle de peso corporal; nos níveis de glicemia; no consumo de ração, bem como na expressão ovariana de LXR $\alpha\beta$.

Ao final do período de experimental foi possível observar que os animais de todos os grupos experimentais não apresentaram redução significativa de peso corporal após a ingestão do chá verde, porém no grupo LNHFDF (grupo que estava na sala fotoperíodo normal comendo ração hipercalórica, recebendo administração do chá verde uma hora após acender as luzes no biotério) caminhou para essa redução, pois a diferença estatística entre o peso corporal dos animais antes e após o período de ingestão da infusão foi marginalmente significativa $p=0.099$ (Figura 1). Entretanto, em estudo de Cruz e colaboradores (2010) que utilizaram ratos machos da linhagem Wistar-Hannover divididos em dois grupos com diferentes dietas, controle e obesos, subdivididos em (tratados e não tratados) com administração do chá verde, por duas semanas. Foi observado como resultado uma diferença significativa de perda de peso corporal nos animais controles tratados com chá verde em relação ao grupo de animais controles que não receberam o mesmo tratamento. Yang e colaboradores (2014) também demonstraram os efeitos do chá verde sobre a redução do peso corporal em humanos. Na maioria destes estudos foi observada uma diminuição de peso corporal quando a administração correspondeu a doses de 4 ou mais xícaras de chá verde por dia, equivalente a mais ou menos 600-900 mg de polifenóis do chá. Yang e colaboradores (2014) também sugeriram que existem evidências que o chá possui efeitos adicionais sobre o controle de síndromes metabólicas diminuindo, por exemplo, o risco para diabetes tipo 2. Ainda no estudo de Yang e colaboradores (2014) ratos foram alimentados com uma dieta rica em gordura, porém enriquecida com EGCG (a catequina mais abundante e importante presente na constituição da infusão de chá verde) em uma concentração de 3,2 g / kg de ração, durante 16 semanas. Esses autores descrevem a redução significativa no peso corporal, assim como na gordura visceral, entre o grupo que recebeu ração enriquecida com EGCG e o grupo que recebeu ração sem adição

deste composto. Sendo assim, através de todos esses dados na literatura e no presente trabalho, sugerimos que em um estudo com aumento do tempo do consumo de ração hipercalórica e o aumento do tempo de administração chá verde poderiam promover uma melhor visualização do efeito deste fitoterápico na redução de peso dos animais. Porém é interessante destacar que no presente estudo os dois grupos que foram alimentados com ração hipercalórica, porém que receberam administração de infusão de *C. sinensis* em momentos diferentes do dia (LNHFD e LIHFD) apresentaram diferenças evidentes na redução do peso corporal, sendo que os animais do grupo LNHFD, que receberam chá verde no início de seu período de descanso, perderam muito mais peso do que os animais do grupo LIHFD, que receberam chá verde no início de seu período de atividade. Tendo em vista que a ação do chá verde sobre o controle do peso corporal está principalmente relacionada aos efeitos deste fitoterápico sobre a interrupção da emulsificação e da absorção de lipídios, sobre a supressão da adipogênese da síntese de lipídios, sobre o aumento do gasto energético por meio do aumento da termogênese, sobre a oxidação de gordura e sobre a excreção fecal de lipídio (Huang et al., 2014), sugere-se que os animais alimentados com ração hipercalórica possuíram seu metabolismo lipídico intensificado pela administração do chá no início de seu período de descanso, momento do dia onde normalmente essas atividades apresentariam-se reduzidas, ou seja, metabolismo mais baixo na ausência dos efeitos dos princípios ativos da *C. sinensis*.

No presente estudo não se observou o efeito do chá-verde sobre índice glicêmico em nenhum dos grupos. Observou-se que ocorreu grande variação dos resultados entre os grupos, mas que nenhum foi estatisticamente significativo. Nos estudos de Cruz e colaboradores (2010) foi observado redução de glicemia após a infusão do chá verde em tempos determinados. Estes autores observaram que os animais obesos tratados com o chá apresentaram diminuição significativa da glicemia nos tempos de 60 e 120 minutos em relação ao grupo controle e obesos sem administração do chá. Yang e colaboradores (2014) também demonstraram que a administração do chá-verde além de reduzir significativamente o peso corporal, mostra efeito positivo na redução da taxa glicêmica no sangue reduzindo também os níveis de insulina. Porém, da mesma forma como ocorreu com os efeitos sobre a perda de peso, é possível que um

período experimental maior viesse a demonstrar os efeitos da administração do chá sobre a taxa glicêmica, em alguma condição de dieta e/ou em alguma condição de luz. Também é preciso levar em consideração a maneira de preparo e armazenamento do chá. No estudo de Nishiyama e colaboradores (2010) eles mostram a importância do preparo e do armazenamento correto do chá verde, pois as propriedades funcionais do chá são devidas ao seu conteúdo polifenólico, e que tem como resultado que o chá preparado permanece estável ao armazenamento em temperatura ambiente e em geladeira por 24 horas, sem apresentar alterações em seus princípios bioativos, e sem perder suas propriedades antioxidantes. Porém em nosso estudo o chá era preparado no início da semana, conservado em geladeira e era utilizado durante a semana toda, podendo ser um quesito que possa ter influenciado na não diminuição do índice glicêmico, uma vez que sabemos que ele só é estável há 24 horas.

No presente estudo também não foi detectado diferenças significantes entre o consumo de ração no período antes e após a administração da infusão de *C. sinensis*. Entretanto, mesmo não sendo estatisticamente significativa, a redução no consumo de ração em todos os grupos após o início da administração do chá verde é evidente. Assim como no estudo de Kao (2000) apud Lamarao e Fialho (2009) que mostram evidências que o extrato do chá verde contendo 25% de EGCG possa reduzir o apetite e aumentar o catabolismo de gorduras, sendo que a dose que surtem tais efeitos corresponde a aproximadamente 3 copos por dia (240 a 320 mg de polifenóis). Ainda segundo Kao (2000) apud Lamarao e Fialho (2009) a atuação da EGCG nos parâmetros endócrinos é explicada pelo seu efeito secundário na ingestão alimentar, por exemplo, com a diminuição de leptina circulante em ratos tratados com esta catequina podem ser causados pela redução de gordura estocada, que se deu a partir da baixa ingestão alimentar, portanto, o estudo mostra que a EGCG pode interagir especificamente como um componente do receptor independentemente da via de controle do apetite, da saciedade e conseqüentemente reduzindo a ingestão alimentar. Observando nossos resultados e os dados da literatura, observamos que o chá estimula sim uma diminuição no consumo alimentar, porém o tipo de alimentação e o momento de ingestão do chá parece não ter papel na regulação deste efeito, pois todos os grupos apresentaram a mesma tendência à redução.

Em nosso estudo observamos que a expressão da proteína LXR $\alpha\beta$ nos ovários não apresentou nenhuma alteração em todos os grupos. LXR é uma proteína que é responsável pela proteção de células da sobrecarga de colesterol, estimulado assim expressão de enzimas transportadoras de colesterol e a conversão do mesmo em ácidos biliares e excreção biliar (BETOWSKI; SEMCZUKB; 2010). Estas duas isoformas do LXR, LXR α e β , que são expressos em vários tecidos e ambos estão presentes nos ovários, desempenham um papel essencial para o equilíbrio do colesterol no organismo, possuindo um papel complexo no sistema reprodutor dos mamíferos regulando o equilíbrio do colesterol em células específicas, sendo um componente celular que pode apresentar-se altamente alterado em casos de obesidade e infertilidade. Esses receptores afetam a gametogênese e esteroidogênese nas gônadas no metabolismo hepático de esteroides sexuais e na contratilidade uterina (BETOWSKI; SEMCZUKB; 2010). Além disso, LXR também participa dos processos de defesa anti-inflamatória das células foliculares, pois atua como modulador da resposta anti-inflamatória e no metabolismo de lipídios em macrófagos, podendo reduzir a inflamação ligada à obesidade nos ovários, por meio da ativação de genes que promovem a remoção de lipídios das células da granulosa, como a apolipoproteína E, ou reprimindo a expressão de genes pró-inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6) (FREEMAN; MOORE, 2003 *apud* YOO et al., 2011).

É importante lembrar 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). Tendo em vista que a ativação de LXR poderia levar a depleção e redução de síntese de esteróide e que isso poderia ter um efeito deletério sobre o desenvolvimento do oócito (YOO et al., 2011) a expressão das duas isoformas desta proteína foi verificada nos grupos experimentais do presente trabalho. Porém foi observado que os diferentes regimes alimentares e os diferentes momentos de ingestão do chá não tiveram efeito nesta via fisiológica.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o desenvolvimento do presente trabalho nos permitem concluir que entre todos os parâmetros analisados (variação de peso corporal, variação da taxa glicêmica, variação do consumo de ração e, também, expressão ovariana da proteína LXR $\alpha\beta$) nos quatro grupos experimentais submetidos a diferentes regimes alimentares e, também, a diferentes fases do dia para ingestão de infusão de *C. sinensis*, os únicos fatores que apresentaram resultados significativos foi a marginal perda de peso pelo grupo LNHFDD (grupo alimentado por ração hipercalórica e que recebeu infusão de chá verde na fase clara do dia) e a relativa redução no consumo de ração após a ingestão da infusão em todos os grupos. Esses resultados sugerem que para indivíduos que não possuem uma dieta saudável, (ricas em açúcar; desbalanceadas), o consumo da infusão de *C. sinensis* seria mais efetivo se fosse realizado no início do período de descanso do dia, ou seja, no período claro. Sendo assim estas conclusões reforçam a importância da participação dos ritmos biológicos, do tipo de dieta e do consumo de fitoterápicos, tais como a *C. sinensis*, sobre o metabolismo energético dos indivíduos. Para novos experimentos fica em aberto um maior período de experimentação, um grupo controle tanto para a dieta hipercalórica como normal, um maior cuidado na produção e conservação do chá, assim como um controle genético dos animais (para evitar variações individuais interferindo na análise).

7. REFERENCIAS

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

ANDREWS, W.W.; OJEDA, S.R. A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. **Endocrinology**, v.109, p. 2032-2039, 1981.

APTER, D.; BUTZOW, T.; LAUGHLIN, G.; YEN, S. Gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: Pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins. **J Clin Endocrinol Metab**, v.76, p. 940-949, 1993.

ASHER, G.; SCHIBLER, U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. **Cell Metabolism**, v.13, p. 125-137, 2011.

BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. **Cell**, v. 93, p. 929–937, 1998.

BARBACKA-SUROWIAK, G.; SUROWIAK, J.; STOKLOSOWA, S. The involvement of suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. **Reprod Biol**, v.3, p. 99-129, 2003.

BEAVER, L.M.; GIEBULTOWICZ, J.M. Regulation of copulation duration by period and timeless in *Drosophila melanogaster*. **Curr Biol**, v.14, p. 1492-1497, 2004.

BEAVER, L.M.; GVAKHARIA, B.O.; VOLLINTINE, T.S.; HEGE, D.M.; STANEWSKY, R.; GIEBULTOWICZ, J.M. Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci**, v.99, p. 2134-2139, 2002.

BEAVER, L.M.; RUSH, B.L.; GVAKHARIA, B.O.; GIEBULTOWICZ, J.M. Noncircadian regulation and function of clock genes period and timeless in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. **J Biol Rhythms**, v.18, p. 463-472, 2003.

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

BETOWSKI, J; SEMCZUK, A. Liver X receptor (LXR) and the reproductive system- a potential novel target for therapeutic intervention. **Pharmacological Reports**, v.62, p. 15-27, 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.

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.; KING, S.; RIVES, L.; WILLIAMS, A.; WATTLETON, T. Dietary obesity and weight cycling in rats: a model of stress-induced hypertension? **Am. Physiol. Soc.**, p.848-857, 1991.

CRUZ, M. V.; NUNES, E.; MENDONÇA, L.; et al. Efeito do chá verde (*Camelia sinensis*) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 407-413, 2010.

DEUGARTE, D.A., DEUGARTE, C.M.; SAHAKIAN, V. Surrogate obesity negatively impacts pregnancy rates in third-party reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p.1008-1010, 2010.

DIEPVENS, K.; WESTERTERP, K.R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin and green tea. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 13, p.77-85, 2006.

DULLOO, A.G.; DURET, C.; ROHER, D.; et al. Efficacy of a green tea extract rich in polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 1040-1045, 1999.

DUNKEL, L.; ALFTHAN, H.; STENMAN, U.; SELSTAM, G.; ROSBERG, S.; ALBERTSSONWIKLAND, K. Developmental changes in 24-hour profiles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from prepuberty to midstages of puberty in boys. **J Clin Endocrinol Metab**, v.74, p. 890-897, 1992.

FREEMAN, M. W.; MOORE, K. J. eLiXIRs for restraining inflammation. **Nat Med**, 9(2):168-169, 2003

FREITAS, H.C.P.; NAVARRO, F. Green tea induces weight loss and helps in the treatment of obesity and its comorbidities. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v.1, p. 16-23, 2007.

FROY, O. Metabolism and Circadian Rhythms - Implications for Obesity. **Endocrine Reviews**, v. 31, p. 1-24, 2010.

GIEBULTOWICZ, J.M.; RIEMANN, J.G.; RAINA, A.K.; RIDGWAY, R.L. Circadian system controlling release of sperm in the insect testes. **Science**, v.245, p. 1098-1100, 1989.

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.

HASTINGS, M. H. Circadian clocks. **Curr. Biol.** 7, 670–672, 1997.

HIDALGO, M.; LEVANDOVSKI, R.; HARB, A.; BERNARDI, F. Transtornos alimentares e padrão circadiano alimentar: uma revisão. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v.31, n.3, p.170-176, 2009.

HUANG, J.; WANG, Y.; XIE, Z.; et al. The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. **European Journal of Clinical Nutrition**, 68, p.1075–1087, 2014.

JEAN-FAUCHER, C.; BERGER, M.; DE TURCKHEIM, M.; VEYSSIERE, G.; JEAN, C. Circadian variations in plasma LH and FSH in juvenile and adult male mice. **Horm Res**, v.23, p. 185-192, 1986.

KAO, Y. H.; HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Modulation of obesity by a green tea catechin. **Am J Clin Nutr**, 72(5), p. 1232-41, 2000.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, v. 81, p.519-533, 2007.

KING, D.P.; TAKAHASHI, J.S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p.713-742, 2000.

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.

KULCZYKOWSKA, E.; POPEK, W.; KAPOOR, B.G. **Biological clock in fish**. New York: CRC Press, 2010.

LAMARAO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, 22(2), p. 257-269, 2009.

LAVERY, D.J.; SCHIBLER, U. Circadian transcription of the cholesterol 7 α hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. **Genes Dev.** 7, 1871–1884, 1993.

LIU, C.; LI, S.; LIU, T.; et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α 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.

MARCHEVA, B.; RAMSEY, K.M.; AFFINATI, A.; et al. Clock genes and metabolic disease. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, p. 1638-1646, 2009.

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

MAURY, E.; RAMSEY, K.M.; BASS, J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. **Circulation Research**, v. 106, p. 447-462, 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.

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

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(Supl.1): pg.191-196, 2010.

PIMENTEL-SOUZA, J. D .R.; SOUZA, D. S.; GUALBERTO, N. C.; et al. Qualidade funcional da infusão do chá verde comercial. **Revista de Nutrição**, 25(6), p. 753-763, 2012.

PORTALUPPI, F.; VERGNANI, L.; MANDFREDINI, R.; Fersini, C. Endocrine mechanisms of blood pressure rhythms. **Ann. N. Y. Acad Sci.** 783, 113–131, 1996.

PREITNER, N.; DAMIOLA, F.; LOPEZ-MOLINA, L.; et al. The orphan nuclear receptor REVERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, p. 251-260, 2002.

RABINOWITZ, L. Aldosterone and potassium homeostasis. **Kidney Int.** 49, 1738–1742, 1996.

RANA, S.; MAHMOOD, S. Circadian rhythm and its role in malignancy. **Journal of Circadian Rhythms**, v. 8:3, 2010.

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

SCHMUTZ, I.; RIPPERGER, J. A.; BAERISWYL-AEBISCHER,; et al. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. **Genes Development**, v. 24, p. 345-357, 2010.

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

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.

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 te y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. **Revista Chilena de Nutrición**. v.31, p. 72-82, 2004.

YANG, C. S.; CHEN, G.; WU, Q. Recent Scientific Studies of a Traditional Chinese Medicine, Tea, on Prevention of Chronic Diseases. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.4, pg.17-23, 2014.


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.

YOO, S. W.; SAVCHEV, S.; SERGOTT, L.; et al. A Large Network of Interconnected Signaling Pathways in Human Ovarian Follicles is Supported by the Gene Expression Activity of the Granulosa Cells. **Reproductive Sciences**, 18(5), p.476-484, 2011.

WILLIAMS, S.R.; ZIES, D.; MULLEGAMA, S.V.; GROTEWIEL, M.S.; ELSEA, S.H. Smith-Magenis Syndrome Results in Disruption of CLOCK Gene Transcription and Reveals an Integral Role for RAI1 in the Maintenance of Circadian Rhythmicity. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, p. 941-949, 2012.


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

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

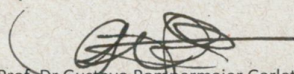
Bauru, 20 de agosto de 2013.

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>