

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**LEONARDO MARIN RODRIGUES**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRONOTERÁPICA  
DE CHÁ VERDE COMBINADA COM DIFERENTES  
DIETAS SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR  
NUCLEAR LXR EM TECIDO MUSCULAR  
CARDIACO E ESQUELETICO**

BAURU

2016

**LEONARDO MARIN RODRIGUES**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRONOTERÁPICA  
DE CHÁ VERDE COMBINADA COM DIFERENTES  
DIETAS SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR  
NUCLEAR LXR EM TECIDO MUSCULAR  
CARDIACO E ESQUELETICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Luiza Peruquetti.

BAURU

2016

R6961e	<p>Rodrigues, Leonardo Marin</p> <p>Efeito da administração cromoterápica de chá verde combinada com diferentes dietas sobre a expressão do receptor nuclear LXR em tecido muscular cardíaco e esquelético / Leonardo Marin Rodrigues. -- 2016. 30f. : il.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p>1. Ciclo circadiano. 2. Chá-verde. 3. Músculo cardíaco. 4. Músculo esquelético. 5 Receptor LXR . I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.</p>
--------	---

**LEONARDO MARIN RODRIGUES**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRONOTERÁPICA DE CHÁ  
VERDE COMBINADA COM DIFERENTES DIETAS SOBRE A  
EXPRESSÃO DO RECEPTOR NUCLEAR LXR EM TECIDO  
MUSCULAR CARDIACO E ESQUELETICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Luiza Peruquetti.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Luiza Peruquetti  
Universidade do Sagrado Coração

---

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen  
Universidade do Sagrado Coração

---

Renata Pereira de Amorim  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 21 de novembro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela oportunidade de estar me formando, e poder ter convivido com profissionais excelentes, e pessoas excepcionais nesta jornada, que hoje me tornaram um profissional na área da saúde, e uma pessoa melhor, além de servirem de espelho para meu futuro.

Gostaria também de agradecer a todos os professores e amigos, que compartilharam seus conhecimentos a fim de ensinar a mim e a minha turma, por terem tido paciência, compreensão, carinho com os alunos, e dedicação para nossa formação profissional e como ser humano.

Obrigado Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Rita Peruquetti pela orientação, ajuda, e auxílio na conclusão desse trabalho, pelas horas dedicadas, pelos ensinamentos e explicações a mim conferidos, obrigado por me ajudar a chegar onde estou hoje.

Obrigado Prof. Dr. Lucas Rasmussen pelos anos de aulas, lições, puxões de orelha, risadas, e companheirismo em sala.

Obrigado Renata Pereira de Amorim pela paciência, pelo auxílio e ensinamentos nesse período acadêmico e pela amizade.

Quero agradecer também a minha turma, e amigos, formandos de Biomedicina da Universidade do Sagrado Coração de 2016, pela companhia nessa caminhada, pelas risadas e brincadeiras, companheirismo em sala, pelo apoio, ajuda, incentivo e determinação que todos tiveram, e que doaram aos colegas quando necessário, para que todos nós pudséssemos chegar juntos ao fim dessa caminhada.

Agradeço também aos meus pais, Sidney Rodrigues e Katia Cilene Marin Rodrigues, pelo amor, carinho, dedicação, ensinamentos e compreensão, por poder me proporcionar estudo de qualidade, nunca me deixar faltar nada, sempre me apoiando e incentivando, principalmente em momentos difíceis. Assim como minha namorada Anne Caroline Octaviano de

Oliveira e sua família Mauro Messias e Gilda de Abreu Octaviano de Oliveira, que há anos fazem parte da minha vida e me dão igual apoio, incentivo, amor, carinho e ensinamentos.

Quero agradecer a minha irmã, Pamela Marin Rodrigues, pela ajuda em momentos de dificuldade durante o curso, pela paciência, pelo carinho, pelo amor, e pelo extremo companheirismo que temos como irmãos, e pela importância que ela e todas as pessoas citadas têm em minha vida.

Obrigado a todos pelo o que vocês fizeram durante esse período, se não fosse com a ajuda e apoio de todos, talvez hoje eu não tivesse chegado onde estou, sinto-me orgulhoso de ter todos vocês em minha vida, amigos, familiares, professores e colegas, obrigado por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia.

“A grandeza vem não quando as coisas sempre vão bem para você, mas a grandeza vem quando você é realmente testado, quando você sofre alguns golpes, algumas decepções, quando a tristeza chega. Porque apenas se você esteve nos mais profundos vales você poderá um dia saber o quão magnífico é se estar no topo da mais alta montanha.”

- Richard Milhous Nixon

## RESUMO

Ciclos circadianos podem ser definidos como mudanças em eventos fisiológicos e comportamentais que ocorrem dentro de um período de 24 horas. Os maiores temporizadores do sistema circadiano compreendem um grupo de células que se localizam no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, mas mecanismos semelhantes do controle circadiano também foram encontrados em tecidos periféricos. De acordo com a crença popular, o chá-verde (*Camellia sinensis*) tem o potencial de reduzir a gordura corporal, sendo consumido comumente como um fitoterápico para a perda de peso. Dessa forma, a infusão desta planta foi utilizada em nossas condições experimentais em diferentes períodos do dia para avaliarmos sua ação sobre a expressão do receptor nuclear LXR. O LXR tem se tornado um alvo em potencial para a farmacologia, e poderá ser usado para combater doenças cardiovasculares, metabólicas e musculares devido a sua capacidade de atenuação da resposta inflamatória e sua capacidade de metabolizar lipídios. Sua ação na oxidação de lipídios impede a insuficiência cardíaca e também combate a inflamação no miocárdio, já que o LXR também apresenta fatores de regulação inflamatória. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de nossa condição experimental sobre a expressão do receptor nuclear LXR $\alpha\beta$  nos tecidos musculares cardíaco e esquelético para avaliar se o mecanismo de ação deste fitoterápico é potencializado em alguma de nossas condições experimentais. Para tal finalidade camundongos fêmeas adultos foram divididos em quatro grupos (n=5/grupo): LPCD: dieta controle e ingestão de chá verde, por gavagem, a uma concentração de 0,2g/Kg/dia na fase clara do dia; DPCD: dieta controle e ingestão de chá verde na fase escura do dia; LPHGD: dieta hipercalórica e ingestão de chá verde na fase clara do dia; DPHGD: dieta hipercalórica e ingestão de chá verde na fase escura do dia. Os tecidos musculares cardíaco e esquelético foram coletados após um período de 20 dias experimentais. A expressão do receptor nuclear LXR $\alpha\beta$  foi avaliada entre os 4 grupos experimentais por meio de *Western blot*. Os resultados demonstraram que LXR $\alpha\beta$  foi expresso nos dois tipos de tecido dos 4 grupos experimentais. Porém houve uma redução na expressão deste receptor no tecido muscular cardíaco nos animais submetidos há uma dieta hipercalórica e que consumiram o chá verde na fase clara do dia. Portanto concluímos, dessa forma, que a qualidade dos alimentos ingeridos e também o período de ingestão de chá verde parece influenciar nos efeitos deste fitoterápico sobre a expressão de LXR $\alpha\beta$  no tecido muscular cardíaco.

**Palavras chave:** Ciclo circadiano; Chá-verde; Músculo cardíaco; Músculo esquelético; Receptor LXR $\alpha\beta$ .

## ABSTRACT

Circadian cycles can be defined as changes in physiological and behavioral events occurring within a 24 hour period. The major circadian system timers comprise a group of cells that are located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, but similar mechanisms of circadian control may also be found in peripheral tissues. Accordingly to common sense, green tea (*Camellia sinensis*) has the potential to reduce body fat, being consumed commonly as an herbal medicine for weight loss. Thus, the infusion of this plant was used in our experimental conditions at different times of the day to evaluate its effect on the expression of the nuclear receptor LXR. LXR has become a potential target for pharmacological studies. It can be used to combat cardiovascular, metabolic, and muscular diseases due to its attenuation capacity of the inflammatory response as well as its ability to metabolize lipids. Its action in the oxidation of lipids prevents heart failure and inflammation of the myocardium as LXR acts as inflammatory regulatory factor. The aim of this study was to investigate the effect of our experimental condition on the expression of LXR $\alpha\beta$  nuclear receptor in cardiac and skeletal muscle to evaluate if the mechanism of action of this herbal medicine is potentiated in some of our experimental conditions. Adult female mice were divided into four groups (n = 5 / group) as follow: LPCD: control diet and intake of green tea, by gavage, at a concentration of 0.2g /kg /day during the light phase of the day; DPCD: control diet and green tea intake in the dark phase of the day; LPHGD: hyper caloric diet and green tea intake during the light phase of the day; DPHGD: hyper caloric diet and green tea intake in the dark phase of the day. The hearts and skeletal muscles were collected after a 20 days experimental period. The expression of the nuclear receptor LXR $\alpha\beta$  was evaluated into the 4 experimental groups by Western blot. The results showed that LXR $\alpha\beta$  was expressed in both tissue types in the 4 experimental groups. But there was a decrease in the expression of this receptor in cardiac muscle of animals submitted to a high calorie diet and green tea intake in the light phase of the day. Therefore, we conclude that the quality of food as well as the timing of green tea intake seems to influence the effects of this herbal on the LXR $\alpha\beta$  expression in cardiac muscle.

**Keywords:** Circadian cycle; Green tea; Cardiac muscle; Skeletal muscle; LXR $\alpha\beta$  receptor.

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. Ciclo circadiano.....	11
1.2. <i>Camellia sinensis</i> (chá-verde).....	12
1.3. Receptor nuclear LXR $\alpha\beta$ .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. Delineamento Experimental .....	16
3.2. Extração de proteínas totais e ImunoBlot.....	18
3.3. Quantificação do tamanho das bandas detectadas por WB e análises estatísticas .....	18
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
4.1. Músculo estriado cardíaco .....	20
4.2. Músculo estriado esquelético.....	21
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>25</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Ciclo circadiano

O ciclo circadiano (CC) é constituído como um relógio biológico interno, responsável por controlar atividades diárias perceptíveis e, também, não perceptíveis como os horários de alimentação, tempo de vigília e sono (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003). O CC é, portanto, caracterizado como uma série de ciclos biológicos que acontecem em torno de 24 horas e podem ser eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais importantes para sobrevivência. Este ciclo é controlado por sincronizadores externos, como a luz, a alimentação, entre outros, mas também persiste sem estas pistas ambientais, o que também os caracteriza como ritmos gerados endogenamente. A ordem temporal interna é dada pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo. Este núcleo está localizado bilateralmente na base do hipotálamo e recebe informações de luminosidade do ambiente pelo feixe nervoso retino-hipotalâmico. A partir dessas informações o núcleo supraquiasmático trabalha como relógio mestre que fornece sinais para uma sincronização temporal interna com o mundo externo (MOORE; EICHER, 1972; WEAVER, 1998).

Os seres humanos têm extensos períodos de sono, exibindo fortes diferenças metabólicas entre dia e noite, o que afeta principalmente o estado de alerta e repouso do corpo humano (FOSTER; KREITZMAN, 2007). Os ciclos circadianos agem livremente mesmo quando o indivíduo não tem o conhecimento das horas do dia, e não são somente modulações de reações químicas internas no organismo, mas sim resultado de sua associação com os reguladores externos do organismo (MENNA-BARRETO; MARQUES, 2002). Ao amanhecer, por exemplo, a glândula adrenal secreta grande quantidade de cortisol para dar início ao estado de alerta do organismo. Quando o indivíduo está em estado de sonolência, o mesmo apresenta alterações de humor e comportamento (ALMONDES, 2006).

## 1.2. *Camellia sinensis* (chá-verde)

A *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze é um arbusto da família Theaceae conhecida popularmente por chá verde, chá-da-Índia, banchá ou “green tea”. As folhas possuem compostos polifenólicos (LIANG et al., 2001). As catequinas correspondem a aproximadamente 26,7% dos compostos presentes no chá verde e, dentre estas, 11% são galato-3-epigalocatequina, 10% epigalocatequina, 2% galato-3-epicatequina, 2,5% epicatequina, e 15% polifenóis não identificados (SCHIMTZ et al., 2005). Os principais compostos químicos terapêuticos do material vegetal *C. sinensis*, são potentes antioxidantes de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação (FIORINI et al., 2005; KALRA et al., 2005), anti-inflamatórios (NAG-CHAUDHURI et al., 2005); antimicrobianos (YAM et al., 1997); (TURCHETTI et al., 2005), inibidores da enzima conversora de angiotensina (BARBOSA-FILHO et al; 2006), auxiliam na prevenção da osteoporose (DAS et al., 2004) e podem contribuir na prevenção de câncer (HALDER et al., 2005; SENGER et al., 2010). As catequinas, em particular, desempenham papel importante no controle do tecido adiposo, principalmente pela regulação que a galato-3-epigalocatequina exerce sobre algumas enzimas relacionadas ao anabolismo e catabolismo lipídico (SENGER et al., 2010).

Um estudo recente que utilizou tratamento com cápsulas contendo polifenóis de chá-verde (GTP) administradas para pacientes com nefropatias provocadas pelo diabetes demonstrou que tratamento com esses princípios reduziu a albuminúria por meio da diminuição da taxa de apoptose dos podócitos renais, promovida pela ativação da via WNT (BORGES et al., 2016).

O chá verde também é usado na indústria de bebidas, sendo, portanto, necessária à sua caracterização farmacognóstica (DUARTE; MENARIN, 2006).

## 1.3. Receptor nuclear LXR $\alpha\beta$

Os LIVER X RECEPTOR (LXRs) incluem duas isoformas de LXR altamente homólogos (LXR $\alpha$  e LXR $\beta$ ). São fatores de transcrição ativados por ligantes que pertencem à superfamília de receptores nucleares. LXR $\alpha$  é

altamente expresso em tecidos metabolicamente ativos, tais como o fígado, rim, tecido adiposo, e intestinos. LXR $\beta$  é expresso igualmente em todo o corpo (CALKIN; TONTONNOZ, 2012). Este receptor nuclear 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 a excreção biliar (BETOWSKI; SEMCZUKB, 2010). Além disso, LXR $\alpha\beta$  também participa dos processos de defesa anti-inflamatória de alguns tipos celulares, pois atua como modulador da resposta anti-inflamatória e no metabolismo de lipídios em macrófagos, podendo reduzir a inflamação ligada à obesidade (FREEMAN; MOORE, 2003; YOO et al, 2011).

Devido a estas funções, o LXR $\alpha\beta$  tem se tornado um alvo em potencial para a farmacologia, e poderá ser usado para combater doenças cardiovasculares, metabólicas e musculares devido a sua capacidade de atenuação da resposta inflamatória e sua capacidade de metabolizar lipídios (IM; OSBORNE, 2011).

A ação do LXR $\beta$  no músculo cardíaco não se dá da mesma forma como no corpo como um todo, pois sua ação oxidativa de lipídios impede insuficiência cardíaca e também combate a inflamação no miocárdio, já que o LXR também apresenta fatores de regulação inflamatória. Além disso, existem vias regulatórias que agem contra o diabetes do tipo II, que pode causar doenças miocárdicas (DCM). Estudo recente vem demonstrando que a utilização de agonistas do receptor LXR, como a proteína GW3965, exibe uma função de proteção contra DCMs controlando a resistência à insulina, modulando as vias das quinases AKT e MAP e, também, reduzindo o stress oxidativo e a resposta inflamatória no músculo cardíaco (HE et al., 2014).

Em outro experimento que também utilizou o GW3965 como agonista de LXR por um período prolongado foi observado um aumento dos triglicerídeos (TG) no fígado, mas surpreendentemente a concentração de TG séricos apresentou-se reduzidas, provavelmente através da ativação da lipase sérica. Ação desse tratamento crônico com GW3965 promoveu também uma redução do nível de TG no musculo esquelético e também se notou o aumento de gasto energético, observando um controle da oxidação lipídica neste tecido. O LXR pode ser essencial no equilíbrio lipídico entre os tecidos tendo assim um

controle adequado do fluxo de energia. E mais importante, mostrou-se no estudo que o tratamento crônico tornou o músculo esquelético o tecido alvo para o GW3965 e o LXR, ao contrário do tratamento agudo, que tem como alvo o fígado. No músculo esquelético o LXR está ligado à metabolização de triglicerídeos séricos, e também no transporte de lipídios que serão utilizados como energia por diversos tecidos, ou então na metabolização deste lipídio (GUSTAFSSON; KORACH-ANDRÉ, 2013).

No presente trabalho submetemos camundongos fêmeas a diferentes regimes alimentares (dieta normal e dieta hipercalórica) e administramos chá-verde em diferentes momentos do dia (período claro e período escuro) para estes mesmos animais.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de nossa condição experimental sobre a expressão do receptor nuclear LXR $\alpha\beta$  nos tecidos musculares cardíaco e esquelético para avaliar se o mecanismo de ação deste fitoterápico altera a quantidade deste receptor nuclear nestes tecidos em alguma de nossas condições experimentais, afetando conseqüentemente o metabolismo geral de lipídios nos mesmos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

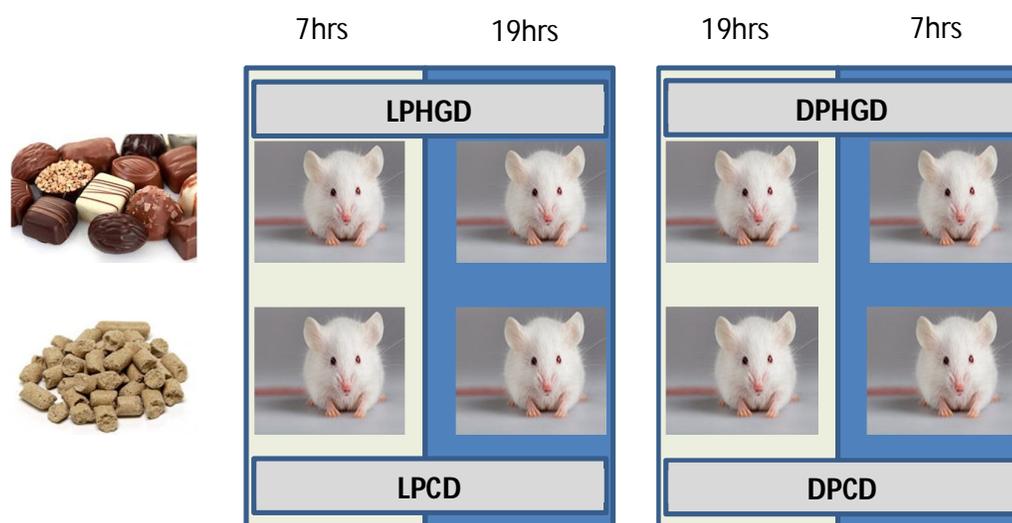
Para a realização do experimento, foram utilizados 20 camundongos suíços fêmeas com idade entre quatro e seis meses, e que foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC) em Bauru, São Paulo, Brasil. Durante os experimentos os animais foram tratados de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Prática para Cuidado e Utilização de Animais, ou DBCA (2013), sob normatização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram mantidos em gaiolas com comida e água que foram oferecidas à vontade, em uma temperatura controlada (entre 21° a 25°C) e com um ciclo de 12:12 horas, claro:escuro. Para a coleta de material biológico os animais passaram por eutanásia através da injeção de barbitúricos, seguido de deslocamento cervical. Todos os procedimentos utilizados para a eutanásia foram consistentes com as Orientações Práticas de Eutanásia do CONCEA. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal e Educação da Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB – USP) pelo protocolo. No. 004/2013.

#### 3.1. Delineamento Experimental

Os 20 camundongos foram separados em 2 grupos (n=10/grupo) por 7 dias para um período de aclimatação, seguido de 20 dias de início do experimento. Um dos grupos foi alimentado com uma dieta controle, e o outro com uma dieta enriquecida com glicose ( $\cong +2500\text{Kcal/Kg}$ ). Houve ingestão diária de ração e os dados de peso e glicemia dos animais foram mensurados semanalmente, desde o período de aclimatação. Após este período os animais foram divididos em 4 grupos (n=5/grupo) LPCD (Light phase control diet): dieta controle e administração de chá verde uma hora depois das luzes se acenderem; DPCD (Dark phase control diet): dieta controle e administração do chá verde uma hora após as luzes se apagarem; LPHGD (Light phase high glucose diet): dieta hipercalórica com administração do chá verde uma hora após as luzes se acenderem; DPHGD (Dark phase high glucose diet) : dieta

hipercalórica com administração de chá verde uma hora após as luzes se apagarem (Figura 1). O tratamento com chá verde foi feito por meio de gavagem, durante 20 dias. A dosagem e a concentração do extrato de chá verde foram calculadas de acordo com Valenzuela (2004) e Khan e Mukhtar (2007), sendo administrados um total de 0,2g/Kg/dia.

**Figura 1:** Composição dos grupos experimentais. Os grupos DP indicavam os camundongos que estavam em uma sala onde o fotoperíodo estava invertido quando comparado ao fotoperíodo normal (luzes se apagavam às 7h e se acendiam às 19h); os grupos LP indicavam os camundongos que estavam em uma sala com fotoperíodo convencional (luzes se acendiam às 7h e se apagavam às 19h); os grupos CD indicavam camundongos que estavam recebendo ração controle; e os grupos HGD indicavam os grupos que estavam recebendo ração acrescida de glicose.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No final do período experimental os animais foram eutanasiados, e os tecidos (tecido muscular cardíaco e tecido muscular esquelético) foram coletados e preparados para análises específicas.

### 3.2. Extração de proteínas totais e *ImunoBlot*

Os fragmentos dos tecidos muscular cardíaco e esquelético foram homogeneizados em 1000 $\mu$ l de RIPPA Buffer contendo inibidores de protease (1M NaF, coquetel completo de inibidores, e 0,1M PMFS), depois os produtos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido após a centrifugação e as proteínas totais extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). As proteínas foram diluídas em RIPPA Buffer com inibidores para homogeneização das quantidades e, posteriormente, foram diluídas em *Laemmli* Buffer e estocadas a -20°C até seu uso.

Para o ensaio de *ImunoBlot* foram utilizados aproximadamente 25 $\mu$ g de proteína contida em um 'pool proteico' de cada grupo experimental. As amostras de cada grupo experimental foram separadas em um gel de 10% poliacrilamida-SDS, e transferida para uma membrana nitrocelulose por *electroblotting*. Posteriormente, as membranas foram lavadas em PBST e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em leite a 5% PBST para bloquear as bandas não específicas. Após a incubação as membranas foram novamente lavadas com PBST e incubadas nos anticorpos primários: (a) LXR $\alpha$  $\beta$  (H-7): sc-377260 na diluição 1:500; e (b) Tubulina T5168 (Sigma-Aldrich®), em diluição 1:8000, para controle da reação. Os anticorpos estavam diluídos em leite a 5% PBST e foram incubados *overnight* a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas com PBST novamente e foram incubadas com anticorpo secundário Rabbit anti-mouse 616520 (Invitrogen®), na diluição 1:4000, por uma hora em temperatura ambiente. Finalmente as membranas foram lavadas em PBST, foram secas com papel filtro e estavam prontas para serem reveladas.

### 3.3. Quantificação do tamanho das bandas detectadas por WB e análises estatísticas

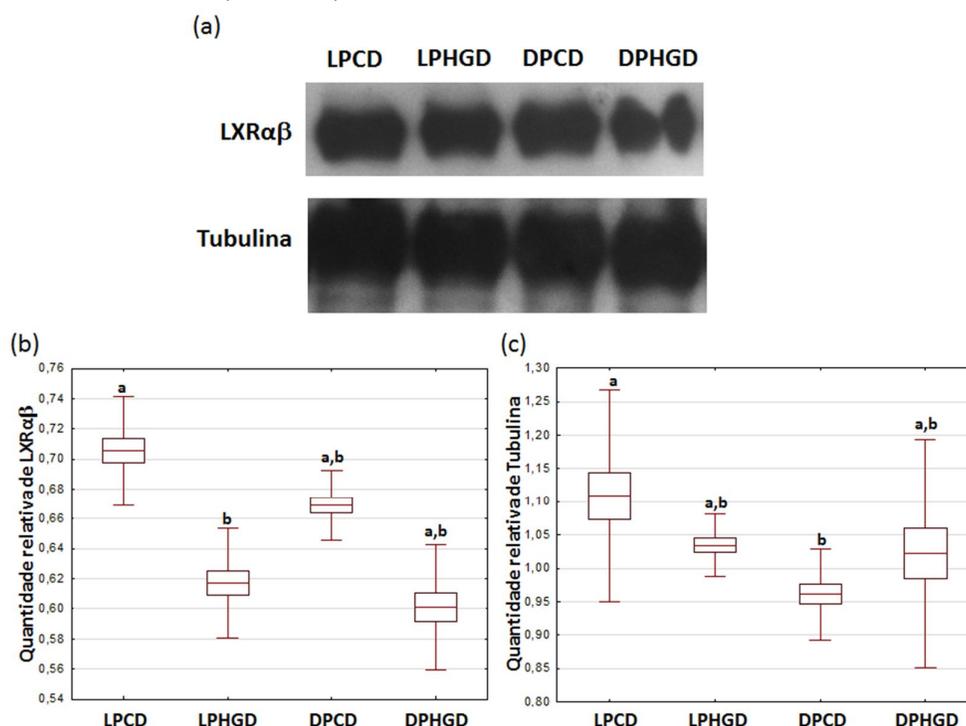
Os tamanhos das bandas formadas na detecção por WB foram mensurados com auxílio do programa *Image J – Image Processing and Analysis in Java, Versão 1.51e* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Posteriormente à análise do tamanho das bandas em área, foi realizado o teste estatísticos pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA, utilizando o software *StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10*. As análises estatísticas foram baseadas em Zar (1999).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Músculo estriado cardíaco

Ao analisar a expressão do receptor LXR $\alpha\beta$  em amostras de proteínas totais de cada um dos grupos do presente trabalho (Figura 2a) é possível notar que entre os animais que receberam chá-verde na fase clara do dia, o grupo dos animais alimentados com dieta acrescida de glicose apresentou uma redução na expressão desse receptor (Figura 2b). Já as análises realizadas nas amostras dos animais que receberam chá-verde na fase escura do dia não exibem diferenças no padrão de expressão deste receptor entre os grupos alimentados com os dois tipos de dieta (Figura 2b). Essa variação na expressão de LXR $\alpha\beta$  entre os grupos LPCD e LPHGD pode ser comprovada pela observação da expressão da proteína controle Tubulina, visto que não há diferença entre a expressão de Tubulina entre os grupos LPCD e LPHGD (Figura 2c).

**Figura 2:** Expressão do receptor e LXR $\alpha\beta$  e de Tubulina nos quatro diferentes grupos experimentais em músculo estriado cardíaco. (a) *Imunoblot*. (b) Comparação da quantidade relativa de LXR $\alpha\beta$ . (c) Comparação da quantidade relativa de Tubulina. (P= 0,05)

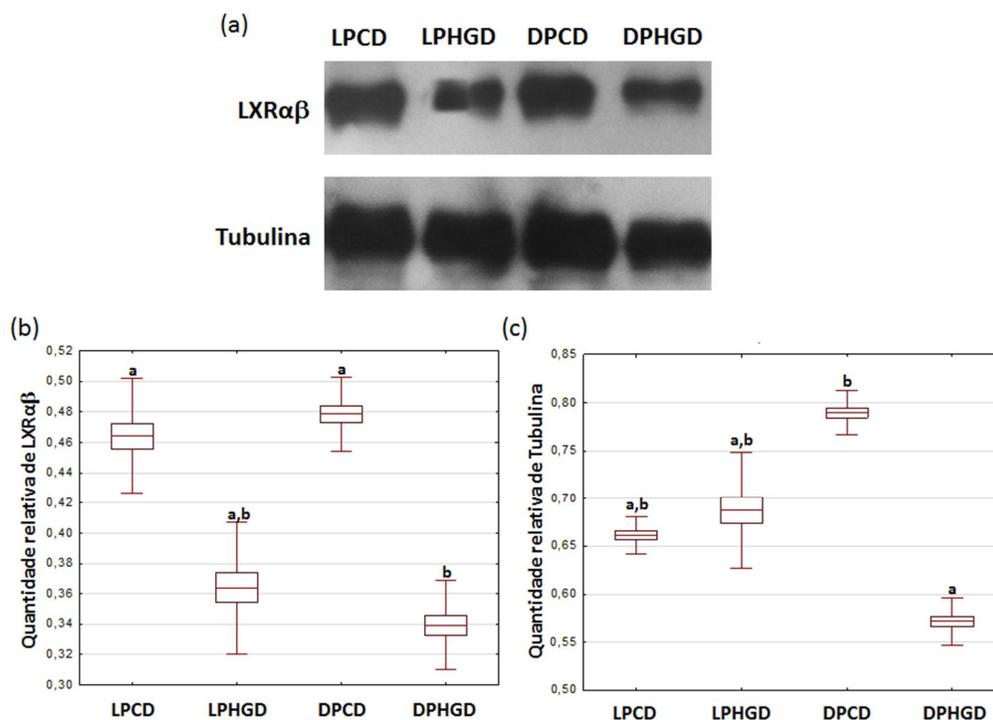


Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.2. Músculo estriado esquelético

Não foram detectadas variações no padrão de expressão do receptor LXR $\alpha\beta$  nas amostras de proteínas totais provenientes do músculo estriado esquelético extraídas dos quatro grupos experimentais do presente trabalho (Figura 3a). Apesar de ser possível uma detecção visual da queda na expressão do receptor nas amostras do grupo DPHGD quando comparada às amostras do grupo DPCD (Figura 3b), tal queda não é sustentada visto que a mesma queda de expressão é observada para a proteína controle Tubulina (Figura 3c).

**Figura 3:** Expressão do receptor e LXR $\alpha\beta$  e de Tubulina nos quatro diferentes grupos experimentais em músculo estriado esquelético. (a) *Imunoblot*. (b) Comparação da quantidade relativa de LXR $\alpha\beta$ . (c) Comparação da quantidade relativa de Tubulina. (P=0,05)



Fonte: Elaborada pelo autor

## 5. DISCUSSÃO

A utilização dos receptores da família LXR vem sendo amplamente testada com potenciais alvos para tratamento de diabetes e síndromes metabólicas devido ao efeito desses receptores sob a tolerância a glicose e resistência à insulina (GREFHORST et al., 2005 *apud* CANNON et al., 2016). Em experimentos com camundongos transgênicos (*Lxra-Tg*), cuja expressão elevada de LXR $\alpha$  estava restrita ao tecido cardíaco, foi detectada a participação desse receptor no controle da progressão de hipertrofia ventricular causada por dietas acrescidas de glicose, além da sua participação no aumento da resistência à glicose e na sinalização do peptídeo natriurético durante as fases iniciais do desenvolvimento de cardiopatia associada ao diabetes (CANNON et al., 2016). Outro experimento utilizando modelos animais com hipertrofia cardíaca induzida por constrição da aorta transversa e tratados com agonista de LXR demonstrou que LXR bloqueia a super regulação de genes associados com fibrose e hipertrofia, além de inibir a sinalização via *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ )–Smad2/3 (CANNON et al., 2015).

É conhecido que muitos polifenóis que são amplamente consumidos, como as catequinas e epigalocatequinas do chá-verde, resveratol e curcumina possuem a capacidade de modular muitas vias de sinalização, incluindo as vias da proteína quinase ativada-AMP (AMPK), *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ), *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$*  (C/EBP $\alpha$ ), *PPAR gamma activator 1-alpha* (PGC-1 $\alpha$ ), *sirtuin 1* (SIRT1), *sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1c), *uncoupling proteins 1 and 2* (UCP 1 e 2) e *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), que são fatores que regulam a adipogênese, possuem ação antioxidante e participam de respostas anti-inflamatórias (WANG et al., 2014), assim como o LXR.

Em nosso modelo experimental foi possível verificar que sob a influência de dieta hipercalórica, somente os animais que consumiram infusão de chá-verde na fase escura do dia apresentaram a manutenção de índices elevados de LXR no músculo cardíaco, indicando a ação protetora contra distúrbios

cardíacos mesmo consumindo dieta hipercalórica. A queda na expressão de LXR no músculo cardíaco de animais que consumiram dieta hipercalórica e receberam infusão de chá-verde na fase clara do dia demonstra que sob essas condições existe maior propensão para desenvolvimento de anomalias na fisiologia cardíaca. Ácidos graxos são a maior fonte de energia para o coração e distúrbios na utilização circadiana destes metabólitos podem resultar em alterações na função cardíaca. Cardiomiócitos apresentam uma série de oscilações circadianas em inúmeros programas gênicos envolvidos, por exemplo, no metabolismo de glicogênio e metabolismo de triglicerídeos (DUEZ; STAELS, 2010). O consumo de dieta acrescida de glicose deve afetar negativamente as vias de síntese e ação dos receptores nucleares relacionados com a metabolização energética neste tecido, e o consumo de chá-verde durante a fase clara do dia não demonstraram efeito na manutenção desta via de metabolização evidenciado pela redução da expressão LXR $\alpha$  $\beta$ , indicando que este evento deve estar sob controle circadiano. A via exata de interação entre esses componentes ainda precisa ser investigada.

O músculo estriado esquelético exibe um papel importante na manutenção da homeostase metabólica e, também, no balanço energético do organismo devido à sua grande massa e também ao seu requerimento de energia total. Em tecidos metabolicamente ativos LXR $\alpha$  e LXR $\beta$  agem como sensores de colesterol celular, ligando-se a oxisteróis e estimulando a lipogênese por meio do aumento da expressão de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos (CATON et al., 2011). Experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando músculo esquelético têm demonstrado que LXR aumenta a expressão de fatores que participam do metabolismo energético deste tecido, como SREBP-1 (MUSCAT et al., 2002) e *stearoyl-CoA desaturase* (SCD1) (COZZONE et al., 2006), respectivamente.

No músculo esquelético o LXR está ligado à metabolização de triglicerídeos séricos, e também no transporte de lipídios que serão utilizados como energia por diversos tecidos, ou então na metabolização deste lipídio (GUSTAFSSON; KORACH-ANDRÉ, 2013), permitindo a conclusão de níveis elevados de LXR neste tecido poderiam promover o acúmulo deste metabólito em outros tecidos/órgãos alvos, como por exemplo, o fígado e vasos sanguíneos, gerando um efeito secundário indesejável. Em nosso modelo

experimental não foram detectadas alterações na expressão de LXR $\alpha\beta$  no tecido muscular estriado esquelético nas amostras de nenhum dos grupos experimentais, indicando que o status nutricional do animal, bem como o horário de consumo de infusão de chá-verde, não possuiu influência aparente nas vias de síntese desse receptor nuclear. Outros estudos utilizando modelos animais já apresentaram a ação das catequinas do chá-verde nas vias de oxidação lipídica e energética, das quais o LXR $\alpha\beta$  também participa, em musculo esquelético, como por exemplo, a diminuição da absorção de glicose, diminuição da expressão de genes lipogênicos, aumento da oxidação de gordura e diminuição do stress oxidativo (como revisado por WANG et al., 2014). Como nossos resultados não demonstraram diferenças na quantidade de LXR $\alpha\beta$  em nenhum dos grupos experimentais, esses dados podem indicar mecanismos de síntese e ação LXR diferenciais neste tipo de tecido.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final do presente estudo, podemos concluir que, a interação da proteína LXR $\alpha\beta$  em nosso organismo tem importância na regulação dos processos inflamatórios, além da metabolização de lipídios e glicose. O receptor LXR $\alpha\beta$  expressasse em todos os tecidos do organismo, e auxilia nos processos metabólicos. Quando em níveis normais traz somente benefícios ao indivíduo, mas o excesso ou a falta dessa proteína pode fazer com que o corpo sofra com alterações no metabolismo. A ingestão de um chá feito com a *Camellia sinensis* não promoveu o aumento dessa proteína no organismo, mas para os animais que consumiram dieta hipercalórica e consumiram a infusão de chá-verde na fase clara do dia (LPHGD) observou-se uma queda em sua expressão. Tal observação nos permite concluir que sob dieta hipercalórica, a ingestão de chá-verde na fase clara do dia, não mantém os níveis da expressão desse receptor nuclear, o que não seria interessante para o indivíduo que busca auxílio no tratamento de doenças cardiovasculares, derivadas ou não de diabetes ou alto colesterol.

Portanto, podemos concluir que a expressão e a ação do receptor nuclear LXR $\alpha\beta$  é um evento que está sob comando dos ciclos circadianos e depende da composição da dieta ingerida, além de ser tecido-específico.

## Referências Bibliográficas

ALMONDES, K.M. Time in psychology: the contribution of the chronobiological view to the biological, psychological and social comprehension of health.

**Psicologia Ciências e Profissão**, v.26 n.3, p.352-359, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M., MARTINS V.K., RABELO, L.A., MOURA, M.D., SILVA M.S., CUNHA E.V.L., SOUZA, M.F.V., ALMEIDA, R.N., MEDEIROS, I.A.

Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980- 2000. **Revista Brasileira de Farmacognóstica**, v.16, n.3, p.421-446, 2006.

BETOWSKI, J., SEMCZUK, A. Liver X receptor (LXR) and the reproductive system- a potential novel target for therapeutic intervention. **Pharmacological Reports**, v.62, n.1, p. 15-27, 2010.

BORGES, C.M., PAPADIMITRIOU, A., DUARTE, D.A., FARIA, J.M.L., FARIA, J.B.L. The use of green tea polyphenols for treating residual albuminuria in diabetic nephropathy: A double-blind randomised clinical trial **Scientific Reports** v.20, n.6 p. 28282, 2016.

CALKIN, A.C., TONTONAZ, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v.13, n, p. 213–224, 2012.

CANNON, M.V., SILLJÉ, H.H.W., SILJBESMA, J.W.A., KHAN, M.A.F., STEFFENSEN, K.R., GILST, W.H.V., BOER, R.A. LXR $\alpha$  improves myocardial glucose tolerance and reduces cardiac hypertrophy in a mouse model of obesity-induced type 2 diabetes, **Diabetologia**, v 59, n 3, p 634-43, 2016.

CANNON, M.V., YU, H., CANDIDO, W.M., DOKTER, M.M., LINDSTEDT, E., SILLJÉ, H.H.W. VAN GILST, W.H., BOER, R.A. The liver X receptor agonist AZ876 protects against pathological cardiac hypertrophy and fibrosis without lipogenic side effects. **European Journal of Heart Failure**, v.17, n.3, p. 273-282, 2015.

CATON, P. W., HOLNESS, M.J., BISHOP-BAILEY, D., SUGDEN, M.C. PPAR $\alpha$ -LXR as a novel metabolostatic signalling axis in skeletal muscle that acts to optimize substrate selection in response to nutrient status. **The Biochemical Journal**, v.437, n.3, p.521-530, 2011.

CHAUDHURI, A.K.N; KARMAKAR, S; ROY, D; PAL, S; PAL, M; SEM, T. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (Sikkim variety). **Pharmacological Research**, v.51, n.2, p.169-175, 2005.

COZZONE, D., DEBARD, C., DIF, N., RICARD, N., DISSE, E., VOUILLARMET, J., RABASA-LHORET, R., LAVILLE, M., PRUNEAU, D., RIEUSSET, J., LEFAI, E., VIDAL, H. Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. **Diabetologia**, v.49, n.5, p.990–999, 2006.

DAS, A.S., MUKHERJEE, M., MITRA, C. Evidence for a prospective anti-osteoporosis effect of black tea (*Camellia sinensis*) extract in a bilaterally ovariectomized rat model. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 13, n.2, p. 210-216, 2004.

DUARTE, M.R., MENARIM, D.O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.545-51, 2006.

Duez, H., STAELS B. Nuclear receptors linking circadian rhythms and cardiometabolic control. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.30, n.8, p. 1529-1534, 2010.

FIORINI, R.N., DONOVAN, J.L., RODWELL, D., EVANS, Z., CHENG, G., MAY, H. D., MILIKEN, C.E., MARKOWITZ, J.S., CAMPBELL, C., HAINES, J.K., SCHMIDT, M.G., CHAVIN, K.D. Short-term administration of (-)-pigallocatechin-gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. **Liver Transplant**, v.11, n.3, p.298-308, 2005.

FOSTER, R., KREITZMAN, L. I ritmi della vita. Gli orologi biologici che controllano l'esistenza di ogni essere vivente, v.2, p. 357, 2007.

FREEMAN, M. W., MOORE, K. J. eLiXiRs for restraining inflammation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 2, p. 168-169, 2003.

GUSTAFSSON, J.A., KORACH-ANDRÉ, M. Skeletal muscle as a target of LXR agonist after long-term treatment: focus on lipid homeostasis. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, v.306, n.5, p.494-502, 2013.

HALDER, A., RAYCHOWDHURY, R., GOSH, A., DE, M. Black tea (*Camellia sinensis*) as a hemopreventive agent in oral precancerous lesions. **Journal of**

**Environmental Pathology and Toxicological Oncology**, v.24, n.2, p.141-4, 2005.

HE, Q., PU, J., YUAN, A., YAO, T., YING, X., ZAO, Y., XU, L., TONG, H., HE, B. Liver X receptor agonist treatment attenuates cardiac dysfunction in type 2 diabetic db/db mice. **Cardiovascular Diabetology**, v.13 p. 149, 2014.

IM, S.S., OSBORNE, T.F. Liver x receptors in atherosclerosis and inflammation. **Circulation Research**, v.108, n.8, p.996–1001, 2011.

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

KALRA, N., PRASAD, S., SHUKLA, Y. Antioxidant potential of black tea against 7,12-dimethylbenz(a) anthracene induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Journal of Environmental Pathology and Toxicological Oncology**, v.24, n.2, p.105-114, 2005.

LIANG, Y., MA, W., LU, J., WU, Y. Comparison of chemical compositions of *Ilex latifolia* Thumb and *Camellia sinensis* L. **Food Chemistry**, v.75, n.3, p.339-343, 2001.

MARQUES, N., MENNA-BARRETO, L. Cronobiologia: princípios e aplicações, v.12 n.3 p. 321, 2003.

MENNA-BARRETO, L., MARQUES, N. O tempo dentro da vida, além da vida dentro do tempo. **Ciencia e Cultura**, v.54 n.2 p.44-6, 2002.

MOORE, R.Y., EICHER, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Research**, v.42, n.1, p.201-206, 1972.

MUSCAT, G. E., WAGNER, B. L., HOU, J., TANGIRALA, R. K., BISCHOFF, E. D., ROHDE, P., PETROWSKI, M., LI, J., SHAO, G., MACONGREY, G. and SCHULMAN, I. G. Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.43, p. 40722 – 40728, 2002.

SANTOS, C.B.; BERNARDINO, G.Z.; SOARES, F.J.; ESPINDOLA, J.D.; ARRUDA, P.M.R.; PAULA, J.R.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T.F. Preparo e caracterização de tinturas das folhas de chá verde [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] Theaceae, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. vol.16 n.4 p. 826-831, 2014.

SCHMITZ, W., SAITO, A.Y., ESTEVÃO, D., SARIDAKIS, H.O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 26, n. 2, p.119-130, 2005.

SENGER, A. E.V.; SCHWANKE, C.H. A.; GOTTLIEB, M.G.V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**. v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

TURCHETTI, B., PINELLI, P., BUZZINI, P., ROMANI, A.,HEIMLER, D.,FRANCONI, F., MARTINI, A. In vitro antimycotic activity of some plant

extracts towards yeast and yeast-like strains. **Phytotherapy Research**, v.19, n.1, p.44-49, 2005.

VALENZUELA, A. El consumo te y lasalud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. **Revista Chilena de Nutrición**. Santiago, v.31, p. 72-82,ago, 2004.

WANG, S., MOUSTAID-MOUSSA, N., CHEN, L., MO, H., SHASTRI, A., SU, R., BAPAT, P., KWUNS, I., SHEN, C. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.25, n.1, p.1-18, 2014.

WEAVER DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. **Biology Rhythms**, v.13, n.2, p.100-112, 1998.

YAM, T.S., SHAH, S., HAMILTON-MILLER J.M.T. Microbiological activity of whole and fractioned crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. **FEMS Microbiology Letters**, v.152, n.1, p.169-74, 1997.

YOO, S.W., SAVCHEV, S., SERGOTT, L., REZAI, T., LOPEZ, M.F., WALD, T.V., EATON, J.L., REINDOLLAR, R., USHEVA, A. A Large Network of Interconnected Signaling Pathways in Human Ovarian Follicles is Supported by the Gene Expression Activity of the Granulosa Cells. **Reproductive Sciences**, v. 18, n. 5, p.476-484, 2011.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5.ed. USA: Ed. Prentice Hall., 1999.