

**INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE CHÁ VERDE PROVENIENTE DA PLANTA
Camellia sinensis NO PESO CORPORAL, NO OVÁRIO, NO HEMOGRAMA E
NA BIOQUÍMICA SÉRICA DE RATAS WISTAR SUPEROVULADAS**

CYNTIA MONTEIRO DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE CHÁ VERDE PROVENIENTE DA PLANTA *Camellia sinensis* NO PESO CORPORAL, NO OVÁRIO, NO HEMOGRAMA E NA BIOQUÍMICA SÉRICA DE RATAS WISTAR SUPEROVULADAS

CYNTIA MONTEIRO DOS SANTOS

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

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador (a): Dr^a. Ines Cristina Giometti

| | |
|--------------------|---|
| 636.208 9 S231i | Santos, Cyntia Monteiro dos. Influência da ingestão de chá verde proveniente da planta <i>Camellia sinensis</i> no peso, na reprodução, no hemograma e na bioquímica sérica de ratas Wistar superovuladas / Cyntia Monteiro dos Santos – Presidente Prudente, 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente – SP, 2011. Bibliografia. Orientadora: Ines Cristina Giometti 1. Reprodução Animal. I. Título. |
|--------------------|---|

CYNTIA MONTEIRO DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE CHÁ VERDE PROVENIENTE DA PLANTA *Camellia sinensis* NO PESO CORPORAL, NO OVÁRIO, NO HEMOGRAMA E NA BIOQUÍMICA SÉRICA DE RATAS WISTAR SUPEROVULADAS

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

Presidente Prudente, 20 de Outubro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa
Universidade de São Paulo – USP
São Paulo – SP

Prof^a. Dr^a. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família...

Em especial aos meus pais, Neide e Eurides, que são e sempre serão meu alicerce e minha força. Pai e mãe, esta conquista é por vocês e para vocês.

Também ao meu irmão Rodrigo.

E aos meus sobrinhos Ana Clara e Isaac, anjos que trazem luz e alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, com amor, por sempre me apoiarem e me ajudarem a seguir em frente.

À Prof. Dra. Ines Cristina Giometti, com um carinho enorme, pela orientação não só na área de pesquisa, mas também em vários aspectos pessoais.

Ao coordenador do curso de Mestrado em Ciência Animal Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém, pela ajuda prestada e pelo apoio em momentos difíceis.

À Prof. Dra. Caliê Castilho, pela colaboração no trabalho e pela amizade.

À Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, também por sua colaboração no trabalho e pelo conhecimento compartilhado conosco.

À Prof. Dra. Cecília Braga Laposy, pelo auxílio na realização dos exames.

Ao prof. Dr. Rogério Giuffrida, por sua competência e participação na análise estatística do projeto.

Aos alunos de iniciação científica, Dayane, Érica, Jaqueline, Lorrán e Samuel, pelo comprometimento e dedicação com o trabalho.

A toda a equipe do Biotério Central, pela atenção, sempre prestada a nós.

Ao meu namorado Ariel Dalefe Alves pelo amor, carinho e compreensão em todas as horas.

A todos os meus amigos, verdadeiros irmãos e irmãs que Deus me permitiu escolher, pela paciência e companheirismo.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

E respeitosamente aos animais que doaram suas vidas para que este estudo pudesse ser realizado.

“Ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse amor, eu nada seria”.

1 Coríntios 13:2

RESUMO

Influência da ingestão de chá verde proveniente da planta *Camellia sinensis* no peso corporal, no ovário, no hemograma e na bioquímica sérica de ratas Wistar superovuladas

O chá verde oriundo da planta *Camellia sinensis* é considerado uma bebida saudável, pois está associado a vários benefícios para a saúde, incluindo a prevenção de câncer, doença cardiovascular e osteoporose. As catequinas encontradas em abundância no chá verde possuem ação antioxidativa e bactericida e também atividade anti-tumoral, porém não há estudos demonstrando se o consumo prolongado do chá verde pode interferir no corpo lúteo e nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o peso corporal, o número de corpos lúteos, o hemograma e a bioquímica sérica de ratas Wistar superovuladas, sob ingestão prolongada de chá verde. Para tanto, as ratas foram divididas em dois grupos, controle e tratado com ingestão de chá verde (n=30). O experimento teve duração de três meses e ao final de cada mês, 10 ratas de cada grupo foram superovuladas e sacrificadas, foi realizada, então, a pesagem dos animais e dos ovários, a contagem dos corpos lúteos e a colheita de sangue para os exames laboratoriais. A análise estatística realizada entre os grupos foi o teste t não-pareado com correção de Welch e entre os momentos dentro de cada grupo empregou-se a análise de variância com contrastes pelo método de Tukey, diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$. O consumo prolongado do chá verde por três meses não aumenta o peso dos animais mesmo com maior consumo de ração, também não interfere na resposta ovulatória, porém, aumenta as células de defesa, diminui a creatinina sérica e aumenta o perfil lipídico do sangue em ratas Wistar superovuladas.

Palavras-chave: Lipídeos. Sistema imune. Ovário. Ovulação

ABSTRACT

Influence of intake of Green tea originated from *Camellia sinensis* in the body weight, in the ovary, in the blood cell count and serum biochemistry of female superovulated rats.

The green tea derived from *Camellia sinensis* is considered a healthy drink, because it is associated with many benefits for the health, including the cancer prevention, cardiovascular disease and osteoporosis. The catechins are found abundantly in the green tea and they possess antioxidative, antibacterial and antitumoral activity, however there are not studies demonstrating if the chronic consumption of green tea could interfere in the reproduction and in biochemistry and hematological exams. Thus, the aim of this work is to verify the green tea influence in the weight, in the ovulation rate, in the blood count and in the blood biochemistry of superovulated rats. For that, the rats were divided in two groups, control and treated with green tea (n=30). The experiment had lasted for three months, in the end of which 10 animals of each group were superovulated and sacrificed, after that, animals and the ovaries were weighted, corpora lutea were counted and the laboratorial exams of animals' blood were realized. The chosen statistical analysis was the unpaired t test with Welch's correction and the moments in each group were analyzed by variance analysis with Tukey test, the differences were considered when $p < 0.05$. The chronic consumption of green tea for three months avoid the increase of weight in animals with higher consumption and did not interfere with ovulation rate, but increased immune cells and lipid profile of the blood, and reduced serum creatinine in superovulated Wistar rats.

Keywords: Lipids. Immune system. Ovary. Ovulation

LISTA DE SIGLAS

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Cr - Cromo

CV - Chá verde

dL - Decilitro

EC - epicatequina

ECG - epicatequina galato

eCG - gonadotrofina coriônica equina

EGC - epigalocatequina

EGCG - epigalocatequina galato

g - grama

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG - gonadotrofina coriônica humana

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

Kg - Quiilograma

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LH - Hormônio luteinizante

mg - miligrama

mL - mililitro

mm³ - milímetro cúbico

Mn - Manganês

PMSG - gonadotrofina sérica da égua prenhe

PPT - Proteína Plasmática Total

Se - Selênio

UI - Unidades internacionais

VCM - Volume Corpuscular Médio

VEGF - Fator de crescimento endotélio vascular

VEGFR – Receptor do fator de crescimento endotélio vascular

Zn - Zinco

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 13 |
| 2.1 Chá Verde..... | 13 |
| 2.2 Catequinas..... | 14 |
| 2.3 Efeitos Biológicos do Chá Verde..... | 16 |
| 2.3.1 Efeito cardiovascular..... | 16 |
| 2.3.2 Atividade antioxidante..... | 17 |
| 2.3.3 Ação bactericida..... | 17 |
| 2.3.4 Efeito anti-tumoral..... | 18 |
| 2.3.5 Atividade metabólica..... | 20 |
| 2.3.6 Efeitos na reprodução..... | 21 |
| REFERÊNCIAS..... | 26 |
| 3 ARTIGO CIENTÍFICO..... | 36 |

1 INTRODUÇÃO

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, só perdendo para a água, seu consumo é maior que o do café, do vinho e da cerveja (COSTA; GOUVEIA; NÓBREGA, 2002; RIETVELD; WISEMAN, 2003). Aproximadamente de 76 a 78% de todo o chá produzido e consumido no mundo é chá preto e de 20 a 22% é chá verde (WU; WEI, 2002).

A *Camellia sinensis* é uma planta que tem sido consumida em forma de chás há milhares de anos na Ásia e com o passar do tempo suas propriedades terapêuticas tornaram-se cada vez mais conhecidas e assim tem-se expandindo por outros continentes. Dela se originam vários chás diferentes de acordo com as condições de cultivo, colheita, preparo e acondicionamento das folhas. No entanto, os mais conhecidos derivados dessa planta são os chás branco, preto e verde que diferem no conteúdo dos seus polifenóis (DASHWOOD; ORNER; DASHWOOD, 2002).

O chá verde produzido por um processo de secagem e aquecimento para evitar a oxidação das folhas, contém componentes relativamente simples conhecidos coletivamente como catequinas. O chá verde possui de 30 a 40% mais polifenóis do que o chá preto (que somente tem de 3 a 10%), pois o processo de fermentação do chá preto elimina estas substâncias (DASHWOOD; ORNER; DASHWOOD, 2002). Os polifenóis, tearrubiginas e teaflavinas, predominantes no chá preto, são produzidos pela fermentação de folhas trituradas, sendo mais complexos e pobremente caracterizados (YANG; LANDAU, 2000). O chá branco feito de folhas e botões brancos antes que desabrochem, são cozidos e secos, contem maiores concentrações de catequinas que o chá verde (DASHWOOD; ORNER; DASHWOOD, 2002).

A farmacologia dos chás oriundos da planta *Camellia sinensis* não é restrita ao bem conhecido efeito estimulante do chá, vários estudos têm estabelecido uma positiva correlação entre o consumo do chá verde e a melhora na saúde. Os responsáveis pela atividade biológica dos chás provenientes da planta *Camellia sinensis* são os polifenóis que eles contém (MUKHTAR et al., 1992; SHIRAKI et al., 1994; APOSTOLIDES et al., 1997). As catequinas, componentes químicos dos polifenóis encontrados em abundância no chá, exercem efeitos de proteção vascular,

através de múltiplos mecanismos, incluindo anti-oxidativo, anti-hipertensivo, antiinflamatório, anti-proliferativo, antitrombótico e efeitos de perda lipídica (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997).

Apesar dos benefícios atribuídos ao chá verde desde o início do seu consumo, as investigações científicas desta bebida começaram há apenas algumas décadas atrás (MCKAY; BLUMBERG, 2002). Estudos com animais e estudos *in vitro* demonstram fortes evidências que os polifenóis presentes no chá verde têm importante função na inibição de várias doenças crônicas, especialmente doenças cardiovasculares, câncer e patologias correlacionadas (MCKAY; BLUMBERG, 2002; WU; WEI, 2002; CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006). Em adição, alguns estudos sugerem um impacto benéfico da ingestão de chá verde na densidade óssea, função cognitiva, cáries dentárias, pedras renais e outros vários efeitos (MCKAY; BLUMBERG, 2002; WU; WEI, 2002; CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006).

Portanto, esses dados juntos ressaltam a importância de um conhecimento mais aprofundado das consequências do consumo prolongado do chá verde na saúde.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Chá Verde

O chá verde é principalmente produzido da planta *Camellia sinensis* variedade *sinensis*, pois a variedade *assamica* tem alto conteúdo de polifenóis que tornaria o sabor do chá verde excessivamente amargo (WILLSON, 1999). A produção do chá verde é caracterizada por um processo de aquecimento inicial, que desnatura a enzima polifenol oxidase, que é responsável pela conversão dos flavonóides da folha em componentes polifenólicos escuros que dão a coloração ao chá preto. Outro importante processo na produção do chá verde é o enrolamento, no qual as folhas são cortadas e torcidas. A maior produção do chá verde é na China e no Japão (ZUO; CHEN; DENG, 2002) e os países que mais consomem o chá verde são China, Japão, Coréia e Marrocos (WU; WEI, 2002; ZUO; CHEN; DENG, 2002).

A composição química do chá verde é complexa, as proteínas são 15 a 20% do peso seco, sendo que as enzimas constituem uma importante fração das proteínas e os aminoácidos, como a teanina ou 5-Netilglutamina, ácido glutâmico, triptofano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina e lisina, são 1 a 4% do peso seco do chá. Os carboidratos representam 5 a 7% do peso seco e são celulose, pectinas, glicose, frutose e sucrose. Os lipídeos presentes no chá são os ácidos linoleico e linolênico e esteróides como o estigmasterol. Encontram-se também presentes no chá verde vitaminas B, C e E, bases xânticas como a cafeína e a teofilina, pigmentos como a clorofila e os carotenóides, componentes voláteis (aldeídos, alcoóis, ésteres, lactonas, hidrocarbonetos), minerais e elementos traços (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006).

Os polifenóis constituem o grupo mais interessante dos componentes do chá verde, e em consequência, este chá pode ser considerado uma importante fonte alimentar de polifenóis, particularmente os flavonóides. Os flavonóides são derivados de fenóis sintetizados em quantidades substanciais (0,5 a 1,5%) e grande variedade (mais que 4000 identificados) e estão largamente distribuídos nas plantas (VISON et al., 1995). Os principais flavonóides presentes no chá verde são as catequinas (flavan-3-

ols; MCKAY; BLUMBERG, 2002). O chá verde também contém ácido gálico e outros ácidos fenólicos, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico, e flavonóis como o kaempferol, miricetina e quercetina (USDA, 2003).

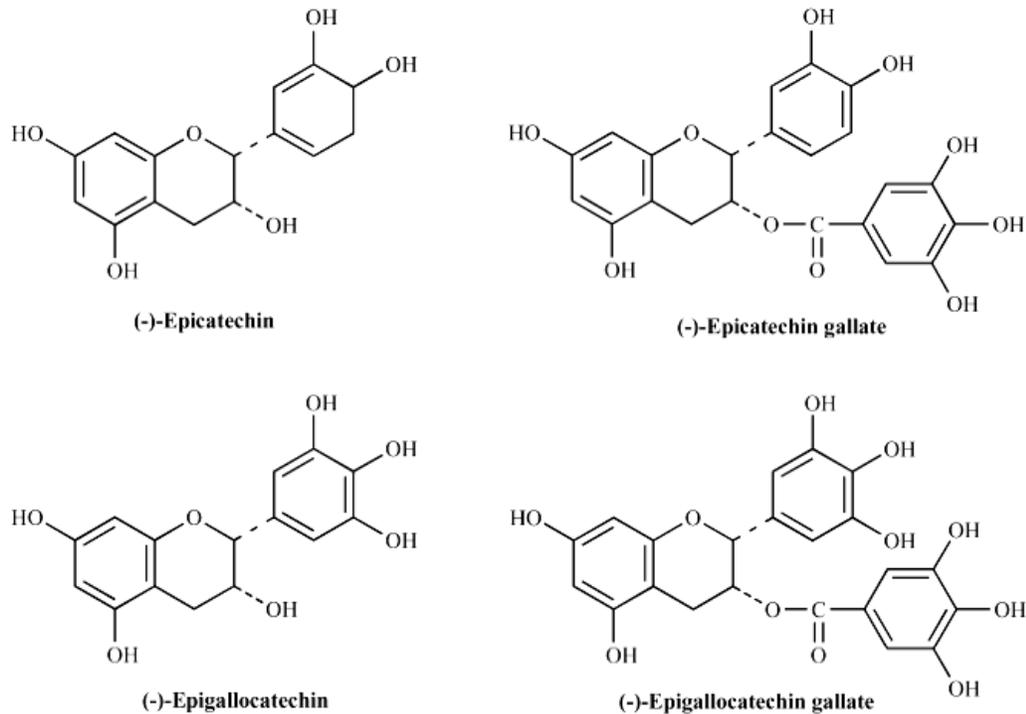
2.2 Catequinas

As catequinas são fitonutrientes da família dos polifenóis encontradas em grande quantidade na planta *Camellia sinensis*, são elas as grandes responsáveis pelos efeitos farmacológicos dos chás feitos com essa planta. Elas são compostos incolores e hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997).

São encontradas quatro catequinas no chá verde, dentre elas, a epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina (EGC) e epigalocatequina galato (EGCG; Figura 1). No chá verde, o conteúdo dessas catequinas é 80 a 90% do total de flavonóides, sendo a EGCG a mais abundante (48-55%) seguida pela EGC (9-12%), ECG (9-12%) e EC (5-7%; BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997; SHAHIDI, 2000).

A quantidade de catequina presente no chá verde depende de como as folhas são processadas e depois secas, certo grau de fermentação e aquecimento das folhas durante o processo de fabricação pode resultar em polimerização dos componentes fenólicos como as catequinas, levando a mudanças conformacionais e então modificando as suas propriedades. Outros fatores que influenciam o conteúdo de catequinas são as condições de crescimento, a localização geográfica (solo, clima, práticas de agricultura e fertilizantes) e também a preparação da infusão (quantidade de produto usado, tempo da infusão e temperatura. (HAKIM; HARRIS; WEISGERBER, 2000; WU; WEI, 2002)).

FIGURA 1 - Estrutura química das catequinas encontradas no chá verde: epicatequina; epicatequina galato; epigalocatequina e epigalocatequina galato



Fonte: (VELAYUTHAM; BABU; LIU, 2008)

McKay e Blumberg (2002) relataram que o processo de descafeinação reduz levemente o conteúdo de catequinas no chá. Preparações instantâneas e geladas de chás prontos para beber também apresentam menor conteúdo de catequinas (HAKIM; HARRIS; WEISGERBER, 2000; ARTS; VAN DE PUTTE; HOLLMAN; 2000). A produção da bebida chá verde em garrafas tem levado a problemas causados pela oxidação das catequinas, tornando o chá marrom (WANG et al., 2003).

Wu e Wei (2002) indicaram que um copo de chá verde (2,5 g de folhas de chá verde/200 mL de água) pode conter 90 mg de EGCG. Independente da região de cultivo e da marca comercial analisada, o chá verde sempre apresenta uma maior quantidade de catequinas, principalmente EGCG e EGC, do que o chá vermelho, o chá preto ou outros chás derivados do chá preto (FERNANDEZ et al., 2002; LIN et al., 2003, CABRERA; GIMÉNEZ; LÓPEZ, 2003). Porém, a grande variação no conteúdo das

catequinas do chá não é levada em consideração na maioria dos estudos epidemiológicos (HENNING et al., 2003).

O potencial efeito para a saúde das catequinas depende não somente da quantidade consumida, mas também da sua biodisponibilidade, por isso, é necessário conhecer a sua atividade biológica nos tecidos alvos (MANACH et al., 2004). A administração de catequinas do chá para ratos e sua identificação na veia porta tem demonstrado que as quatro catequinas são absorvidas pelo intestino (OKUSHIO et al., 1996). As catequinas são rapidamente e extensivamente metabolizadas, estudos em ratos demonstram que a EGCG é principalmente excretada pela bile, enquanto a EGC e a EC são excretadas pela urina e pela bile (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006).

2.3 Efeitos Biológicos do chá Verde

O chá verde é uma bebida popular em algumas partes do mundo e recentemente tem sido reconhecido como uma bebida saudável. As catequinas encontradas em abundância no chá verde, possuem ação vascular, antioxidativa, bactericida, anti-tumoral e metabólica.

2.3.1 Efeito cardiovascular

Experimentos clínicos, epidemiológicos e experimentais têm estabelecido uma positiva correlação entre o consumo do chá verde e a saúde cardiovascular. As catequinas do chá verde exercem efeitos de proteção vascular através de múltiplos mecanismos, incluindo antioxidativo, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anti-proliferativo, anti-trombótico e efeitos de perda lipídica (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997).

As catequinas também regulam o tônus vascular pela ativação do óxido nítrico endotelial (MUKHTAR; AHMAD, 2000), inibem a proliferação das células musculares lisas vasculares por interferir com os fatores de crescimento vasculares (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996) e suprimem a adesão plaquetária, por meio da inibição da trombogênese.

As catequinas do chá verde afetam o metabolismo e previnem o aparecimento de placas ateroscleróticas em vários modelos de hiperlipidemia (KHAN et al., 1992; MIURA et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que as catequinas reduzem o nível de colesterol do sangue e previnem a deposição e/ou acúmulo de colesterol em vários tecidos, incluindo fígado e coração em ratos com hipercolesterolemia (YANG; KOO, 1997; BABU; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2006).

2.3.2 Atividade antioxidante

O chá verde é uma fonte de nutrientes antioxidantes, pois é rico em polifenóis (catequinas e ácido gálico), mas também contém carotenóides, tocoferóis, ácido ascórbico (vitamina C), minerais (Cr, Mn, Se e Zn) e certos componentes fitoquímicos (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006).

As catequinas apresentam atividade antioxidante (STONER; MUKHTAR, 1995) que eficientemente elimina as espécies de oxigênio reativo, por eliminar radicais livres, inibir enzimas pró-oxidantes e induzir enzimas antioxidantes (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001). Cao et al. (1996) demonstraram que o chá verde tem maior atividade oxidante que muitos vegetais, como o alho, repolho, espinafre e couve.

Klaunig et al. (1999) observaram em um estudo com fumantes que o dano oxidativo no DNA, a peroxidação lipídica e a geração de radicais livres foram reduzidos após o consumo de 6 copos por dia de chá verde por sete dias.

2.3.3 Ação bactericida

As catequinas também exibem um amplo espectro anti-bacteriano para bactérias Gram negativas e fungos. A relação entre a catequina e a atividade bacteriana ocorre na seguinte ordem: ECG > EGCG > EGC > EC (Figura 1). Além disso, uma investigação com EGCG revelou que a ação anti-bacteriana é baseada na injúria da membrana da bactéria (IKIGAI et al., 1993).

Matsunaga et al. (2001) demonstraram que a EGCG possui atividade imunomoduladora *in vivo* em modelo de infecção de macrófagos por *Legionella*

pneumophila, com uma inibição do crescimento desta bactéria no interior de macrófagos tratados com ECG.

2.3.4 Efeito anti-tumoral

Estudos conduzidos com sistemas de cultivo celular e modelos animais, bem como estudos epidemiológicos humanos, demonstram que os polifenóis que estão presentes no chá verde poderiam proporcionar proteção contra uma variedade de tipos de câncer (KHAN et al., 1992; XU et al., 1992; WANG et al., 1992; GENSLER et al., 1996; AHMAD et al., 1997; CHEN et al., 1998; RECORD; DREOSTI, 1998; AHMAD; GUPTA; MUKHTAR, 2000; GUPTA et al., 2000; GUPTA et al., 2001; INOUE et al., 2001; SETIAWAN et al., 2001). Alguns estudos também sugerem que estes polifenóis poderiam ser desenvolvidos como agentes terapêuticos para alguns tipos de câncer (GUPTA; MUKHTAR, 2002).

Estudos com animais têm demonstrado que o chá verde inibe a carcinogênese da pele, pulmão, cavidade oral, esôfago, estômago, fígado, rim, próstata e outros órgãos (INOUE et al., 1998; BIANCHI et al., 2000; WU; WEI, 2002; YAMAMOTO et al., 2003; LAURIE et al., 2005). A inibição está correlacionada com um aumento na apoptose das células tumorais e a diminuição na proliferação celular (MITTAL et al., 2004).

Um importante fato em favor do uso do chá verde contra o câncer de próstata é que a incidência desta doença é muito baixa na população asiática, na qual em adição a dietas ricas em fibras e pobres em gordura regularmente consomem o chá verde (MUIR et al., 1987). Apesar destes estudos serem correlacionados e muitas observações epidemiológicas nutricionais são inconclusivas, os dados de laboratórios sugerem que os polifenóis presentes no chá verde podem possuir um efeito quimiopreventivo contra o câncer de próstata em humanos. Ao menos dois estudos epidemiológicos (HEILBRUN; NOMURA; STEMMERMANN, 1986; JAIN et al., 1998) demonstram que as pessoas que regularmente consomem o chá tem uma menor incidência de câncer de próstata.

Adhami et al. (2003) demonstraram por meio de sistemas de cultivo celular que o polifenol, EGCG, induz apoptose, inibição do crescimento celular e desregulação do ciclo celular e provavelmente, por isso, inibe o crescimento das células tumorais. Pela técnica de microarranjo de DNA, foi possível demonstrar que o tratamento de células com EGCG resulta em indução de genes que funcionalmente exibem efeitos inibitórios de crescimento e repressão de genes que pertencem ao caminho de sinalização celular mediado pela proteína G (ADHAMI; AHMAD; MUKHTAR, 2003). Yang et al. (1998) demonstraram que as catequinas EGCG e EGC tem efeito na indução da apoptose e na inibição do crescimento tumoral em células tumorais de pulmão humanas.

Além disso, a EGCG diminui a expressão gênica da proteína quinase C (PKC; ADHAMI; AHMAD; MUKHTAR, 2003). A PKC está envolvida em diversas funções de divisão celular como diferenciação, controle de crescimento, promoção tumoral e morte celular (LIVNEH; FISHMAN, 1997).

A EGCG é conhecida por inibir o crescimento tumoral por meio da inibição de VEGF (JUNG et al., 2001; SARTIPPOUR et al., 2002). A alimentação oral de camundongos com polifenóis isolados do chá verde, como única fonte de líquidos, inibe a expressão de genes correlacionados com angiogênese como o VEGF, e aqueles relacionados com metástases como os da metaloproteinases da matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9; ADHAMI; AHMAD; MUKHTAR, 2003). Além disso, a EGCG, o principal polifenol do chá verde, induz a apoptose nas células da leucemia linfocítica crônica B *in vitro*, por meio da parcial inibição da fosforilação dos receptores do fator de crescimento endotélio-vascular (VEGFR-1 e VEGFR-2) e também pela ativação da caspase-3 e da clivagem da polimerase poli-ADP-ribose (PARP), refletindo a ativação do programa de morte celular (GHOSH et al., 2009).

2.3.5 Atividade metabólica

Um dos motivos do aumento pela procura do chá verde, em grande maioria pelas mulheres, é pela sugestão que o chá proporciona uma redução do peso

corporal. No entanto, se faz necessário um conhecimento mais aprimorado sobre os verdadeiros efeitos do chá no perfil lipídico.

A obesidade e a hipercolesterolemia são doenças crônicas com alta prevalência e que fazem parte dos problemas de saúde da população moderna, o tratamento da obesidade é complexo e multidisciplinar e não existe nenhum tratamento farmacológico em longo prazo que não envolva mudança de estilo de vida, portanto, uma alternativa para reduzir os níveis elevados de colesterol e de gordura corporal pode ser através da utilização de fitoterápicos. Foi demonstrado que as catequinas reduzem o nível de colesterol do sangue e previnem a deposição e/ou acúmulo de colesterol em vários tecidos, incluindo fígado e coração em ratos com hipercolesterolemia (YANG; KOO, 1997; BABU; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2006). Além disso, as catequinas inibem as enzimas chaves na biossíntese de lipídeos e reduzem a absorção intestinal lipídica, por meio do aumento do perfil lipídico do sangue (HIGDON; FREI, 2003).

As consequências do excesso de peso à saúde tem sido relatadas por diversos autores, uma vez que é um fator de risco para, hipertensão arterial, diabetes melito, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, dentre outras doenças (CERCATO et al., 2004; BRAY, 2002).

Entre uma variedade de efeitos benéficos do chá verde, grande atenção tem sido dada à redução da gordura corporal, Choo (2003) verificou o efeito do chá verde no conteúdo de gordura e de proteína corporal em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica e observou que o grupo que recebeu alta concentração de gordura associada ao extrato do chá preveniu o incremento no ganho da gordura corporal sem afetar a ingestão energética e o peso corporal. Em estudo semelhante, Chanadiri et al. (2005) investigaram o efeito das catequinas do chá verde no metabolismo lipídico, no *status* antioxidante e no excesso de massa corporal em ratos durante a administração de uma dieta hiperenergética por 7 semanas. Um dos grupos experimentais recebeu as catequinas na quarta semana de experimento e ao final do tratamento esse grupo apresentou diminuição na concentração de colesterol total, triglicerídeos, LDL e de gordura visceral.

2.3.6 Efeitos na reprodução

Apesar dos muitos potenciais benefícios do consumo do chá verde, é importante avaliar possíveis consequências do seu consumo na reprodução. A EGCG induz redução nos níveis de hormônios sexuais esteróides (KAO; HIIPAKKA; LIAO, 2000), com possíveis efeitos negativos na eficiência reprodutiva. Estudos demonstram que a EGCG é um potente inibidor da 5α -redutase em ensaios com células (LIAO; HIIPAKKA, 1995, HIIPAKKA et al., 2002). A enzima 5α -redutase catalisa a conversão de testosterona a 5α -dihidrotestosterona.

Basini et al. (2005) claramente demonstraram um efeito inibitório da EGCG na produção do estradiol e da progesterona pelas células da granulosa cultivadas *in vitro*. A esteroidogênese pode ser afetada pela inibição da biossíntese de colesterol, já que a EGCG inibe a esqualeno-epoxidase (ABE et al., 2000), a enzima chave na produção de colesterol. Os flavonóides afetam também a produção de hormônios esteróides por diminuir a atividade de várias enzimas esteroidogênicas (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000) como a P450_{scc}, a 3β -HSD (3β -hidroxi-desidrogenase; OHNO et al., 2002) e a aromatase (GOODIN; ROSENGREN, 2003).

A EGCG diminui a expressão gênica da PKC (ADHAMI; AHMAD; MUKHTAR, 2003) que está envolvida na regulação do ciclo celular durante a progressão da fase G1 e transição de G2 para fase M (FISHMAN; SEGAL; LIVNEH, 1998). Bertagnolli et al. (2004) demonstraram a influência da PKC no reinício da meiose em oócitos bovinos, demonstrando que a PKC acelera o reinício da meiose independente das células somáticas e acelera a progressão até os estágios de MI e MII na dependência das células do *cumulus*.

A gênese de novos vasos sanguíneos é fundamental para o desenvolvimento folicular (FRASER; WULFF, 2001) e as espécies de oxigênio reativo (ROS), inibidas pelo consumo de chá verde, também estão envolvidas no controle da atividade reprodutiva feminina (OYAWOYE et al., 2003).

Os polifenóis isolados do chá verde quando administrados com água para camundongos, em uma quantidade equivalente a 6 copos de chá verde por dia em

humanos, significativamente diminuíram o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) do soro e aumentaram os níveis da proteína ligadora de IGF-1 (IGFBP-3) que suprime a ação mitogênica do IGF-1 (GUPTA *et al.*, 2001). Os fatores de crescimento semelhantes à insulina estão envolvidos tanto na foliculogênese (SCHAMS *et al.*, 2002) quanto no desenvolvimento luteínico (BERISHA; SCHAMS, 2005).

Os órgãos reprodutivos femininos (ovários, útero e placenta) são alguns dos poucos tecidos adultos que exibem crescimento e regressão periódicos e dinâmicos (REYNOLDS; KILLILEA; REDMER; 1992). Em adição, o crescimento e a regressão desses tecidos são extremamente rápidos. Não é de se surpreender, portanto, que a angiogênese ocorra como um processo normal nos tecidos reprodutivos femininos (FINDLAY, 1986; KLAGSBRUN; D'AMORE, 1991; REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992).

Os fatores de crescimento endotélio-vascular (VEGFs) exercem importante função na angiogênese e na vasculogênese (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; SHALABY *et al.*, 1995), e, portanto, estão envolvidos na reprodução, tanto no desenvolvimento dos folículos, quanto do corpo lúteo (DANFORTH *et al.*, 2003; DISSEN *et al.*, 1994; FRASER, 2006; KACZMAREK; SCHAMS; ZIECIK, 2005; STOUFFER *et al.*, 2001; FERRARA *et al.*, 1998). Se há o bloqueio da atividade biológica do VEGF, há a interrupção da foliculogênese e da formação do corpo lúteo (DANFORTH *et al.*, 2003; ZIMMERMANN *et al.*, 2001a). A EGCG inibe a produção de VEGF e a proliferação das células da granulosa de suíno cultivadas *in vitro* (BASINI; BIANCO; GRASSELLI, 2005). O chá verde inibe a expressão do VEGF e também inibe parcialmente a fosforilação dos seus receptores (GHOSH *et al.*, 2009).

A mais conclusiva evidência da importância do VEGF na angiogênese ovariana foi demonstrada com uma série de experimentos funcionais *in vivo*, em que a administração do antagonista funcional do VEGF em ratos (VEGFR-1 solúvel), é capaz de inibir completamente o ciclo ovariano (FERRARA *et al.*, 1998). Resultados similares foram obtidos com anticorpos anti-VEGF (FRASER *et al.*, 2000).

O VEGF é fortemente expresso durante o período angiogênico do ciclo ovariano (RAVINDRANATH *et al.*, 1992; SHWEIKI *et al.*, 1993; GOEDE *et al.*, 1998). As células da teca e da granulosa produzem VEGF (DANFORTH *et al.*, 2003) e as

gonadotrofinas como a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) estimulam a produção de VEGF (DANFORTH et al., 2003; DISSEN et al., 1994; LEE et al., 1997).

Christenson e Stouffer (1997) tem demonstrado que o LH é o maior estimulador da produção de VEGF pelas células da granulosa de macacas em folículos pré-ovulatórios. Similarmente, foi demonstrado que o LH promove a secreção de VEGF em células da granulosa bovinas cultivadas (SCHAMS et al., 2001). O VEGF aumenta no líquido folicular 25 horas depois da aplicação de GnRH (BERISHA et al., 2008). Porém a origem deste aumento não está clara. Berisha et al. (2008) sugerem que devido ao aumento das proteinases da matriz extracelular e da sua ação, a barreira firme da membrana basal é afrouxada e isto permite que o VEGF difunda da teca interna para o líquido folicular.

Quando se injeta o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-I) no segundo maior folículo do ovário, no começo da divergência folicular, as concentrações de VEGF aumentam; e quando a proteína 3 de ligação ao IGF (IGFBP-3) é injetada no folículo dominante, as concentrações de VEGF diminuem (GINTHER et al., 2004a, 2004b). A injeção de VEGF no maior folículo subordinado no início da divergência aumenta as concentrações de IGF-I livre e diminui androstenediona, mas não afeta as concentrações de outros fatores (GINTHER et al., 2005).

Fatores angiogênicos, como o VEGF são importantes na foliculogênese, pois a heterogenicidade na vascularização folicular determina quando um folículo é saudável ou se torna atresico (CLARK, 1900; ANDERSEN, 1926; BASSETT, 1943; BURR; DAVIES, 1951).

O VEGF aumenta durante a transição de folículo primordial a primário (KEZELE et al., 2005) e a administração de VEGF acelera o desenvolvimento folicular em ratas (IIJIMA et al., 2005). Além disso, a injeção de anticorpo anti-VEGF no ovário diminui a angiogênese folicular e completamente inibe a ovulação (IIJIMA et al., 2005).

Estudos com imunohistoquímica, em ovários de ratas, tem localizado VEGF e os seus receptores em células da pré-granulosa, células da granulosa, células da teca e no citoplasma de oócitos de folículos antrais e pré-antrais (MCFEE, 2009).

A vascularização no ovário é mais intensa com o desenvolvimento do corpo lúteo (CLARK, 1900; ANDERSEN, 1926; BASSETT, 1943) e mais de 85% das células em proliferação durante o desenvolvimento do corpo lúteo são células endoteliais (JABLONKA-SHARIFF et al., 1993; REYNOLDS et al., 1994; CHRISTENSON; STOUFFER, 1995; NICOSIA et al., 1995). A inadequada função luteal tem sido associada com a diminuição da vascularização luteal, e a redução do fluxo sanguíneo ovariano tem um papel crítico na regressão luteínica (NISWENDER; NETT, 1988; REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992, REYNOLDS et al., 1994). Quando o anticorpo anti-VEGF é aplicado em folículos pré-ovulatórios de bovinos há uma diminuição da expressão gênica do VEGF e dos seus receptores e uma diminuição no tamanho dos corpos lúteos (KAMADA et al., 2004). Papa et al. (2007) demonstraram uma correlação positiva entre as concentrações de progesterona no plasma e a expressão proteica de VEGF no corpo lúteo nas diferentes fases do ciclo estral de búfalas.

Os receptores do VEGF são expressos no corpo lúteo em estágios diferentes do ciclo estral em ratas (SUGINO et al., 2001). O receptor que parece ter papel importante na angiogênese do ovário é o VEGFR-2 (PAULI et al., 2005). A utilização do inibidor do VEGFR-2 diminui o número e o tamanho dos corpos lúteos (WEDGE et al., 2005) e, além disso, previne a angiogênese no corpo lúteo (ZIMMERMANN et al., 2001b). Em vista da importância da angiogênese na função ovariana e do papel do VEGF na foliculogênese, qualquer substância que possa alterar a expressão do VEGF e/ou sua ação nos receptores deve ser estudada, a fim da elucidação da sua influência na reprodução.

Juntos, todos estes estudos ressaltam a importância do sistema VEGF/VEGFR no ovário, reforçando a necessidade de se conhecer se o chá verde tem influencia na reprodução, já que inibe a ação e a expressão deste fator de crescimento.

Sendo assim este trabalho teve como objetivo avaliar o peso corporal, o número de corpos lúteos, o hemograma e a bioquímica sérica de ratas superovuladas, sob ingestão prolongada de chá verde.

REFERÊNCIAS

- ABE, I. et al. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 268, p. 767–771, 2000.
- ADHAMI, V. M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. **J Nutr.**, v. 133, p. 2417S–2424S, 2003.
- AHMAD, N. et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. **J Natl Cancer Inst.**, v. 89, p. 1881–1886, 1997.
- AHMAD, N.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially modulates nuclear factor kappa B (NF- κ B) in cancer cells vs. normal cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 376, p. 338–346, 2000.
- ANDERSEN, D. H. Lymphatics and blood vessels of the ovary of the sow. **Contrib to Embryol**, v. 17, p. 107–123, 1926.
- APOSTOLIDES, Z. et al. Inhibition of P hIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. **Mutat Res.**, v. 389, p. 167–172, 1997.
- ARTS, I.; VAN DE PUTTE, B.; HOLLMAN, O. Catechins contents of foods commonly consumed, in the Netherlands. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. **J Agric Food Chem.**, v. 48, p. 1752–1757, 2000.
- BABU, P. V. A.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Green tea extract impedes dyslipidaemia and development of cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 33, p. 1184-1189, 2006.
- BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. The chemistry of tea flavonoids. **Rev Food Sci Nutr.**, v. 37, p. 693-704, 1997.
- BASINI, G.; BIANCO, F.; GRASSELLI, F. Epigallocatechin-3-gallate from green tea negatively affects swine granulosa cell function. **Domest Anim Endocrinol.**, v. 28, p. 243–256, 2005.
- BASSETT, D. L. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. **Am J Anat.**, v. 73, p. 251–291, 1943.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domest Anim Endocrinol.**, v. 29, p. 305-317, 2005.

BERISHA, B. et al. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. **Reprod Fertil Dev.**, v. 20, p. 258-268, 2008.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq Bras Med Vet Zootec.**, v. 56, n. 4, p. 488-496, 2004.

BIANCHI, G. et al. Tea consumption and risk of bladder and kidney cancers in a population-based case-control study. **Am J Epidemiol.**, v. 151, p. 377–383, 2000.

BRAY, G A. The underlying basis fro obesity relationship to cancer. **J Nutr.**, v. 5, p. 132-345, 2002.

BURR, J. H.; DAVIES, J. I. The vascular system of the rabbit ovary and its relationship to ovulation. **Anat Rec.**, v. 111, p. 273–297, 1951.

CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; LOPEZ, M. C. Determination of tea components with antioxidant activity. **J Agric Food Chem.**, v. 51, p. 4427–4435, 2003.

CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea - A Review. **J Am Coll Nutr.**, v. 25, p. 79–99, 2006.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. **J Agric Food Chem.**, v. 44, p. 3426–3431, 1996.

CERCATO, C. et al. Systemic hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia in relation to body mass index, evolution of a Brazilian population. **Rev Hosp Clin Fac Med.**, v. 59, p. 113-18, 2004.

CHANADIRI, T. et al. Effectiveness of green tea catechines for the correction of the alimentary obesity in the experiment. **Georgian Med News**, v. 3, p. 126-61, 2005.

CHEN, Z. P. et al. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. **Cancer Lett.**, v. 129, p. 173–179, 1998.

CHOO, J. J. Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through β -adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue. **J Nutr Biochem.**, v. 14, p. 671-76, 2003.

CHRISTENSON, L. K. ; STOUFFER, R. L. Endothelial cell proliferation in the primate corpus luteum. **FASEB Journal**, v. 9, p. 543, Abstract 3146, 1995.

CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 82, p. 2135–2142, 1997.

CLARK, J. G. The origin, development and degeneration of the blood vessels of the human ovary. **Johns Hopkins Hospital Report**, v. 9, p. 593–676, 1900.

COSTA, L. M.; GOUVEIA, S. T.; NOBREGA, J. A. Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg and Mn in tea samples. **Anal Sci.**, v. 18, p. 313–318, 2002.

DANFORTH, D. R. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. **Biol Reprod.**, v. 68, p. 1736-1741, 2003.

DASHWOOD, W. M.; ORNER, G. A.; DASHWOOD, R. H. Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 296, p. 584–588, 2002.

DISSEN, G. A. et al. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**, v. 134, p. 114-1154, 1994.

DUFRESNE, C. J., FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **J Nutr Biochem**, v. 12, p. 404, 2001.

FERNANDEZ, P. L. et al. Study of catechin and xanthine profiles as geographical tracers. **J Agric Food Chem.**, v. 50, p. 1833–1839, 2002.

FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev.**, v. 18, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N. Et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nat Med.**, v. 4, p. 336-340, 1998.

FINDLAY, J. K. Angiogenesis in reproductive tissues. **J Endocrinol.**, v. 111, p. 357–366, 1986.

FISHMAN, D. D.; SEGAL, S.; LIVNEH, E. The role of protein kinase C in G1 and G2/M phases of the cell cycle. **Int J Oncol.**, v. 12, p. 181–186, 1998.

FRASER, H. M. et al. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 141, p. 995-1000, 2000.

FRASER, H. M.; WULFF, C. Angiogenesis in the primate ovary. **Reprod Fertil Dev.**, v. 13, p. 557-66, 2001.

FRASER, H. M. Regulation of the ovarian follicular vasculature. **Reprod Biol Endocrinol.**, v. 4, p. 18, 2006.

GENSLER, H. L. et al. Prevention of photocarcinogenesis by topical administration of pure epigallocatechin gallate isolated from green tea. **Nutr Cancer**, v. 26, p. 325–335 1996.

GHOSH, A. K. et al. Curcumin Inhibits Prosurvival Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells and May Overcome Their Stromal Protection in Combination with EGCG. **Clin Cancer Res.**, v. 15, p. 1250-8, 2009.

GINTHER, O. J. et al. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-1 on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. **Biol Reprod.**, v. 70, p. 1063–1069, 2004a.

GINTHER, O. J. et al. Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. **Biol Reprod.**, v. 70, p. 1374–1379, 2004b.

GINTHER, O. J. et al. In vivo effects of pregnancy-associated plasma protein-A, activin-A and vascular endothelial growth factor on other follicular-fluid factors during follicle deviation in mares. **Reproduction**, v. 129, p. 489–496, 2005.

GOEDE, V. et al. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. **Lab Investigat**, v. 78, p. 1385–1394, 1998.

GOODIN, M. G.; ROSENGREN, R. J. Epigallocatechin gallate modulates CYP450 isoforms in the female Swiss-Webster mouse. **Toxicol Sci.**, v. 76, p. 262–70, 2003.

GUPTA, S. et al. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (–)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 164, p. 82–90, 2000.

GUPTA, S. et al. Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 10350–10355, 2001.

GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Green tea and prostate cancer. **Urol Clin North Am.**, v. 29, p. 49–57, 2002.

HAKIM, I.; HARRIS, R.; WEISGERBER, U. Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: Influence of type of tea beverages. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 9, p. 727–731, 2000.

HEILBRUN, L. K.; NOMURA, A.; STEMMERMANN, G. N. Black tea consumption and cancer risk: a prospective study. **Br J Cancer**, v. 54, p. 677-683, 1986.

HENNING, S. M. et al. Catechin contents of 18 teas and green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. **Nutr Cancer**, v. 45, p. 226–235, 2003.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 43, p. 89–143, 2003.

HIIPAKKA, R. A. et al. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. **Biochem Pharmacol.**, v. 63, p. 1165–1176, 2002.

IJIMA, J. J. et al. Acceleration of follicular development by administration of vascular endothelial growth factor in cycling female rats. **J Reprod Dev.**, v. 51, p. 161-168, 2005.

IKIGAI, H. et al. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1147, p. 132-136, 1993.

INOUE, M. et al. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: Data from a comparative case-referent study in Japan. **Cancer Causes Control**, v. 9, p. 209–216, 1998.

INOUE, M. et al. Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: follow-up study from the Hospital-Based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC), Japan. **Cancer Lett.**, v. 167, p. 175–182, 2001.

JABLONKA-SHARIFF, A. et al. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 133, p. 1871–1879, 1993.

JAIN, M. G. et al. Alcohol and other beverage use and prostate cancer risk among Canadian men. **Int J Cancer**, v. 78, p. 707–711, 1998.

JUNG, Y. D. et al. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. **Br J Cancer**, v. 84, p. 844–850, 2001.

KACZMAREK, M. M.; SCHAMS, D.; ZIECIK, A. J. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology an overview. **Reprod Biol.**, v. 5, p. 111-136, 2005.

KAMADA, D. et al. **Suppression of corpus luteum development at early stage of formation by antibody against vascular endothelial growth factor in the cow.** Canada: The Society for the study of reproduction, 37th Annual Meeting, Vancouver, 2004. p. 451.

KAO, Y.; HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. **Endocrinology**, v. 141, p. 980-987, 2000.

KEZELE, P. R. et al. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. **Biol Reprod.**, v. 72, p. 241-255, 2005.

KHAN, S. G. et al. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. **Cancer Res.**, v. 52, p. 4050–4052, 1992.

KIM, S.; LEE, M. J.; HONG, J. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. **Nutr Cancer**, v. 37, p. 41–48, 2000.

KLAGSBRUN, M. A.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annu Rev Physiol.**, v. 53, p. 217–239, 1991.

KLAUNIG, J. et al. The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 220, p. 249–254, 1999.

LAURIE, S. A. et al. Phase I study of green tea extract in patients with advanced lung cancer. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 55, p. 33–38, 2005.

LEE, A. et al. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. **Hum Reprod.**, v. 12, p. 2756-2761, 1997.

LIAO, S.; HIIPAKKA, R. A. Selective inhibition of steroid 5 alphareductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 214, p. 833–838, 1995.

LIN, Y. S. et al. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. **J Agric Food Chem.**, v. 51, p. 1864–1873, 2003.

LIVNEH, E.; FISHMAN, D. D. Linking protein kinase C to cellcycle control. **Eur J Biochem.**, v. 248, p. 1–9, 1997.

MANACH, C. et al. Polyphenols, food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MATSUNAGA, W. et al. Astrocytic Fos expression in the rat posterior pituitary following LPS administration. **Brain Res.**, v. 898, p. 215-223, 2001.

MCFEE, R. et al. of vascular endothelial growth factor receptor signal transduction blocks follicle progression but does not necessarily disrupt vascular development in perinatal rat ovaries. **Biol Reprod.**, v. 81, n. 5, p. 966-977, 2009.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health. An update. **J Am Coll Nutr.**, v. 21, p. 1–13, 2002.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, hearth disease, and cancer. **Pharmacol Rev.**, v. 52, p. 673–751, 2000.

MITTAL, A. et al. EGCG down regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. **Int J Oncol.**, v. 24, p. 703–710, 2004.

MIURA, Y. et al. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. **J Nutr.**, v. 131, p. 27-32, 2001.

MUKHTAR, H. et al. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. **Prev Med.**, v. 21, p. 351–360, 1992.

MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, p. 1698S, 2000.

MUIR, C. et al. Cancer Incidence in Five Continents, v.V, IARC Scientific Publications, n.88. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, 1987.

NICOSIA, S. V. et al. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. **Ann Clin Lab Sci.**, v. 25, p. 143–157, 1995.

NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. The corpus luteum and its control. In: KNOBIL, E. et al. (eds.). **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 1988. p. 489–525.

OHNO, S. Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 80, p. 355–63, 2002.

OKUSHIO, K. et al. Absorption of tea catechins into rat portal vein. **Biol Pharm Bull.**, v. 19, p. 326–329, 1996.

OYAWOYE, O. et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. **Hum Reprod.**, v. 18, p. 2270-2274, 2003.

PAPA, P. C. et al. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domest Anim Endocrinol.**, v. 33, p. 379–389, 2007.

PAULI, S. A. et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. **Endocrinology**, v. 146, p. 1301-1311, 2005.

RAVINDRANATH, N. et al. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. **Endocrinology**, v. 131, p. 254–260, 1992.

RECORD, I. R.; DREOSTI, I. E. Protection by tea against UV-A 1 B-induced skin cancers in hairless mice. **Nutr Cancer**, v. 32, p. 71–75, 1998.

REYNOLDS, L. P.; KILLILEA, S. D.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB Journal**, v. 6, p. 886–892, 1992.

REYNOLDS, L. P. et al. Mitogenic factors of corpora lutea. **Prog Growth Factor Res.**, v. 5, p. 159–175, 1994.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med.**, v. 20, p. 933, 1996.

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea. Evidence from human clinical trials. **J Nutr.**, v. 133, p. 3275–3284, 2003.

SARTIPPOUR, M. R. et al. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. **J Nutr.**, v. 132, p. 2307–2311, 2002.

SCHAMS, D. et al. Stimulatory and synergistic effects of luteinizing hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 109, p. 155–162, 2001.

SCHAMS, D. et al. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domest Anim Endocrinol**, v. 22, p. 51-72, 2002.

SETIAWAN, V. W. et al. Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. **Int J Cancer**, v. 92, p. 600–604, 2001.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, p. 158, 2000.

SHALABY, F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, v. 376, p. 62-66, 1995.

SHIRAKI, M. et al. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. **Mutat Res.**, v. 323, p. 29–34, 1994.

SHWEIKI, D. et al. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. **J Clin Invest.**, v. 91, p. 2235-2243, 1993.

STONER, G. D.; MUKHTAR, H. J. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. **Cell Biochem.**, v. 22, p. 169-180, 1995.

STOUFFER, R. L. et al. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Arch Med Res.**, v. 32, p. 567-575, 2001.

SUGINO, N. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in rat corpus luteum: regulation by oestradiol during mid-pregnancy. **Reproduction**, v. 122, p. 875-881, 2001.

USDA. "USDA Database for the Flavonoid Contents of Selected Foods." Beltsville. **US Department of Agriculture**, 2003.

VELAYUTHAM, P.; BABU, A.; LIU D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Curr Med Chem.**, v. 15, n. 18, p. 1840-1850, 2008.

VISON, J. et al. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **J Agric Food Chem.**, v. 3, p. 2800–2802, 1995.

XU, Y. et al. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and major polyphenol as antioxidants. **Cancer Res.**, v. 52, p. 3875–3879, 1992.

WANG, Z. Y. et al. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. **Cancer Res**, v. 52, p. 6657–6665, 1992.

WANG, L. F. et al. Various antibrowning agents and green tea extract during processing and storage. **J Food Process Pres.**, v. 27, p. 213–225, 2003.

WEDGE, S. R. et al. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. **Cancer Res.**, v. 65, p. 4389-4400, 2005.

WILLSON, K. C. "**Coffee, Cocoa and Tea**". New York: CABI Publishing, 1999.

WU, C. D.; WEI, G. X. Tea as a functional food for oral health. **Nutrition**, v. 18, p. 443–444, 2002.

YAMAMOTO, T. et al. Green tea polyphenols causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 301, p. 230–236, 2003.

YANG, T. T.; KOO, M. W. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. **Pharmacol Res.**, v. 35, p. 505-512, 1997.

YANG, G. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 611-616, 1998.

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

ZIMMERMANN, R. C. et al. Short-term administration of antivasular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 86, p. 768-772, 2001a.

ZIMMERMANN, R. C. et al. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. **Microvasc Res.**, v. 62, p. 15-25, 2001b.

ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and *Pu-erh* teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v. 57, p. 307–316, 2002.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

CONSUMO DE CHÁ VERDE ESTIMULA O SISTEMA IMUNOLÓGICO E NÃO INTERFERE NA OVULAÇÃO DE RATAS SUPEROVULADAS.

THE INTAKE OF GREEN TEA STIMULATES THE IMMUNE SYSTEM AND DOES NOT INTERFERE IN THE OVULATION OF SUPEROVULATED RATS.

C S Monteiro^{1*}, J P P Donadeli¹, L R L Zanfolin¹, C Castilho¹, P C Papa², C B Laposy¹, R M B Nogueira¹, L G Machado¹, R Giuffrida¹, D P Vieira¹, I C Giometti¹

¹ Mestrado de Ciência Animal, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP) – Brasil

² Setor de Anatomia, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo (SP) – Brasil

Summary

The intake of green tea stimulates the immune system and does not interfere in the ovulation of superovulated rats.

The green tea derived from *Camellia sinensis* is considered a healthy drink, because it is associated with many benefits for the health, including the cancer prevention, cardiovascular disease and osteoporosis. The catechins are found abundantly in the green tea and they possess antioxidative, antibacterial and antitumoral activity, however there are not studies demonstrating if the chronic consumption of green tea could interfere in the reproduction and in biochemistry and hematological exams. Thus, the aim of this work is to verify the green tea influence in the weight, in the ovulation rate, in the blood count and in the blood biochemistry of superovulated rats. For that, the rats were divided in two groups, control and treated with green tea (n=30). The experiment had lasted for three months, in the end of which 10 animals of each group were superovulated and sacrificed, after that, animals and the ovaries were weighted, corpora lutea were counted and the laboratorial exams of animals' blood were realized. The chosen statistical analysis was the unpaired t test with Welch's correction and the moments in each group were analyzed by variance analysis with Tukey test, the differences were considered when $p < 0.05$. The chronic consumption of green tea for three months avoid the increase of weight in animals with higher consumption and did not interfere with ovulation rate, but increased immune cells and lipid profile of the blood, and reduced serum creatinine in superovulated Wistar rats.

Key words: lipids, immune system, ovary, corpus luteum.

Introdução

A atividade biológica do chá verde é geralmente atribuída aos polifenóis que ele contém (Mukhtar e col., 1992; Shiraki e col., 1994) e sua farmacologia não é restrita ao seu efeito estimulante. Efeitos significativos são associados ao consumo deste chá oriundo da planta *Camellia sinensis* com vários benefícios para a saúde, incluindo a prevenção de câncer, doença cardiovascular, osteoporose (Yang e Landau, 2000; Higdon e Frei, 2003) e atividade antioxidante (Dufresne e Farnworth, 2001).

As catequinas que são componentes químicos dos polifenóis, presentes no chá verde, afetam o metabolismo por vários mecanismos e previnem o aparecimento de placas ateroscleróticas em vários modelos de hiperlipidemia (Khan e col., 1992; Miura e col., 2001). Elas exercem efeitos de proteção vascular por meio de múltiplos mecanismos, incluindo antioxidativo, anti-hipertensivo, antiinflamatório, antiproliferativo, antitrombótico e efeitos de perda lipídica (Balentine e col., 1997). Estas catequinas inibem as enzimas chaves na biossíntese de lipídeos e reduzem a absorção intestinal lipídica, por meio do aumento do perfil lipídico do sangue (Higdon e Frei, 2003), além disso, inibem a proliferação das células musculares lisas vasculares por interferir com os fatores de crescimento vasculares (Rice-Evans e col., 1996) e suprimem a adesão plaquetária, por meio da inibição da trombogênese. Tem-se demonstrado também que estas catequinas reduzem o nível de colesterol do sangue e previnem a deposição e/ou acúmulo de colesterol em vários tecidos, incluindo fígado e coração em ratos com hipercolesterolemia (Yang e Koo, 1997; Babu e col., 2006). Por isso, há a necessidade de se investigar se o consumo prolongado do chá verde altera o hemograma e a bioquímica sérica. Apesar dos muitos benefícios do consumo do chá verde, é importante avaliar também possíveis consequências do seu consumo na reprodução.

Uma das catequinas presentes no chá verde, a epigallocatequina galato (EGCG), induz a redução nos níveis de hormônios sexuais esteróides (Kao e col., 2000), com possíveis efeitos negativos na eficiência reprodutiva. Basini e col. (2005) demonstraram um efeito inibitório da EGCG na produção do estradiol e progesterona pelas células da granulosa cultivadas *in vitro*. Estudos demonstram que a EGCG é um potente inibidor de enzimas chaves da reprodução, como a 5 α -redutase (Liao e Hiipakka, 1995, Hiipakka e col., 2002), a P450_{scc}, a 3 β -HSD (3 β -hidroxi-esteróide-desidrogenase; Ohno e col., 2002) e a aromatase (Goodin e Rosengren, 2003). A

esteroidogênese também pode ser afetada pela inibição da biossíntese de colesterol, já que a EGCG inibe a esqualeno-epoxidase (Abe e col, 2000), importante enzima na produção de colesterol.

A EGCG diminui a expressão gênica da proteína quinase C (PKC; Adhami e col., 2003), envolvida na regulação da meiose de oócitos (Bertagnolli e col., 2004); inibe as espécies de oxigênio reativo (ROS), envolvidas no controle da atividade reprodutiva feminina (Oyawoye e col., 2003); inibe a expressão do fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF; Sartippour e col., 2002) e a fosforilação dos seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2), ambos responsáveis pela angiogênese e pela vasculogênese do ovário (Ferrara e col., 1998; Danforth e col., 2003). Se há bloqueio da atividade biológica do VEGF, há a interrupção da foliculogênese e da formação do corpo lúteo (Danforth e col., 2003; Zimmermann e col., 2001). Além disso, os polifenóis isolados do chá verde diminuem o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) do soro (Gupta e col., 2001), importante fator da foliculogênese (Schams *et al.*, 2002) e do desenvolvimento luteínico (Berisha e Schams, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o peso corporal, o número de corpos lúteos, o hemograma e a bioquímica sérica de ratas Wistar superovuladas, sob ingestão prolongada de chá verde.

Material e Métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo CEUA número 325). Foram utilizadas 60 ratas Wistar, em idade reprodutiva (11 semanas), nulíparas, divididas em dois grupos, controle (n=30) e chá verde (n=30), os animais são provenientes do Biotério Central da UNOESTE. As ratas foram pesadas, identificadas e então, mantidas em caixas tamanho padrão utilizadas no biotério, contendo 5 animais por caixa, com maravalha, bebedouro e comedouro com ração (Supralab[®], Raça Forte). Um grupo recebeu água *ad libitum* no bebedouro e o outro, ao invés de água recebeu somente chá verde (Amor à Vida[®], Amor à Vida Produtos Naturais) *ad libitum* para beber, em uma situação experimental de ingestão prolongada de chá, como realizado por Yang e col. (2003) e Niwattisaiwong e col. (2004). O chá foi preparado diariamente em uma concentração de 2,5% pela adição de água fervente no extrato puro de chá verde e posteriormente filtrado.

O tratamento com chá teve duração total de 3 meses, no final de cada mês, 10 ratas de cada grupo (controle e tratado) foram pesadas e superovuladas. A superovulação foi feita seguindo o protocolo hormonal de superovulação de Kito e col. (2010), uma injeção intraperitoneal de 150UI/Kg de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon[®], Intervet) e 48 horas após, foi aplicada uma injeção intra-peritoneal de 150UI/Kg de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor[®], Hertape Calier). Após 48h da aplicação do hCG, as ratas foram pesadas, anestesiadas com éter e então sacrificadas por exsanguinação. Os ovários foram pesados em balança de alta precisão, depois os corpos lúteos foram dissecados com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e contados utilizando estereomicroscópio, o sangue colhido por punção cardíaca foi utilizado para o hemograma e bioquímica sérica.

O hemograma foi realizado com o sangue colhido em tubos à vácuo com 10% de EDTA, por meio de contador automático (Sysmex-Roche[®]). A contagem diferencial de leucócitos foi feita por meio de esfregaço sanguíneo corado por coloração rápida (Diff-Quick), segundo Jain, 1993. As proteínas plasmáticas foram mensuradas por refratometria (Kaneko e col., 2008). O colesterol total, triglicerídeos e glicose foram determinados com a utilização de kits bioquímicos (Labtest) e analisador semi-automático (Quick-Lab-Drake[®], Drake).

Análise estatística

Todos os grupos de dados foram testados quanto ao pressuposto de normalidade empregando-se o teste de Kolmogorv-Smirnov pelo qual foram consideradas como variáveis de distribuição gaussiana aquelas que resultaram em significância $>0,10$.

Para comparar os pesos das ratas mensurados no início do experimento, aos 30, 60 e 90 dias para os grupos controle e tratado empregou-se o teste de análise de variância para dados pareados (ANOVA), com contrastes pelo método de Tukey-Kramer. Para comparar os valores médios de ingestão de líquidos entre os grupos controle e experimental dos dias zero a 30, 31 a 60, 61 a 90 e zero a 90 empregou-se o teste t não pareado. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Para comparar o peso, o número de corpos lúteos, peso dos ovários e parâmetros mensurados no hemograma e bioquímica sérica entre os grupos controle e experimental,

empregou-se o teste t não-pareado com correção de Welch. Para realizar as mesmas comparações entre os momentos dentro de cada grupo empregou-se a análise de variância com contrastes pelo método de Tukey.

Resultados

Com relação ao peso das ratas, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos (controle e chá verde) nos momentos avaliados, porém as ratas demonstraram ganho de peso significativo nos dois grupos a cada mês avaliado (tabela 1).

Tabela 1 – Médias e desvios-padrões do peso das ratas tratadas com água (Controle) e chá verde (CV) no início do experimento (dia zero), aos 30, 60 e 90 dias.

| Parâmetro | Grupo | Momentos (dias) | | | |
|-----------|----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 0 | 30 | 60 | 90 |
| Peso (g) | Controle | 181,90±13,26 ^{Aa} | 211,20±16,63 ^{Ab} | 222,80±17,26 ^{Ac} | 233,00±19,30 ^{Ad} |
| | CV | 194,90±16,70 ^{Aa} | 216,00±18,23 ^{Ab} | 231,80±17,87 ^{Ac} | 245,40±21,48 ^{Ad} |

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$).

Com relação à ingestão de líquido e de ração, observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo chá verde, houve um aumento significativo no consumo de líquido pelo grupo experimental a partir de 30 dias e esse aumento manteve-se até o final do experimento. Também foi observada diferença significativa ($p<0,05$) entre o grupo controle e o chá verde no consumo de ração no segundo mês do experimento, o grupo experimental consumiu mais ração que o grupo controle, porém, no terceiro mês notou-se uma queda nesse consumo. Em relação ao tempo total do experimento, houve uma maior ingestão de ração e de líquido pelo grupo tratado (tabela 2).

Tabela 2 – Médias e desvios-padrões da ingestão de líquido e ração pelas ratas tratadas com água (Controle) e chá verde (CV) do início do experimento aos 90 dias.

| Parâmetro | Grupo | Momentos (dias) | | | |
|-----------------------------------|----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | | 0-30 | 31-60 | 61-90 | TOTAL (0-90) |
| Ingestão de líquido (mL/dia) | Controle | 29,53±2,52 ^{Aa} | 29,06±2,10 ^{Aa} | 28,79±3,41 ^{Aa} | 29,13±2,72^A |
| | CV | 29,26±2,63 ^{Aa} | 31,90±2,32 ^{Bb} | 31,03±2,48 ^{Bb} | 30,73±2,69^B |
| Ingestão de ração (g/48 horas) | Controle | 36,79±4,89 ^{Aab} | 39,37±2,33 ^{Aa} | 35,42±3,50 ^{Ab} | 37,19±4,00^A |
| | CV | 36,78±5,79 ^{Aa} | 42,79±1,94 ^{Bb} | 38,84±6,69 ^{Aab} | 39,47±5,70^B |

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística entre os dois grupos (controle e chá verde) em relação ao peso dos ovários e em relação ao número de corpos lúteos. Porém, o peso dos ovários foi maior no primeiro mês nos dois grupos em relação aos outros meses (tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvios-padrões do número de corpos lúteos e peso dos ovários de ratas tratadas com água (Controle) e chá verde (CV) aos 30, 60 e 90 dias.

| Parâmetro | Grupo | Momentos (dias) | | |
|----------------------------|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 30 | 60 | 90 |
| Peso dos ovários (g) | Controle | 0,30±0,10 ^{Aa} | 0,18±0,05 ^{Ab} | 0,21±0,04 ^{Ab} |
| | CV | 0,35±0,09 ^{Aa} | 0,20±0,06 ^{Ab} | 0,22±0,06 ^{Ab} |
| Número de corpos lúteos | Controle | 61,10±10,93 ^{Aa} | 64,90±27,77 ^{Aa} | 62,30±20,17 ^{Aa} |
| | CV | 67,80±23,32 ^{Aa} | 57,20±25,41 ^{Aa} | 55,20±26,13 ^{Aa} |

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Os resultados das médias do eritrograma dos animais estão apresentados na tabela 4. O grupo experimental (chá verde) apresentou menor número de hemácias, menor hemoglobina e menor hematócrito que o grupo controle apenas no primeiro mês do experimento, nos outros

meses não houve diferença significativa entre os grupos. O VCM (Volume Corpuscular Médio) foi maior no segundo mês no grupo controle que no grupo do chá verde, nos outros meses não houve diferença significativa. O VCM do grupo chá verde foi significativamente menor no segundo mês em relação ao primeiro mês. Assim como o VCM, o HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) do grupo do chá verde também foi menor no segundo mês comparado com primeiro mês, o que levou a uma diferença significativa entre o grupo controle e o tratado no primeiro e segundo meses. O CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) foi maior no grupo do chá somente após 3 meses de tratamento quando comparado ao controle. Não houve diferença entre os grupos e nem entre os momentos analisados com relação à PPT (Proteína Plasmática Total, tabela 4).

Tabela 4 – Médias e desvios-padrões dos parâmetros analisados no eritrograma de ratas tratadas com água (Controle) e chá verde (CV) aos 30, 60 e 90 dias.

| Parâmetro | Grupo | Momentos (dias) | | |
|---------------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| | | 30 | 60 | 90 |
| Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$) | Controle | $8,37 \pm 0,21^{Aa}$ | $7,84 \pm 0,90^{Aa}$ | $8,33 \pm 0,76^{Aa}$ |
| | CV | $7,78 \pm 0,36^{Ba}$ | $8,12 \pm 0,54^{Aa}$ | $8,17 \pm 0,47^{Aa}$ |
| Hemoglobina (g/dL) | Controle | $16,18 \pm 0,34^{Aa}$ | $15,55 \pm 1,75^{Aa}$ | $16,25 \pm 1,69^{Aa}$ |
| | CV | $15,52 \pm 0,74^{Ba}$ | $15,58 \pm 1,21^{Aa}$ | $16,07 \pm 0,78^{Aa}$ |
| Hematócrito (%) | Controle | $45,47 \pm 1,43^{Aa}$ | $43,52 \pm 4,63^{Aa}$ | $45,81 \pm 4,99^{Aa}$ |
| | CV | $43,05 \pm 1,98^{Ba}$ | $43,81 \pm 3,38^{Aa}$ | $44,67 \pm 2,47^{Aa}$ |
| VCM (fL) | Controle | $54,68 \pm 1,68^{Aa}$ | $55,62 \pm 1,48^{Aa}$ | $54,95 \pm 1,33^{Aa}$ |
| | CV | $55,34 \pm 1,18^{Aa}$ | $53,90 \pm 1,26^{Bb}$ | $54,70 \pm 0,76^{Aab}$ |
| HCM (pg) | Controle | $19,35 \pm 0,43^{Aa}$ | $19,85 \pm 0,46^{Aa}$ | $19,50 \pm 0,46^{Aa}$ |
| | CV | $19,96 \pm 0,34^{Ba}$ | $19,16 \pm 0,50^{Bb}$ | $19,68 \pm 0,34^{Aa}$ |
| CHCM (%) | Controle | $35,62 \pm 0,61^{Aa}$ | $35,70 \pm 0,75^{Aa}$ | $35,51 \pm 0,39^{Aa}$ |
| | CV | $36,04 \pm 0,46^{Aa}$ | $35,56 \pm 0,53^{Aa}$ | $36,00 \pm 0,50^{Ba}$ |
| PPT (g/dL) | Controle | $6,97 \pm 0,32^{Aa}$ | $7,00 \pm 0,37^{Aa}$ | $6,93 \pm 0,43^{Aa}$ |
| | CV | $6,68 \pm 0,41^{Aa}$ | $6,87 \pm 0,31^{Aa}$ | $6,91 \pm 0,28^{Aa}$ |

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente, dentro do mesmo parâmetro ($p > 0,05$).

Quando os leucogramas dos animais foram avaliados, observou-se um aumento das células de defesa (leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) no grupo do chá verde, do primeiro ao último mês do experimento, sendo que houve diferença estatística significativa entre 30 e 90 dias neste grupo. O grupo controle só diferiu do grupo tratado com chá em relação aos eosinófilos com 3 meses de experimento (tabela 5).

Tabela 5 – Médias e desvios-padrões dos parâmetros avaliados no leucograma de ratas tratadas com água (Controle) e chá verde (CV) aos 30, 60 e 90 dias.

| Parâmetro | Grupo | Momentos (dias) | | |
|---|----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 30 | 60 | 90 |
| Leucócitos (células/mm ³) | Controle | 6.513 ± 2.692,5 ^{Aa} | 5.938 ± 3.046,7 ^{Aa} | 6.889 ± 2.713,6 ^{Aa} |
| | CV | 4.120 ± 2.340,4 ^{Aa} | 6.550 ± 2.972,3 ^{Aab} | 10.489 ± 5.191,2 ^{Ab} |
| Neutrófilos (células/mm ³) | Controle | 1104,4 ± 828,37 ^{Aa} | 1255,3 ± 769,25 ^{Aa} | 1753,4 ± 545,37 ^{Aa} |
| | CV | 742,20 ± 424,99 ^{Aa} | 1690,6 ± 834,82 ^{Aab} | 3177,9 ± 2326,3 ^{Ab} |
| Eosinófilos (células/mm ³) | Controle | 251,86 ± 221,54 ^{Aa} | 243,86 ± 225,88 ^{Aa} | 231,33 ± 208,51 ^{Aa} |
| | CV | 108,33 ± 89,90 ^{Aa} | 293,50 ± 328,48 ^{Aab} | 537,00 ± 210,04 ^{Bb} |
| Linfócitos (células/mm ³) | Controle | 4968,8 ± 1764,5 ^{Aa} | 4277,4 ± 2056,2 ^{Aa} | 4636,4 ± 2128,0 ^{Aa} |
| | CV | 3201,7 ± 1838,9 ^{Aa} | 4554,0 ± 2171,5 ^{Aab} | 6658,1 ± 2894,3 ^{Ab} |
| Monócitos (células/mm ³) | Controle | 219,0 ± 212,08 ^{Aa} | 205,00 ± 196,55 ^{Aa} | 262,44 ± 188,40 ^{Aa} |
| | CV | 98,25 ± 60,80 ^{Aa} | 113,67 ± 64,05 ^{Aa} | 315,89 ± 130,62 ^{Ab} |

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente, dentro do mesmo parâmetro (p > 0,05).

Com relação ao perfil bioquímico, observou-se diferença significativa entre as médias dos grupos controle e chá verde somente aos 60 dias de tratamento para creatinina, colesterol e triglicerídeos, sendo que o grupo controle apresentou maiores valores para creatinina e menores valores para colesterol e triglicerídeos. O colesterol aumentou no grupo controle no terceiro mês de experimento, mas não diferiu do grupo tratado neste momento (tabela 6).

Tabela 6 – Médias e desvios-padrões dos parâmetros avaliados na bioquímica sérica de ratas tratadas com água (Controle) e chá verde (CV) aos 30, 60 e 90 dias.

| Parâmetro | Grupo | Momentos (dias) | | |
|---------------------------|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 30 | 60 | 90 |
| Uréia (mg/dL) | Controle | 46,07 ± 14,07 ^{Aa} | 51,72 ± 11,61 ^{Aa} | 46,31 ± 12,29 ^{Aa} |
| | CV | 45,76 ± 7,51 ^{Aa} | 54,17 ± 11,94 ^{Aa} | 46,89 ± 9,14 ^{Aa} |
| Creatinina (mg/dL) | Controle | 0,51 ± 0,07 ^{Aa} | 0,42 ± 0,04 ^{Ab} | 0,46 ± 0,09 ^{Aab} |
| | CV | 0,48 ± 0,02 ^{Aa} | 0,37 ± 0,02 ^{Bb} | 0,41 ± 0,06 ^{Ab} |
| Colesterol (mg/dL) | Controle | 50,85 ± 17,12 ^{Aa} | 38,17 ± 9,14 ^{Aa} | 76,70 ± 10,40 ^{Ab} |
| | CV | 60,77 ± 22,49 ^{Aa} | 53,56 ± 10,50 ^{Ba} | 68,85 ± 14,19 ^{Aa} |
| Triglicerídeos (mg/dL) | Controle | 158,20 ± 52,44 ^{Aa} | 108,60 ± 54,82 ^{Aa} | 140,30 ± 53,75 ^{Aa} |
| | CV | 165,40 ± 80,45 ^{Aa} | 167,00 ± 68,21 ^{Ba} | 116,70 ± 54,84 ^{Aa} |
| Glicose (mg/dL) | Controle | 122,64 ± 23,59 ^{Aa} | 123,70 ± 15,50 ^{Aa} | 128,40 ± 12,92 ^{Aa} |
| | CV | 128,80 ± 11,55 ^{Aa} | 123,30 ± 17,08 ^{Aa} | 136,50 ± 27,69 ^{Aa} |

Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Discussão

Todas as ratas utilizadas neste experimento ganharam peso durante os três meses analisados, porém, esse ganho de peso era esperado, devido ao crescimento dos animais. As 60 ratas iniciaram o experimento com um peso médio de 189,11±18,53, sem diferença significativa entre os grupos controle e tratado com chá verde. Ao final dos 3 meses, a média de peso das ratas foi de 239,20±20,87. Porém, em nenhum dos momentos, houve diferença no peso das ratas entre os grupos controle e tratado.

Ao avaliar o consumo de líquido evidenciou-se que o grupo tratado com chá verde aumentou o consumo de chá a partir do segundo mês do experimento e ingeriu uma maior quantidade de líquido que o grupo controle, tanto nos dois últimos meses quanto no consumo total do experimento (0-90 dias). Esse maior consumo pode ser devido a alguma propriedade farmacológica diurética do chá verde. O aumento de micção pode levar ao aumento do consumo de líquido. O aumento da micção neste trabalho ficou evidenciado por uma diminuição na creatinina sérica aos 60 dias no grupo tratado com o chá verde, indicando um maior “clearance” renal. Estes dados estão de acordo com os de Yokozawa e col. (1996) que observaram um

aumento da filtração glomerular em ratos nefrectomizados, pela diminuição da creatinina sérica e o retardamento da falência renal, e também estão de acordo com os dados de Renno e col. (2008) que trabalharam com ratos diabéticos. Outro fator que pode levar ao aumento do consumo de chá é presença de constituintes alcalóides no chá verde, o principal deles é a cafeína, que por sua vez também é muito relacionada com um poder de dependência quando ingerido com muita frequência (Temple, 2009).

O grupo que ingeriu chá verde apresentou um maior consumo de ração, isto contradiz o trabalho de Josic e col. (2010) que observaram em humanos uma maior saciedade pós-prandial, no momento em que o chá verde foi ingerido. Entretanto, nenhum efeito de saciedade foi observado em pessoas obesas tratadas por 12 semanas com cápsulas de extrato de chá verde (Auvichayapat e col., 2008). É possível que estas diferenças nos trabalhos em relação à saciedade se devam ao tempo de observação do sentimento de saciedade. Além disso, Josic e col. (2010) admitem em seu trabalho que seus resultados em relação à saciedade, devem ser vistos com cautela, pois não foi um estudo cego e, portanto, os resultados podem ser tendenciosos.

O mesmo ganho de peso nos grupos controle e tratado com chá verde, apesar de um maior consumo de ração pelo grupo tratado, pode não ser um efeito apenas das catequinas presentes no chá verde, pois o chá verde também contém cafeína (Goto e col., 1996). O uso da cafeína pode contribuir com este resultado, pois aumenta o gasto de energia (Dulloo e col., 1989; Astrup e col., 1990) ou aumenta a termogênese (Astrup e col., 1990). Também há evidências de que a cafeína age em sinergismo com as catequinas, pois homens saudáveis suplementados com extrato de chá verde contendo 270 mg de EGCG e 150 mg de cafeína, tiveram o gasto de energia 4 % maior quando comparado àqueles que foram suplementados apenas com cafeína, e a oxidação de gordura também foi maior com o consumo do chá verde comparado à cafeína sozinha (Dulloo e col., 1989). Phung e col. (2010) revisaram a literatura para comparar o efeito das catequinas com e sem cafeína e concluíram que a ingestão das catequinas do chá verde com cafeína afeta o peso corporal, entretanto, a magnitude do efeito por 12 semanas é pequeno e pode não ser clinicamente relevante. Além disso, os dados analisados por estes autores (Phung e col., 2010) não sugerem que as catequinas sem cafeína alteram as medidas antropométricas como peso corporal, circunferência abdominal e índice de massa corporal.

No presente estudo houve a pesagem dos ovários dissecados e a contagem dos corpos lúteos. Embora já tenha sido demonstrado por Basini e col. (2005) que a EGCG presente no chá verde inibe a produção de VEGF e a proliferação das células da granulosa de suíno cultivadas *in vitro*, isto não demonstrou correlação com a produção de corpos lúteos, pois este trabalho não apresentou diferença entre os grupos controle e chá verde, nem no número de corpos lúteos, tampouco no peso dos ovários. Mesmo com muitas evidências de que o chá verde interfere na reprodução por alterar a esteroidogênese (Liao e Hiipakka, 1995, Kao e col., 2000, Abe e col., 2000, Hiipakka e col., 2002, Ohno e col., 2002, Goodin e Rosengren, 2003) e diminuir fatores de crescimento (Gupta e col., 2001, Sartippour e col., 2002) envolvidos na foliculogênese e no desenvolvimento do corpo lúteo, neste trabalho não foi observada uma diminuição na taxa ovulatória das ratas sob ingestão prolongada de chá verde. Porém, mais estudos devem ser realizados para verificar se o chá verde interfere na reprodução, pois outros parâmetros reprodutivos devem ser estudados e avaliados além da formação de corpos lúteos.

Apesar dos valores de hemoglobina terem sido mais baixos no grupo tratado com chá verde em relação ao grupo controle aos 30 dias, não houve diferença aos 60 nem aos 90 dias, além disso, os valores de hemoglobina estão dentro da faixa de normalidade para ratos, não representando anemia. Valores similares de hemoglobina foram encontrados por Akase e col. (2004), que encontrou médias de hemoglobina entre 14,3 a 16,6 g/dL em ratos saudáveis. O valor mínimo e máximo de hemoglobina encontrado neste trabalho foram 12,4 g/dL e 19,5 g/dL, respectivamente. Os valores de referência para hemoglobina são 13,4 a 15,8 g/dL, segundo Mitruka e Rawnsley (1977) e 11 a 18g/dL, segundo Harkness e Wagner (1993). Como consequência da diferença encontrada na média da hemoglobina aos 30 dias entre os grupos, o hematócrito também apresentou diferença entre os grupos no mesmo momento. Também os valores médios encontrados no hematócrito estão dentro dos valores de referência e foram similares aos encontrados por Akase e col. (2004) e também por Carvalho e col. (2009).

Em relação à série branca das ratas, ficou claro um aumento no número de células de defesa no grupo tratado com chá verde, comprovando o efeito do chá em aumentar a imunidade do organismo. Estes dados estão de acordo com o relato de Cabrera e col. (2006) de que o chá verde estimula o sistema imune. O chá verde fortalece a ação do sistema imune porque protege o organismo contra oxidantes e radicais livres (Cabrera e col., 2006).

Valores bem diferentes são encontrados entre os autores em relação ao colesterol de ratos, Mitruka e Rawnsley (1977) consideram como valores de referência para o colesterol de 10 a 54 mg/dL, já Harkness e Wagner (1993) consideram variações de 40 a 130mg/dL como valores normais. O colesterol do presente experimento variou de 22,4 a 101 mg/dL, sendo que as médias dos grupos foram de 55,4 mg/dL para o grupo controle e 61,06 mg/dL para o grupo tratado com chá verde, somando todo o período experimental (3 meses).

Já que o grupo do chá verde ingeriu maior quantidade de ração comparado ao grupo controle a partir do segundo mês do experimento e não houve diferença entre os grupos com relação ao peso, isto é um indício de que o chá verde possua efeito de perda lipídica, também demonstrado no trabalho de Balentine e col. (1997). Segundo Higdon e Frei (2003) as catequinas presentes no chá verde inibem as enzimas chaves na biossíntese de lipídeos e reduzem a absorção intestinal lipídica, por meio do aumento do perfil lipídico do sangue. Este fato, também foi evidenciado no presente trabalho, pois com 60 dias de ingestão de chá verde, o grupo tratado apresentou maior quantidade de triglicerídeos e de colesterol no sangue em relação ao grupo controle. Fato que coincide com o momento em que foi observado um aumento na ingestão de ração pelo grupo tratado e que não resultou em maior peso dos animais deste grupo.

Não houve alteração nos níveis séricos de glicose entre o grupo tratado com chá verde e o grupo controle nos diferentes momentos analisados, estes dados estão de acordo com os de Josic e col. (2010). Porém, este resultado já era esperado, pois as ratas utilizadas neste experimento não apresentavam problemas metabólicos. A literatura relata que as catequinas presentes no chá verde, principalmente a EGCG, tem um efeito benéfico na tolerância à glicose e no risco de desenvolver diabetes tipo II (Higdon e Frei, 2003; Maruyama e col., 2009), por aumentar a sensibilidade à insulina depois de um teste oral de tolerância à glicose, porém sem nenhuma alteração nos níveis de glicose em roedores (Wu e col., 2004) e humanos (Venables e col., 2008).

O consumo prolongado do chá verde é benéfico, pois estimula o sistema imunológico, auxilia na manutenção do peso corporal, não interfere nos parâmetros reprodutivos avaliados, diminui a creatinina sérica e aumenta o perfil lipídico do sangue em ratas Wistar superovuladas.

Resumo

Consumo de chá verde estimula o sistema imunológico e não interfere na ovulação de ratas superovuladas.

O chá verde oriundo da planta *Camellia sinensis* é considerado uma bebida saudável, pois é associado há vários benefícios para a saúde, incluindo a prevenção de câncer, doença cardiovascular e osteoporose. As catequinas encontradas em abundância no chá verde possuem ação antioxidativa e bactericida e também atividade anti-tumoral, porém não há estudos demonstrando se o consumo prolongado do chá verde pode interferir na reprodução e nos exames laboratoriais. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o peso corporal, o número de corpos lúteos, o hemograma e a bioquímica sérica de ratas Wistar superovuladas, sob ingestão prolongada de chá verde. Para tanto, as ratas foram divididas em dois grupos, controle e tratado com ingestão de chá verde (n=30). O experimento teve duração de três meses e ao final de cada mês, 10 animais de cada grupo foram superovulados e sacrificados, foi realizada, então, a pesagem dos animais e dos ovários, a contagem dos corpos lúteos e os exames laboratoriais do sangue dos animais. A análise estatística realizada entre os grupos foi o teste t não-pareado com correção de Welch e entre os momentos dentro de cada grupo empregou-se a análise de variância com contrastes pelo método de Tukey, diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$. O consumo prolongado do chá verde por três meses não aumenta o peso dos animais mesmo com um maior consumo de ração, também não interfere na resposta ovulatória, porém, aumenta as células de defesa, diminui a creatinina sérica e aumenta o perfil lipídico do sangue em ratas Wistar superovuladas.

Palavras-chave: lipídeos, sistema imune, ovário, corpo lúteo.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da FAPESP (processo número 2010/20583-2).

Referências Bibliográficas

Abe I, T Seki, K Umehara, T Miyase, H Noguchi, J Sakakibara, T Ono. 2000. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 767–71.

Adhami Vm, N Ahmad, H Mukhtar. 2003. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J. Nutr.*, 133, 2417S–2424S.

Akase T, S Onodera, R Matsushita, T Akase, S Tashiro. 2004. A comparative study of laboratory parameters and symptoms effected by toki-shakuyaku-san and an iron preparation in rats with iron-deficiency anemia. *Biol Pharm Bull.*, 27, 6, 871-878.

Astrup A, S Toubro, S Cannon, P Hein, L Breum, J Madsen. 1990. Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.*, 51, 759–67.

Auvichayapat P, M Prapochanung, O Tunkamnerdthai, B O Sripanidkulchai, N Auvichayapat, B Thinkhamrop, S Kunhasura, S Wongpratoom, S Sinawat, P Hongprapas. 2008. Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial. *Physiol. Behav.*, 93, 486-491.

Babu P V A, K E Sabitha, C S Shyamaladevi. 2006. Green tea extract impedes dyslipidaemia and development of cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 33, 1184-1189.

Balentine D A, S A Wiseman, L Bouwens. 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Rev Food Sci Nutr*, 37, 693-704.

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

Berisha B, D Schams. 2005. Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 305-317.

Bertagnolli A C, P B D Gonçalves, I C Giometti, L F S Costa, J F C Oliveira, I D V Gonçalves, K P Barreto, I P Emanuelli, L F K Borges. 2004. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 56, 4, 488-496.

Carvalho G D, A P B Masseno, M S Zanini, S F Zanini, L C Porfírio, J P Machado, H Mauad. 2009. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Revista Ceres*, 56, 1, 51-57.

Cabrera C, R Artacho, R Gimenez. 2006. Beneficial Effects of Green Tea. *A Review Journal of the American College of Nutrition*, 25, 2, 79–99.

Danforth Dr, L K Abrogast, S Ghosh, A Dickerman, R Rofagha, C I Friedman. 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol. Reprod.*, 68, 1736-1741.

Dufresne C J, E R Farnworth. 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem*, 12, 404.

Dulloo A G, C A Geissler, T Horton, A Collins, D S Miller. 1989. Normal caffeine consumption: influence on thermogenesis and daily energy expenditure in lean and postobese human volunteers. *Am J Clin Nutr*, 49, 44–50.

Ferrara N, H Chen, T Davis-Smyth, H P Gerber, TN Nguyen, D Peers, V Chisholm, KJ Hillan, Schwall. 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis, *Nature Medicine*, 4, 336-340.

Goodin M G, R J Rosengren. 2003. Epigallocatechin gallate modulates CYP450 isoforms in the female Swiss-Webster mouse. *Toxicol. Sci.*, 76, 262–70.

Goto T, Y Yoshida, M Kiso, H Nagashima. 1996. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J Chromatogr A*, 749, 295–9.

Gupta S, K Hastak, N Ahmad, J S Lewin, H Mukhtar. 2001. Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98, 10350–10355.

Harkness, J E, J E Wagner. 1993. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*, 3^a ed. São Paulo, Roca. 238p.

Higdon J V, B Frei. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 89–143.

Hiipakka R A, H Z Zhang, W Dai, Q Dai, S Liao. 2002. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochem. Pharmacol.*, 63, 1165–1176.

Jain N C. 1993. Essentials of Veterinary Hematology. *Philadelphia : Lea & Febiger*. 417p.

Josic J, A T Olsson, J Wickeberg, S Lindstedt, J Hlebowicz. 2010. Does green tea affect postprandial glucose, insulin and satiety in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 9, 63-71.

Kaneko J J, J W Harvey, M L Bruss. 2008. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed., *Academic Press, New York*, pp: 881-888.

Kao Y, R A Hiipakka, S Liao. 2000. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*, 141, 980-987.

Khan S G, S K Katiyar, R Agarwal, H Mukhtar. 1992. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.*, 52, 4050–4052.

Kito S, H Yano, Y Ohta, S Tsukamoto. 2010. Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats. *Exp Anim.*, 59, 35-45, 2010.

Liao S, R A Hiipakka. 1995. Selective inhibition of steroid 5 alpha reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214: 833–838.

Maruyama K, H Iso, S Sasaki, Y Fukino. 2009. The association between concentrations of green tea and blood glucose levels. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 44, 41-45.

Mitruka B M, H M Rawnsley. 1977. Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. New York, *Masson Publishing*. 272.

Miura, Y, T Chiba, I Tomita, H Koizumi, S Miura, K Umegaki, Y Hara, M Ikeda, T Tomita. 2001. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.*, 131, 27-32.

Mukhtar H, Z Y Wang, S K Katiyar, R Agarwal. 1992. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev. Med.*, 21, 351–360.

Niwattisaiwong N, X X Luo, P F Coville, S Wanwimolruk. 2004. Effects of Chinese, Japanese and Western tea on hepatic P450 enzyme activities in rats. *Drug Metabol. Drug Interact.*, 20, 43-56.

Ohno S, S Shinoda, S Toyoshima, H Nakazawa, T Makino, S Nakajin. 2002. Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 80, 355–63.

Oyawoye O, Abdel, A Gadir, A Garner, N Constantinovici, C Perrett, P Hardiman. 2003. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum. Reprod.*, 18, 2270-2274.

Phung O J, W L Baker, L J, Matthews, M Lanosa, A Thorne, C I Coleman. 2010. Effect of green tea catechins with or without caffeine on anthropometric measures: a systematic review and meta-analysis¹⁻³. *Am J Clin Nutr*, 91, 73-81.

Renno W M, S Abdeen, M Alkhalaf, S Asfar. 2008. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *Br J Nutr*. 100, 3, 652-9.

Rice-Evans Ca, N J Miller, G Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20, 933.

Sartippour M R, Z M Shao, D Heber, P Beatty, L Zhang, C Liu, L Ellis, W Liu, VI Go. 2002. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J. Nutr.*, 132, 2307-2311.

Schams D, B Berisha, M Kosmann, W M Amselgruber. 2002. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology*, 22, 51-72.

Shiraki M, Y Hara, T Osawa, H Kumon, T Nakayama, S Kawakishi. 1994. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutat. Res.*, 323, 29-34.

Temple J L. 2009. Caffeine use in Children: What we know, what we have left to learn, and why we should worry. *Neurosci Biobehav Rev*, 33, 6, 793-806.

Venables M C, C J Hulston, H R Cox, A E Jeukendrup. 2008. Green tea extract ingestion, fat oxidation and glucose tolerance in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 87, 778-784.

Wu L Y, C C Juan, L T Ho, Y P Hsu, L S Hwang. 2004. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 643-648.

Yang T T, M W Koo. 1997. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacol. Res.*, 35, 505-512.

Yang C S, J M Landau. 2000. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J. Nutr.*, 130, 2409-2412.

Yang M, M Yoshikawa, K Arashidani, T Kawamoto. 2003. Effects of green tea on carcinogen-induced hepatic CYP1As in C57BL/6 mice. *Eur. J. Cancer Prev.*, 12, 391-395.

Yokozawa T, H Y Chung, L Q He, H Oura. 1996. Effectiveness of green tea tannin on rats with chronic renal failure. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60, 6, 1000-5.

Zimmermann R C, E Xiao, N Husami, M V Sauer, R Lobo, J Kitajewski, M Ferin. 2001. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 768-7