

**INGESTÃO PROLONGADA DE CHÁ BRANCO EM RATAS WISTAR
SUPEROVULADAS**

DEYVID PARREIRA VIEIRA

**INGESTÃO PROLONGADA DE CHÁ BRANCO EM RATAS WISTAR
SUPEROVULADAS**

DEYVID PARREIRA VIEIRA

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

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

636.089 26
V658i

Vieira, Deyvid Parreira.

Ingestão prolongada de chá branco em ratas wistar superovuladas / Deyvid Parreira Vieira. – Presidente Prudente, 2012.

49 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: .Inês Cristina Giometti.

1. Chá branco. 2. Ovário. 3. Ratas Wistar. 4. Contagem de células sanguíneas. 5. Ovário. 6. Corpo lúteo. 7. Lipídeos. 8. Peso corporal. I. Título.

DEYVID PARREIRA VIEIRA

**INGESTÃO PROLONGADA DE CHÁ BRANCO EM RATAS WISTAR
SUPEROVULADAS**

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

Presidente Prudente, 26 de setembro 2012.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Marcelo Fabio Gouveia Nogueira
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Assis – SP

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, pela saúde e por ter me iluminado durante todos os caminhos percorrido até hoje.

Aos meus pais, por tudo que tenho e que sou, pelo carinho e apoio que proporcionaram minha formação.

À minha esposa, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos durante esta jornada.

À minha orientadora pela paciência, tempo e dedicação que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento deste experimento.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Programa de mestrado em Ciência Animal.

A todos os professores que compartilharam um pouco de seu conhecimento durante as aulas do programa de Mestrado em Ciência Animal.

Ao Biotério Central da UNOESTE e seus profissionais e aos animais utilizados na nossa pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica que dedicaram seu tempo para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores e colaboradores: Caliê Castilho, Cecília Braga Laposy, Rosa Maria Barilli Nogueira, Luciana Guaberto Machado, Rogério Giuffrida, Paula de Carvalho Papa, Cyntia dos Santos Monterio e Samuel Aparecido Freire.

Em especial, à minha orientadora, Ines Cristina Giometti, por ter concedido sua sabedoria, experiência, tempo e compreensão durante todas as etapas desenvolvidas neste experimento, permitindo-me adquirir experiência e conhecimento que levarei por toda minha vida.

RESUMO

Ingestão prolongada de chá branco em ratas Wistar superovuladas

O chá branco é uma bebida saudável, porém este chá pode interferir em vários fatores de crescimento envolvidos na reprodução e no metabolismo. Portanto, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do consumo prolongado de chá branco no metabolismo, no número de corpos lúteos e no peso dos ovários de ratas superovuladas. Foram utilizados dois grupos de ratas: controle (n=30) que recebeu água e o grupo que recebeu apenas chá branco para beber (n=30). O experimento durou 3 meses, o consumo de líquido e de ração foi verificado. Ao final de cada mês, 10 ratas de cada grupo eram superovuladas, com 150 UI/Kg de eCG e mais 150UI/Kg de hCG depois de 48 horas. Após 48 horas da superovulação, as ratas foram pesadas, sacrificadas, os ovários foram pesados e os corpos lúteos contados. O sangue dos animais foi colhido para hemograma e bioquímica sérica. A análise estatística foi de ANOVA seguida do teste de Tukey, foram consideradas diferenças estatísticas quando $P < 0,05$. O grupo tratado com chá branco apresentou maior ingestão de ração ($39,63 \pm 3,91$ g) em relação ao controle ($37,19 \pm 4,00$ g; $P < 0,05$), porém não houve diferença no peso dos animais, o grupo tratado apresentou menor concentração de colesterol ($32,02 \pm 9,62$ mg/dL) que o grupo controle ($76,70 \pm 10,41$ mg/dL; $P < 0,05$). Não houve diferença no número de corpos lúteos e peso dos ovários entre os grupos. Conclui-se que o consumo de chá branco evita o ganho excessivo de peso dos animais, diminui a concentração sérica de colesterol e não interfere no número de corpos lúteos e no peso dos ovários de ratas superovuladas.

Palavras-chave: Ratas Wistar. Contagem de Células Sanguíneas. Ovário. Corpo Lúteo. Lipídios. Peso Corporal. Chá branco.

ABSTRACT

Chronic ingestion of white tea in Wistar rats superovulated

The white tea is a healthy drink, but this tea can interfere in some growth factors involved in the reproduction and in the metabolism. So, the aim of this work was to verify the effect of the white tea consumption in the metabolism, number of corpora lutea and in the weight of superovulated rats. There were utilized two groups of rats: control (n=30) that received water and the group that received only white tea to drink (n=30). The experiment lasts three months and the liquid and ration consumption were verified. In the end of each month, 10 rats of each group were superovulated with 150 UI/Kg of eCG, and 150UI/Kg of hCG 48 hours later. After 48 hours of the superovulation, the rats were weighted, sacrificed and the ovaries were weighted and the corpora lutea counted, besides the blood of animals were collected for hemogram and serum biochemistry. Não houve diferença no número de corpos lúteos e peso dos ovários entre os grupos. The statistical analysis was ANOVA test followed of Tukey analysis, differences were considered when $P < 0.05$. The group treated with white tea showed higher ingestion of ration (39.63 ± 3.91 g) than control group (37.19 ± 4.00 g; $P < 0.05$). However there wasn't any difference in the animals' weight. Moreover, the treated group presented lower cholesterol concentration (32.02 ± 9.62 mg/dL) than control group (76.70 ± 10.41 mg/dL; $P < 0.05$). No one statistical difference was observed in the number of corpora lutea, neither in the ovaries weight between the groups. The conclusion that white tea inhibits the excessive weight gain and decreases the cholesterol concentration; furthermore the white tea does not interfere with number of corpora lutea neither in the ovaries weight of superovulated rats.

Key-words: Wistar Rats. Blood Cell Count. Ovary. Corpus Luteum. Lipids. Body Weight. White Tea.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	08
1.1 Chá Branco	08
1.2 As Catequinas	09
1.3 Chá Branco na Reprodução	11
2 REFERÊNCIAS	15
ARTIGO CIENTÍFICO	22
NORMAS DO ARTIGO CIENTÍFICO	45

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Chá Branco

Experimentos realizados em laboratórios demonstraram que o consumo dos chás obtidos da planta *Camellia sinensis* tem oferecido proteção contra variedades de doenças. Os chás possuem grandes quantidades de flavonóides, como as catequinas, polifenóis e outros. Estes componentes auxiliam em inúmeros mecanismos que podem proporcionar diversos efeitos benéficos ao organismo (MAO et al., 2010).

O chá é considerado a segunda bebida mais consumida do mundo, sendo o chá branco originado da planta *Camellia sinensis*, assim como o chá verde e preto, porém estes chás diferem na forma como são produzidos e no conteúdo de polifenóis que neles contém, estes são responsáveis pela sua atividade fisiológica (ANGER; PETRE; CRANKSHAW, 2005).

Os principais efeitos benéficos do consumo dos chás da planta *Camellia sinensis* na saúde incluem a prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e osteoporose (YANG; LANDAU, 2000; LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001; HIGDON; FREI, 2003).

O chá branco é produzido uma vez ao ano e tem altas concentrações de catequinas. Ela é muito parecida com o chá verde, mas preparado de botões e folhas jovens da *Camellia sinensis*, colhida somente durante o início da primavera, antes dos botões serem completamente abertos, e por isso, a concentração de catequinas são maiores no chá branco que no chá verde que é preparado de folhas maduras, (HILAL; ENGELHARDT, 2007). Apesar de similar e com conteúdo fitoquímico bioativos maior, há menor quantidade de estudos com o chá branco que com o chá verde na literatura.

1.2 As Catequinas

As catequinas são componentes químicos dos polifenóis e são encontradas em abundância nos chás obtidos da planta *Camellia sinensis*. São elas: epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina (EGC) e epigalocatequina galato (EGCG). As catequinas possuem atividade antioxidante (STONER; MUKHTAR, 1995) que eficientemente eliminam as espécies de oxigênio reativo, por meio da inibição de enzimas pró-oxidantes e indução de enzimas anti-oxidantes (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

O EGCG e EGC tem efeito na indução da apoptose e na inibição do crescimento tumoral em células pulmonares humanas (YANG et al., 1998). A EGCG tem demonstrado induzir apoptose em vários linhagem de células, incluindo células do câncer de próstata (AHMAD et al., 1997).

As catequinas exercem efeitos de proteção vascular através de múltiplos mecanismos, incluindo anti-oxidativo, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anti-proliferativo, anti-trombótico e efeitos de perda lipídica (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997). Elas inibem as enzimas chaves na biossíntese de lipídios e reduzem a absorção intestinal lipídica, por meio do aumento do perfil lipídico do sangue (HIGDON; FREI, 2003).

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.

Os componentes fitoquímicos dos chás atuam no metabolismo por vários mecanismos 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).

As catequinas possuem amplo espectro antibacteriana para bactérias Gram negativas e fungos. A relação entre a catequina e a atividade bacteriana ocorre na seguinte ordem: ECG > EGCG > EGC > EC (ARAKAWA

et al., 2004). Além disso, uma investigação com EGCG revelou que a ação antibacteriana é baseada na injúria da membrana da bactéria (IKIGAI et al., 1993).

Estudos conduzidos com sistemas de cultivo celular e modelos animais, além de estudos epidemiológicos humanos, demonstraram que os polifenóis presentes no chá podem proporcionar proteção contra o 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; AHMAD; GUPTA; MUKHTAR, 2000; GUPTA et al., 2000; GUPTA et al., 2001; INOUE et al., 2001; SETIAWAN et al., 2001).

A afirmação que o consumo do chá auxilia na prevenção do câncer é mais bem suportada por evidências obtidas através de experimentos *in vitro* utilizando animais do que por evidências epidemiológicas (YANG; MALIAKAL; MENG, 2002; LAMBERT; YANG et al., 2003).

Um importante fato em favor do uso do chá da *Camellia sinensis* 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 muito este chá (MUIR et al., 1987).

Ao menos dois estudos epidemiológicos (JAIN et al., 1998) demonstram que as pessoas que regularmente consomem o chá têm uma menor incidência de câncer de próstata.

O EGCG é conhecido por inibir o crescimento tumoral por meio da inibição do fator de crescimento endotélio-vascular VEGF (JUNG et al., 2001; SARTIPPOUR et al., 2002). A alimentação oral de camundongos com polifenóis, 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 (MMP-2 e MMP-9) (ADHAMI; AHMAD; MUKHTAR, 2003). Além disso, o EGCG, que é abundante no chá branco, 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).

1.3 Chá Branco na Reprodução

Apesar dos muitos potenciais benefícios do consumo do chá branco, é importante avaliar possíveis consequências no organismo. O EGCG induz redução nas concentrações de hormônios sexuais esteróides (KAO; HIIPAKKA; LIAO, 2000), com possíveis efeitos negativos na eficiência reprodutiva. Estudos demonstram que o EGCG é um potente inibidor da 5 α -redutase em ensaios com células (LIAO; HIIPAKKA, 1995; HIIPAKKA et al., 2002). A enzima 5 α -redutase catalisa a conversão de testosterona a 5 α -dihidrotestosterona.

Basini, Bianco e Grasselli (2005) claramente demonstraram um efeito inibitório do EGCG na produção do E₂ (estradiol) e da P₄ (progesterona) pelas células da granulosa cultivadas *in vitro*. A esteroidogênese pode ser afetada pela inibição da biossíntese de colesterol, onde o EGCG inibe a esqualeno-epoxidase (ABE et al., 2000), a enzima atua na produção de colesterol. Os flavonóides afetam também a reprodução por diminuir a atividade de várias enzimas esteroidogênicas (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000) como a P450_{scc}, a 3 β -HSD (3 β -hidroxi-desidrogenase) (OHNO et al., 2002) e a aromatase (GOODIN; ROSENGREN, 2003).

O EGCG diminui a expressão gênica da proteína quinase C (CPK; ADHAMI; AHMAD; MUKHTAR, 2003). A CPK está envolvida em diversas funções de divisão celular como diferenciação, controle de crescimento, promoção tumoral e morte celular (LIVNEH; FISHMAN, 1997). A CPK também 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 CPK no retomada da meiose em oócitos bovinos, demonstrando que a CPK acelera a progressão da meiose independentemente 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 da planta *Camellia sinensis*,

também estão envolvidas no controle da atividade reprodutiva feminina (OYAWOYE et al., 2003).

Os polifenóis quando administrados com água para camundongos, em uma quantidade equivalente a 6 copos de chá 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).

Assim como o EGCG inibe a angiogênese e o crescimento tumoral por meio da inibição da produção de VEGF (JUNG et al., 2001; SARTIPPOUR et al., 2002), essa catequina também inibe a produção de VEGF pelas células da granulosa de suínos e a proliferação dessas células cultivadas *in vitro* (BASINI; BIANCO; GRASSELLI, 2005).

Os VEGFs exercem importante função na angiogênese e na vasculogênese (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; SUGINO et al., 2001; SHALABY et al., 1995). O suplemento vascular é um requerimento fundamental para as funções reprodutivas (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; GOTH et al., 2003). Os órgãos reprodutivos femininos (ovários e útero) são alguns dos poucos tecidos adultos que exibem crescimento e regressão periódicos e dinâmicos (REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992). Portanto, a angiogênese ocorre como um processo fisiológico nos órgãos reprodutivos femininos (FINDLAY, 1986; KLAGSBRUN; D'AMORE, 1991; REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992).

Desta forma, os VEGFs estão envolvidos na reprodução, tanto no desenvolvimento dos folículos e do corpo lúteo, quanto nas mudanças na vascularização uterina (DANFORTH et al., 2003; DISSEN et al., 1994; KACZMAREK; SCHAMS; ZIECIK, 2005; STOUFFER et al., 2001; FERRARA et al., 1998; BOSQUIAZZO et al., 2007). A angiogênese ocorre regularmente no endométrio de fêmeas adultas com as fases do ciclo estral (HERYANTO; ROGERS, 2002).

A relação entre a função endócrina e angiogênese tem sido observada durante o ciclo estral (KARURI; KUMAR; MUKHOPADHYAY, 1998).

O quantidade de RNAm do VEGF aumenta rapidamente no útero seguido do tratamento por estrógeno (CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993; HYDER et al., 2000). Este efeito sugere que o estrógeno regula a permeabilidade vascular dos vasos sanguíneos uterinos através de modulação da expressão do VEGF. Karuri, Kumar e Mukhopadhyay (1998) demonstrou que há um aumento de RNAm do VEGF no tecido uterino de ratas no proestro, coincidindo com o maior aumento nas concentrações séricas de 17β -estradiol. Também foi demonstrado que no útero de ratas, o estradiol induz a produção de VEGF via indução da produção do Fator Induzido por Hipóxia 1α (HIF- 1α) (KAZI; JONES; KOOS, 2005; DE FÁTIMA; PAPA, 2010).

A angiogênese no útero de roedores é também regulada pela progesterona por meio do estímulo da proliferação celular do endotélio e da expressão do VEGF (CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993; MA et al., 2001; WALTER; ROGERS; GIRLING, 2005). Baseado nestes resultados, a expressão de VEGF está sobre o controle de ambos os hormônios esteroides (progesterona e estradiol).

Fatores angiogênicos, como o VEGFs, são importantes na foliculogênese, 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 inibindo a ovulação (IIJIMA et al., 2005). Estudos com imunohistoquímica, em ovários de ratas, têm localizado VEGF e os seus receptores em células da pré-granulosa, células da granulosa, células da teca e no citoplasma de oócitos de folículos pré-antrais e antrais (MCFEE et al. 2009).

A inadequada função luteal também tem sido associada com diminuição da vascularização luteal, e a redução do fluxo sanguíneo ovariano têm 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 protéica de VEGF no corpo lúteo nas diferentes fases do ciclo estral de búfalas.

Em vista da importância dos hormônios esteroides, da angiogênese na função ovariana e uterina, do papel dos VEGFs no sistema reprodutivo, qualquer substância que possa alterar a ação destes fatores deve ser estudada, a fim de esclarecer a sua influência na reprodução.

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.
- ANGER, D. L.; PETRE, M. A.; CRANKSHAW, D. J. Heteroactivation of cytochrome P450 1A1 by teas and tea polyphenols. **British Journal of Pharmacology.**, v. 145, p. 926-933, 2005.
- ARAKAWA, H. et al. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 3, p. 277-281, 2004.
- 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. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 243–256, 2005.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 305-317, 2005.
- 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.
- BOSQUIAZZO, V. L. et al. Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. **Reproduction**, v. 133, p. 1045–1055, 2007.

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.

CULLINAN-BOVE. K.; KOOS, R. D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. **Endocrinology**, v. 133, p. 829–837, 1993.

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.

DE FÁTIMA, L. A.; PAPA, P. C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, v. 4. p. 22-27, 2010.

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.

FERRARA, N. et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 4, p. 336-340, 1998.

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

FINDLAY, J. K. Angiogenesis in reproductive tissues. **Journal of Endocrinology**, 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.; WULFF, C. Angiogenesis in the primate ovary. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 13, p. 557-66, 2001.

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.

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.

GOTH, M. I. et al. Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, p. 98–106, 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 androgeninsensitive 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. U S A**, v. 98, p. 10350–10355, 2001.

HERYANTO, B.; ROGERS, P. A. Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. **Reproduction**, v. 123, p. 107–113, 2002.

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.

HILAL, Y.; ENGELHARDT, U. Characterization of white tea: comparison to green and black tea. **J. Vergbr.**, v. 2, p. 414–421, 2007.

HYDER, S. M. et al. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. **Cancer Research**, v. 60, p. 3183–3190, 2000.

IJJIMA, 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. 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.

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.** Canadá: 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.

KARURI, A. R.; KUMAR, A. M.; MUKHOPADHYAY, D. Differential expression and selective localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 159, p. 489–499, 1998.

KAZI, A. A.; JONES, J. M.; KOOS, R. D. Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 8, p. 2006–2019, 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.

KLAGSBRUN, M. A.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annual Review of Physiology**, v. 53, p. 217–239, 1991.

LAMBERT, J. D.; YANG, C. S. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. **Mutat. Res.**, v. 523–524, p. 201–208, 2003.

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

LIAO, S.; KAO, Y. H.; HIIPAKKA, R. A. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. **Vitam. Horm.**, v. 62, p. 1–94, 2001.

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

MAO, J. T. et al. White Tea Extract Induces Apoptosis in Nonsmall Cell Lung Cancer Cells– The Role of PPAR- γ and 15-Lipoxygenases. **Cancer Prev. Res.**, v. 3, n. 9, p. 1132-1140, 2010.

MCFEE, R. et al. Inhibition 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.

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.

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

MUIR, C. et al. Cancer Incidence in five continents. **IARC Scientific Publications**, Lyon, v. 5, n. 88, 1987.

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

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

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

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. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, p. 379–389, 2007.

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

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

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.

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. 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**, v. 22, p. 51-72, 2002.

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

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

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.

WALTER, L. M.; ROGERS, P. A.; GIRLING, J. E. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomized mice. **Reproduction**, v. 129, p. 765–777, 2005.

WANG, Z. Y. et al. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. **Cancer Res.**, v. 52, p. 665.7–6665, 1992.

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.

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

YANG, C. S.; MALIAKAL, P.; MENG, X. Inhibition of carcinogenesis by tea. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 25–54, 2002.

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, M. et al. Effects of green tea on carcinogen-induced hepatic CYP1As in C57BL/6 mice. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 12, p. 391–395, 2003.

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

1 ¹Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP), Brasil

2 ²Universidade de São Paulo (USP), São Paulo (SP), Brasil

3 **Título**

4 **Ingestão prolongada de chá branco em ratas Wistar superovuladas**

5 Deyvid Parreira Vieira¹, Samuel Aparecido Freire¹, Cyntia dos Santos Monterio¹, Caliê

6 Castilho¹, Cecília Braga Laposy¹, Rosa Maria Barilli Nogueira¹, Luciana Guaberto

7 Machado¹, Rogério Giuffrida¹, Paula de Carvalho Papa² e Ines Cristina Giometti¹

8

9 **Resumo**

10 O chá branco é uma bebida saudável, porém este chá pode interferir em vários fatores de
11 crescimento envolvidos na reprodução e no metabolismo. Portanto, este trabalho teve
12 como objetivo verificar o efeito do consumo prolongado de chá branco no metabolismo,
13 no número de corpos lúteos e no peso dos ovários de ratas superovuladas. Foram
14 utilizados dois grupos de ratas: controle (n=30) que recebeu água e o grupo que recebeu
15 apenas chá branco para beber (n=30). O experimento durou 3 meses, o consumo de
16 líquido e de ração foi verificado. Ao final de cada mês, 10 ratas de cada grupo eram
17 superovuladas, com 150 UI/Kg de eCG e mais 150UI/Kg de hCG depois de 48 horas.
18 Após 48 horas da superovulação, as ratas foram pesadas, sacrificadas, os ovários foram
19 pesados e os corpos lúteos contados. O sangue dos animais foi colhido para hemograma
20 e bioquímica sérica. A análise estatística foi de ANOVA seguida do teste de Tukey,
21 foram consideradas diferenças estatísticas quando $P < 0,05$. O grupo tratado com chá
22 branco apresentou maior ingestão de ração ($39,63 \pm 3,91$ g) em relação ao controle
23 ($37,19 \pm 4,00$ g; $P < 0,05$), porém não houve diferença no peso dos animais, o grupo
24 tratado apresentou menor concentração de colesterol ($32,02 \pm 9,62$ mg/dL) que o grupo

25 controle ($76,70 \pm 10,41$ mg/dL; $P < 0,05$). Não houve diferença no número de corpos
26 lúteos e peso dos ovários entre os grupos. Conclui-se que o consumo de chá branco evita
27 o ganho excessivo de peso dos animais, diminui a concentração sérica de colesterol e
28 não interfere no número de corpos lúteos e no peso dos ovários de ratas superovuladas.
29 Palavras-chave: hemograma, ovário, corpo lúteo, lipídios, peso corporal, chá branco

30

31 **Abstract**

32 The white tea in a healthy drink, but this tea can interfere in some growth factors
33 involved in the reproduction and in the metabolism. So, the aim of this work was to
34 verify the effect of the white tea consumption in the metabolism, number of corpora
35 lutea and in the weight of superovulated rats. There were utilized two groups of rats:
36 control ($n=30$) that received water and the group that received only white tea to drink
37 ($n=30$). The experiment lasts three months and the liquid and ration consumption were
38 verified. In the end of each month, 10 rats of each group were superovulated with 150
39 UI/Kg of eCG, and 150UI/Kg of hCG 48 hours later. After 48 hours of the
40 superovulation, the rats were weighted, sacrificed and the ovaries were weighted and the
41 corpora lutea counted, besides the blood of animals were collected for hemogram and
42 serum biochemistry. Não houve diferença no número de corpos lúteos e peso dos
43 ovários entre os grupos. The statistical analysis was ANOVA test followed of Tukey
44 analysis, differences were considered when $P < 0.05$. The group treated with white tea
45 showed higher ingestion of ration (39.63 ± 3.91 g) than control group (37.19 ± 4.00 g;
46 $P < 0.05$). However there wasn't any difference in the animals' weight. Moreover, the
47 treated group presented lower cholesterol concentration (32.02 ± 9.62 mg/dL) than
48 control group (76.70 ± 10.41 mg/dL; $P < 0.05$). No one statistical difference was

49 observed in the number of corpora lutea, neither in the ovaries weight between the
50 groups. The conclusion that white tea inhibis the excessive weight gain and decreases
51 the cholesterol concentration; furthermore the white tea does not interfere with number
52 of corpora lutea neither in the ovaries weight of superovulated rats.

53 Key-words: hemogram, ovary, corpus luteum, lipids, body weight, white tea.

54

55 **Revisão de Literatura**

56 Os órgãos reprodutivos da fêmea exibem crescimento e regressão periódicos,
57 acompanhados por mudanças no seu grau de fluxo sanguíneo. Não é surpresa, portanto,
58 que eles são alguns dos poucos tecidos adultos nos quais a angiogênese ocorre como um
59 processo fisiológico (Fraser e Wulff 2001; Giometti *et al.* 2009). Tem sido demonstrado
60 que os folículos ovarianos e o corpo lúteo contem e produzem fatores angiogênicos. Os
61 principais fatores angiogênicos são os fatores de crescimento endotélio-vascular, VEGFs
62 (Ferrara e Davis-Smyth 1997; Sugino *et al.* 2001; Shalaby *et al.* 1995). Estudos
63 demonstram que algumas catequinas presentes nos chás provenientes da planta *Camellia*
64 *sinensis* inibem os VEGFs (Jung *et al.* 2001; Sartippour *et al.* 2002). Estudos
65 evidenciaram que o bloqueio da atividade biológica do VEGF, leva a interrupção da
66 foliculogênese e da formação do corpo lúteo (Danforth *et al.* 2003; Zimmermann *et al.*
67 2001).

68 Uma das catequinas presentes no chá branco, a epigallocatequina galato (EGCG),
69 induz a redução na concentração de hormônios sexuais esteróides (Kao *et al.* 2000),
70 com possíveis efeitos negativos na eficiência reprodutiva. Basini *et al.* (2005)
71 demonstraram um efeito inibitório da EGCG na produção do Estradiol e Progesterona
72 pelas células da granulosa cultivadas *in vitro*. Estudos demonstram que a EGCG é um
73 potente inibidor de enzimas-chaves da reprodução, como a 5 α -redutase (Liao e Hiipakka
74 1995; Hiipakka *et al.* 2002), a P450_{scc}, a 3 β -HSD (3 β -hidroxi-desidrogenase; Ohno *et*
75 *al.* 2002) e a aromatase (Goodin e Rosengren 2003).

76 A EGCG diminui também a expressão gênica da proteína quinase C (PKC;
77 Adhami *et al.* 2003), envolvida na regulação da meiose de oócitos (Bertagnolli *et al.*
78 2004), inibe as espécies de oxigênio reativo (ROS), envolvidas no controle da atividade
79 reprodutiva feminina (Oyawoye *et al.* 2003). Os polifenóis presentes no chá branco

80 diminuem o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) do soro (Gupta *et al.*
81 2001), que está envolvido tanto na foliculogênese (Schams *et al.*, 2002) quanto no
82 desenvolvimento do corpo lúteo (Berisha e Schams 2005).

83 O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do consumo prolongado de chá
84 branco no metabolismo, no número de corpos lúteos e no peso dos ovários de ratas
85 superovuladas.

86

87 **Material e Métodos**

88 O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo
89 CEUA número 336/10). Foram utilizadas 60 ratas Wistar, em idade reprodutiva (11
90 semanas), peso médio de 150g, nulíparas, divididas em dois grupos com 30 animais
91 cada, provenientes do Biotério Central da UNOESTE. As ratas foram pesadas,
92 identificadas e então, mantidas em condições de luminosidade controlada (12 horas
93 luz/12 horas escuro) em caixas tamanho padrão utilizadas pelo biotério, contendo 5
94 animais por caixa, com maravalha, bebedouro e comedouro com ração (Supralab[®], Raça
95 Forte). Um grupo recebeu água *ad libitum* no bebedouro e o outro, somente chá branco
96 para beber, em uma situação experimental de ingestão prolongada como realizado por
97 Yang *et al.* (2003) e Niwattisaiwong *et al.* (2004). O chá foi preparado em uma
98 concentração de 2,5% pela adição de água fervente no extrato puro de chá branco e
99 então filtrado.

100 O consumo de líquido foi verificado diariamente através da medição do volume
101 restante no bebedouro. Os animais recebiam 300 g ração a cada dois dias e o consumo
102 era verificado por meio da pesagem do volume restante da ração no comedouro. O
103 consumo de ração e líquido foi verificado durante todo o período experimental. O
104 tratamento com chá teve duração total de 3 meses, ao final de 30 dias, 10 ratas de cada

105 grupo (controle e tratados) foram superovuladas. A superovulação seguiu o protocolo
106 hormonal de superovulação proposto por Kito *et al.* (2010), com uma injeção intra-
107 peritoneal de 150 UI/Kg de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon[®] Intervet,
108 Brasil) e 48 horas após, uma injeção intra-peritoneal de 150 UI/Kg de gonadotrofina
109 coriônica humana (hCG; Vetecor[®] Hertape Calier, Brasil). Após 48h da aplicação do
110 hCG, as ratas foram novamente pesadas, anestesiadas com éter e induzidas a morte por
111 exsanguinação. Os ovários foram pesados em balança de alta precisão, a seguir os
112 corpos lúteos foram dissecados com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e contados
113 utilizando estereomicroscópio. O sangue foi colhido por punção cardíaca e utilizado
114 para realizar hemograma e bioquímica sérica.

115 Utilizou-se tubos a vácuo com 10% de EDTA, com uso de contador automático
116 (Sysmex-Roche[®] Sysmex, Brasil). A contagem diferencial de leucócitos foi feita por
117 meio de esfregaço sanguíneo corado por coloração rápida (Diff-Quick), segundo Jain
118 (1993). Quantificou-se o fibrinogênio plasmático utilizando a técnica de precipitação
119 pelo calor preconizado por Kaneko *et al.* (2008). As proteínas plasmáticas foram
120 mensuradas por refratometria. O colesterol total, triglicerídeos e glicose foram
121 determinados com a utilização de kits bioquímicos (Labtest[®]) e analisador semi-
122 automático (Quick-Lab-Drake[®]).

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

126 Para comparar os parâmetros das ratas mensurados nos diferentes momentos
127 para os grupos controle e tratado empregou-se o teste de análise de variância para dados
128 pareados (ANOVA), com contrastes pelo método de Tukey-Kramer. Para comparar os
129 valores médios dos parâmetros analisados entre os grupos controle e experimental

130 empregou-se o teste t não pareado. Diferenças estatísticas significativas foram
131 consideradas quando $P < 0,05$.

132 Para os parâmetros que não tiveram uma distribuição normal (fibrinogênio), a
133 análise utilizada foi não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) entre os momentos de
134 cada grupo e o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos em cada momento.

135

136 Resultados

137 As médias de consumo de líquido e de ração dos grupos controle e tratado com
138 chá branco durante o período do experimento (3 meses) estão apresentadas na Tabela 1.
139 O grupo do chá branco ingeriu maior quantidade de líquido em todos os meses de
140 tratamento e houve um aumento no consumo de chá no grupo tratado a partir do
141 segundo mês ($P < 0,05$). O grupo tratado com chá branco apresentou maior ingestão de
142 ração que o grupo controle no segundo e terceiro meses do experimento ($P < 0,05$).

143

144 **Tabela 1** – Médias e desvios-padrões da ingestão de líquido e ração pelas ratas tratadas
145 com água (Controle) e chá branco (CB) por 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
	CB	30,85±2,22 ^{Ba}	32,79±2,77 ^{Bb}	33,47±2,42 ^{Bb}	32,37±2,70 ^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
	CB	37,09±4,67 ^{Aa}	42,27±1,92 ^{Bb}	39,51±2,85 ^{Bab}	39,63±3,91 ^B

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

148

149 As médias dos pesos das ratas dos mesmos grupos nos dias 0, 30, 60 e 90 estão
150 representadas na Tabela 2. O peso das ratas não apresentou diferença significativa
151 ($P > 0,05$) entre o grupo tratado (chá branco) e controle. Porém, nos dois grupos foi
152 observado um aumento significativo de peso das ratas no decorrer do experimento.

153

154 **Tabela 2** – Médias e desvios-padrões do peso das ratas (n=10) tratadas com água
155 (Controle) e chá branco (CB) no início do experimento (dia zero), aos 30, 60 e 90 dias.

	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}
	CB	184,90±22,08 ^{Aa}	214,00±21,84 ^{Ab}	224,40±21,63 ^{Abc}	236,70±23,58 ^{Ac}

156 Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras
157 minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$).
158

159 Os pesos dos pares de ovários (n=10 em cada momento e em cada grupo) e os
160 corpos lúteos contados em ambos os ovários estão representados na Tabela 3. Houve
161 diferença ($P<0,05$) nos pesos dos ovários entre os grupos aos 60 dias do experimento, o
162 grupo que ingeriu chá branco apresentou ovários mais pesados neste momento. Porém
163 não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado para o número de
164 corpos lúteos contados em ambos os ovários superovulados.

165

166 **Tabela 3** – Médias e desvios-padrões do número de corpos lúteos e peso dos ovários de
167 ratas (n=10) tratadas com água (Controle) e chá branco (CB) aos 30, 60 e 90 dias.

Parâmetro	Grupo	Momentos (dias)		
		30	60	90
Peso dos ovários (g)	Controle	0,30±0,10 ^{Aa}	0,19±0,06 ^{Ab}	0,21±0,05 ^{Ab}
	CB	0,30±0,10 ^{Aa}	0,24±0,06 ^{Ba}	0,24±0,21 ^{Aa}
Número de corpos lúteos	Controle	61,10±10,94 ^{Aa}	64,90±27,77 ^{Aa}	62,30±20,17 ^{Aa}
	CB	64,10±25,02 ^{Aa}	67,60±20,58 ^{Aa}	43,80±20,08 ^{Aa}

168 Valores na mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras
169 minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$).
170

171 A tabela 4 mostra as médias e os desvios padrões do hemograma das ratas do
172 grupo controle e tratado com chá branco aos 30, 60 e 90 dias. Aos 30 dias de
173 experimento observou-se no grupo controle maior número de hemácias, maior
174 hematócrito, maior CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e
175 menor HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) que o grupo tratado. Aos 60 dias
176 verificou-se diferença significativa entre os grupos somente no valor de VCM (Volume

177 Corpuscular Médio) que foi maior no grupo controle. Aos 90 dias não houve diferença
 178 entre os grupos para nenhum dos parâmetros do hemograma. Houve aumento do
 179 número de eritrócitos no grupo tratado com chá branco no segundo mês de experimento
 180 e diminuição do HCM do grupo tratado no terceiro mês de experimento comparado com
 181 o primeiro mês ($p < 0,05$).

182

183 **Tabela 4** – Médias e desvios-padrões dos parâmetros analisados no eritrograma de ratas
 184 (n=10) tratadas com água (Controle) e chá branco (CB) aos 30, 60 e 90 dias.

Parâmetro	Grupo	Momentos (dias)		
		30	60	90
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Controle	$8,37 \pm 0,21^{Aa}$	$7,84 \pm 0,90^{Aa}$	$8,33 \pm 0,76^{Aa}$
	CB	$7,72 \pm 0,56^{Ba}$	$8,34 \pm 0,46^{Ab}$	$8,10 \pm 0,39^{Aab}$
Hemoglobina (g/dL)	Controle	$16,19 \pm 0,35^{Aa}$	$15,55 \pm 1,76^{Aa}$	$16,26 \pm 1,70^{Aa}$
	CB	$15,40 \pm 1,23^{Aa}$	$16,24 \pm 0,79^{Aa}$	$15,59 \pm 0,59^{Aa}$
Hematócrito (%)	Controle	$45,48 \pm 1,43^{Aa}$	$43,53 \pm 4,63^{Aa}$	$45,81 \pm 4,99^{Aa}$
	CB	$42,31 \pm 3,02^{Ba}$	$45,06 \pm 2,26^{Aa}$	$43,68 \pm 1,71^{Aa}$
VCM (fL)	Controle	$54,69 \pm 1,68^{Aa}$	$55,63 \pm 1,48^{Aa}$	$54,96 \pm 1,34^{Aa}$
	CB	$54,85 \pm 0,79^{Aa}$	$54,08 \pm 0,89^{Ba}$	$53,98 \pm 1,31^{Aa}$
HCM (pg)	Controle	$19,35 \pm 0,43^{Aa}$	$19,85 \pm 0,47^{Aa}$	$19,50 \pm 0,46^{Aa}$
	CB	$19,96 \pm 0,40^{Ba}$	$19,50 \pm 0,41^{Aab}$	$19,27 \pm 0,61^{Ab}$
CHCM (%)	Controle	$35,63 \pm 0,61^{Aa}$	$35,70 \pm 0,76^{Aa}$	$35,51 \pm 0,40^{Aa}$
	CB	$36,36 \pm 0,36^{Ba}$	$36,06 \pm 0,53^{Aa}$	$35,70 \pm 0,69^{Aa}$
PPT (g/dL)	Controle	$6,98 \pm 0,33^{Aa}$	$7,00 \pm 0,37^{Aa}$	$6,93 \pm 0,44^{Aa}$
	CB	$7,03 \pm 0,59^{Aa}$	$6,89 \pm 0,36^{Aa}$	$7,02 \pm 0,29^{Aa}$
Fibrinogênio (mg/dL)	Controle	$200,00 \pm 0,00^{Aa}$	$250,00 \pm 92,58^{Aa}$	$222,22 \pm 66,67^{Aa}$
	CB	$275,00 \pm 103,51^{Aa}$	$222,22 \pm 66,67^{Aa}$	$311,11 \pm 105,41^{Aa}$

185 VCM, corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina
 186 corpuscular média; PPT, proteína plasmática total. Valores na mesma coluna seguidos de letras
 187 maiúsculas iguais e valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem
 188 estatisticamente ($p > 0,05$).

189

190 Quando foi avaliado o leucograma dos animais (tabela 5), observou-se aumento
 191 significativo ($P < 0,05$) no número de neutrófilos segmentados e de monócitos no grupo
 192 tratado com chá branco durante o experimento, porém esse grupo não diferiu ($P > 0,05$)
 193 grupo controle em nenhum dos momentos avaliados.

194

195 **Tabela 5** – Médias e desvios-padrões dos parâmetros avaliados no leucograma de ratas
 196 (n=10) tratadas com água (Controle) e chá branco (CB) aos 30, 60 e 90 dias.

Parâmetro	Grupo	Momentos (dias)		
		30	60	90
Leucócitos (células/mm ³)	Controle	6.512,5 ± 2.692,5 ^{Aa}	5.937,5 ± 3.046,7 ^{Aa}	6.888,9 ± 2.713,6 ^{Aa}
	CB	5.787,5 ± 1.345,3 ^{Aa}	7.511,1 ± 2.869,0 ^{Aa}	8.244,4 ± 2.659,0 ^{Aa}
Segmentados (células/mm ³)	Controle	1.104,4 ± 828,4 ^{Aa}	1.255,3 ± 769,3 ^{Aa}	1.753,4 ± 545,4 ^{Aa}
	CB	886,8 ± 367,6 ^{Aa}	1.650,8 ± 856,2 ^{Ab}	2.248,7 ± 1.116,1 ^{Ab}
Eosinófilos (células/mm ³)	Controle	220,4 ± 223,6 ^{Aa}	213,4 ± 226,2 ^{Aa}	231,3 ± 208,5 ^{Aa}
	CB	113,9 ± 143,3 ^{Aa}	210,4 ± 169,1 ^{Aa}	269,1 ± 204,2 ^{Aa}
Linfócitos (células/mm ³)	Controle	4.968,8 ± 1.764,5 ^{Aa}	4.277,4 ± 2.056,2 ^{Aa}	4.636,4 ± 2.128,0 ^{Aa}
	CB	4.644,0 ± 1.030,3 ^{Aa}	5.483,3 ± 1.978,3 ^{Aa}	5.387,2 ± 1.635,6 ^{Aa}
Monócitos (células/mm ³)	Controle	219,0 ± 212,1 ^{Aa}	179,4 ± 195,9 ^{Aa}	262,4 ± 188,4 ^{Aa}
	CB	135,0 ± 94,8 ^{Aa}	156,1 ± 108,9 ^{Aa}	339,4 ± 154,6 ^{Ab}

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

199

200 Com relação ao perfil bioquímico, observou-se um aumento significativo de
 201 uréia no grupo tratado com chá branco ao final do terceiro mês de experimento. Houve
 202 uma redução da creatinina em ambos os grupos aos 60 dias de experimento comparado
 203 com os demais momentos. O colesterol e os triglicerídeos séricos foram maiores no
 204 grupo tratado com chá branco comparado com o controle aos 60 dias de experimento
 205 (p<0,05). Porém, o colesterol diminuiu no grupo tratado no terceiro mês de
 206 experimento, enquanto no grupo controle aumentou, levando a uma diferença estatística
 207 significativa entre os grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada na dosagem
 208 sérica de glicose dos animais (tabela 6).

209 **Tabela 6** – Médias e desvios-padrões dos parâmetros avaliados na bioquímica sérica de
 210 ratas (n=10) tratadas com água (Controle) e chá branco (CB) aos 30, 60 e 90 dias.

Parâmetro	Grupo	Momentos (dias)		
		30	60	90
Uréia (mg/dL)	Controle	46,07 ± 14,07 ^{Aa}	51,72 ± 11,62 ^{Aa}	46,31 ± 12,29 ^{Aa}
	CB	40,26 ± 11,76 ^{Aa}	47,10 ± 10,63 ^{Aa}	67,79 ± 12,22 ^{Bb}
Creatinina (mg/dL)	Controle	0,52 ± 0,07 ^{Aa}	0,43 ± 0,05 ^{Ab}	0,47 ± 0,09 ^{Aab}
	CB	0,47 ± 0,03 ^{Aa}	0,41 ± 0,03 ^{Ab}	0,48 ± 0,05 ^{Aa}
Colesterol (mg/dL)	Controle	50,85 ± 17,13 ^{Aa}	38,17 ± 9,15 ^{Aa}	76,70 ± 10,41 ^{Ab}
	CB	52,48 ± 16,88 ^{Aa}	48,88 ± 8,01 ^{Ba}	32,02 ± 9,62 ^{Bb}
Triglicerídeos (mg/dL)	Controle	158,20 ± 52,44 ^{Aa}	108,60 ± 54,82 ^{Aa}	140,30 ± 53,75 ^{Aa}
	CB	132,20 ± 44,62 ^{Aa}	203,00 ± 104,26 ^{Ba}	144,50 ± 77,37 ^{Aa}
Glicose (mg/dL)	Controle	122,64 ± 23,59 ^{Aa}	123,70 ± 15,51 ^{Aa}	128,40 ± 12,92 ^{Aa}
	CB	126,89 ± 19,19 ^{Aa}	123,00 ± 16,08 ^{Aa}	139,60 ± 20,52 ^{Aa}

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

213 **Discussão**

214 No presente trabalho, observou-se nos três meses de experimento maior
215 consumo de líquido pelas ratas que ingeriram o chá branco quando comparadas com o
216 grupo que ingeriu água como fonte de líquido. Também foi observado que o consumo
217 de chá branco aumentou no decorrer do experimento. O aumento do consumo do chá
218 pode ser devido à presença de cafeína no chá branco, a cafeína pode gerar uma
219 dependência quando ingerida com muita frequência (Temple 2009). Além disso,
220 Maughan e Griffin (2003) sugerem que o consumo de cafeína tem um efeito diurético
221 levando a um aumento do consumo de líquido. No presente experimento, os resultados
222 obtidos de ingestão de líquidos foram semelhantes aos de Islam (2011). Quando
223 administrado chá branco ao invés de água, observou-se um maior consumo de líquido e
224 este fato foi atribuído aos efeitos da cafeína e do sabor do chá.

225 O consumo de ração foi maior no grupo tratado com chá branco a partir do
226 segundo mês de tratamento. Isto indica que o chá branco não diminui o apetite dos
227 animais, esses resultados foram similares aos obtidos por Islam (2011), porém este
228 pesquisador trabalhou com ratos diabéticos. Não foi encontrado na literatura trabalhos
229 de saciedade utilizando o chá branco. Vale informar que nenhum efeito de saciedade foi
230 observado em pessoas obesas tratadas por 12 semanas com cápsulas de extrato de chá
231 verde (Auvichayapat *et al.* 2008), que é um chá muito semelhante ao chá branco em
232 suas catequinas, embora sejam processados de maneira diferente e o chá branco possua
233 mais catequinas que o chá verde (Venditti *et al.* 2010; Hilal e Engelhardt 2007)

234 As ratas dos dois grupos (tratado com chá e controle) ganharam peso nos três
235 meses de experimento, possivelmente devido ao crescimento dos animais. Porém, um
236 importante achado deste trabalho foi que apesar do grupo das ratas tratadas com chá
237 branco apresentarem um consumo maior de ração, não houve maior ganho de peso

238 destes animais quando comparados ao controle. A cafeína presente no chá branco pode,
239 em parte, ser responsável por este resultado, pois é termogênica e estimula a oxidação
240 de gordura (Dulloo *et al.* 1989; Astrup *et al.* 1990; Dulloo *et al.* 1992; Bracco *et al.*
241 1995). E este o chá branco contém maior quantidade de cafeína que o chá verde (Hilal e
242 Engelhardt 2007; Alcazar *et al.* 2005). A cafeína não deve ser a única responsável por
243 este achado, já que tem sido reportado que o extrato de chá verde contendo cafeína e
244 catequinas tem efeito termogênico maior que a cafeína na mesma concentração (Dulloo
245 *et al.* 1999), provavelmente as catequinas, presentes também no chá branco, tenham
246 efeito no peso corporal. Nas literaturas consultadas não foram encontrados estudos para
247 verificar o efeito do chá branco na termogênese ou no peso corporal.

248 As catequinas inibem a enzima catecol-orto-metiltransferase (Borchardt e Huber
249 1975) que degrada norepinefrina. Este neurotransmissor tem importante papel no
250 controle da termogênese e na oxidação de gordura, é provável que as catequinas
251 aumentem o efeito da norepinefrina na termogênese e/ou no metabolismo de gordura
252 (Dulloo *et al.*, 1999). Estudos conduzidos por 3 meses ou mais, demonstram que o
253 consumo de catequinas do chá verde induz uma notável redução no peso corporal e na
254 gordura corporal (Hase *et al.* 2001; Chantre e Lairon 2002; Nagao *et al.* 2001; Nagao *et*
255 *al.* 2005; Tsuchida *et al.* 2002) além de aumento no gasto energético (Harada *et al.*
256 2005).

257 Alguns trabalhos demonstram que as catequinas presentes nos chás da planta
258 *Camellia sinensis* podem interferir na reprodução (Kao *et al.* 2000; Basini *et al.* 2005;
259 Liao e Hiipakka 1995; Hiipakka *et al.* 2002). Neste estudo não foi observada diminuição
260 no peso dos ovários e no número de corpos lúteos de ratas superovuladas quando
261 tratadas com o chá branco. Porém, mais estudos devem ser realizados para verificar se o

chá branco interfere na reprodução, pois outros parâmetros reprodutivos devem ser estudados e avaliados além da formação de corpos lúteos.

A administração de hCG em ratas e camundongas impúberes determina uma resposta biológica que inclui indução da ovulação, hiperemia ovariana, aumento de peso ovariano e aumento do peso uterino (Bertan *et al.* 2006). No presente trabalho a média absoluta de peso dos pares de ovários foi de 0,23 g para o grupo controle e de 0,26 g para o grupo tratado, ambos os grupos foram superovulados, portanto, não se pode afirmar se o tratamento hormonal aumentou o peso dos ovários. Os valores obtidos neste experimento foram similares aos encontrados em outros trabalhos, sem a utilização de protocolo superovulatório (Kuntze *et al.* 2012, Sher *et al.* 2003).

Hapon *et al.* (2010) contaram o número de oócitos recuperados no oviduto e o número de corpos lúteos de ratas ciclando fisiologicamente e encontraram uma média de 12 oócitos e 14 corpos lúteos. Quando as ratas são superovuladas com 20UI de eCG e 20UI de hCG, há uma hiperestimulação ovariana, levando a um aumento no tamanho dos ovários, dos folículos antrais e dos corpos lúteos (Kramer *et al.* 1990). Van Cappellen *et al.* (1997) conseguiram uma superovulação em ratas com uma média de $43,5 \pm 3,4$ corpos lúteos por rata tratada com doses decrescentes de rhFSH (hormônio folículo estimulante recombinante de humanos). Engelbregt *et al.* (2002) utilizando 50 UI de eCG ao primeiro ciclo obteve superovulação com uma média de 18 ± 1 corpos lúteos/rata. A média de corpos lúteos obtidas nesta presente pesquisa foi de 60,63 corpos lúteos/rata, utilizando o mesmo protocolo de superovulação de Kito *et al.* (2010), o número de corpos lúteos encontrados confirma que as ratas utilizadas responderam à superestimulação ovariana.

Existem vários métodos superovulatórios descritos para ratas, como a injeção contínua de gonadotropina (Armstrong e Opavsky 1988), o eCG tem sido largamente

287 utilizado para induzir a ovulação em ratas imaturas e para superovulação de ratas
288 maduras (McCann *et al.* 1974). A atividade deste hormônio é espécie-dependente e
289 comparável às funções dos hormônios FSH e/ou LH (hormônio luteinizante). O eCG
290 pode induzir estimulação gonadotrópica completa do trato reprodutivo (Moore e Ward
291 1980).

292 Entre esses métodos, a injeção de eCG combinada com hCG tem sido o método
293 mais prático e econômico para superovulação quando aplicado em idades diferentes de
294 ratas Wistar (Mukumoto *et al.* 1995, Sotomaru *et al.* 2005, Kon *et al.* 2005, Popova *et*
295 *al.* 2005, Kagabu e Umezu 2006).

296 A idade interfere no tratamento superovulatório (Kito *et al.* 2010). O número de
297 fêmeas que respondem ao tratamento hormonal é menor em fêmeas imaturas (de 3 a 7
298 semanas de idade) que em fêmeas mais velhas (de 8 a 9 semanas de idade), e o número
299 de oócitos ovulados também é menor nas fêmeas mais jovens (12,2 oócitos/fêmea),
300 enquanto em fêmeas de 8 e 9 semanas de idade é de 31,4 3 e 43,9 oócitos/fêmea,
301 respectivamente (Kito *et al.* 2010).

302 Além disso, nessa idade, a superovulação é independente da fase do ciclo estral e
303 o número de animais que ovulam é aproximadamente 90% (Kito *et al.* 2010), motivo
304 pelo qual no presente trabalho optou-se por trabalhar com fêmeas adultas. Kon *et al.*
305 (2005) obtiveram ovulação em 100% dos animais quando as ratas tinham 12 semanas ou
306 mais utilizando eCG/hCG tratamento. Kagabu *et al.* (2006) também verificaram
307 diferença na resposta ovulatória de ratas superovuladas dependendo da idade, enquanto
308 em ratas de 7 a 9 semanas, o número de oócitos ovulados foi de aproximadamente 20
309 por rata, as de 10 e 12 semanas foi de 75,5 e 101,1, respectivamente; e não foi verificada
310 diferença significativa no número de oócitos recuperados em ratas de 10 a 14 semanas.

311 No início do experimento, as ratas utilizadas tinham 11 semanas de idade e nos
312 momentos das superovulações, as ratas estavam com 15, 19 e 23 semanas de idade. Não
313 foi observada qualquer diferença no número de corpos lúteos entre os momentos
314 avaliados. Talvez pelo fato do coeficiente de variação ser menor conforme há aumento
315 na idade dos animais. Kagabu *et al.* (2006) encontraram coeficiente de variação maior
316 para ratas de 9 semanas (60%) do que para ratas de 12 semanas (9,3%). Por isso,
317 Kagabu *et al.* (2006) recomendam a superovulação em ratas de 12 semanas.

318 Diferente dos nossos resultados, Kon *et al.* (2005) observaram uma diminuição
319 do número de oócitos recuperados do oviduto com a idade dos animais, $71,3 \pm 6,2$ para
320 ratas de 12 semanas, $35,0 \pm 2,7$ para as de 18 semanas e $19,9 \pm 1,8$ para as de 24 semanas.
321 Porém, estes autores não verificaram o número de corpos lúteos e sim o número de
322 oócitos recuperados, além disso, o tratamento superovulatório utilizado por eles foi de
323 150 UI/Kg de eCG e 75 UI/Kg de hCG. Mukumoto *et al.* (1995) trabalhando com
324 dosagens diferentes de eCG/hCG, observaram que 100% dos animais de 10 a 15
325 semanas de idade respondem ao protocolo hormonal se superovuladas com a mesmo
326 protocolo deste trabalho (150 UI de eCG e 150 UI de hCG), porém na mesma
327 concentração utilizada por Kon *et al.* (2005) a resposta ao protocolo foi de 71,4%. Além
328 disso, Mukumoto *et al.* (1995) recuperaram $58,0 \pm 12,1$ oócitos do oviduto de ratas
329 superovuladas como neste trabalho, com uma variação de 18 a 101 oócitos.

330 Apesar de haver diferença significativa entre o grupo controle e tratado no
331 número de eritrócitos, os valores de ambos os grupos estão dentro dos valores de
332 referência do biotério da UNOESTE que vão de $5,43 \times 10^6/\text{mm}^3$ a $10,43 \times 10^6/\text{mm}^3$ (dados
333 não publicados), e, portanto, não deve ter significado clínico. O hematócrito apresentou
334 uma diferença significativa entre os grupos no primeiro mês de experimento,
335 provavelmente devido ao menor número de hemácias, porém assim como os eritrócitos

336 também se encontra dentro dos valores de referência de 32 a 52% (dados não
337 publicados). Também estão dentro dos valores de referência o VCM, HCM e VHCM, e,
338 portanto, não devem ter significado clínico.

339 Mesmo o grupo tratado com chá branco apresentando um aumento no número de
340 neutrófilos segmentados e de monócitos no decorrer do experimento, não houve
341 diferença no número de células brancas entre os grupos. Ao contrário do chá branco, o
342 tratamento com chá verde levou a um maior número de células de defesa (Giometti *et*
343 *al.* 2011). Segundo Cabrera *et al.* (2006), o chá verde fortalece a ação do sistema imune
344 porque protege o organismo contra oxidantes e radicais livres.

345 O colesterol diminuiu no soro das ratas após o terceiro mês de experimento no
346 grupo tratado com chá branco. O fator de maior risco para o desenvolvimento de doença
347 cardíaca é um elevado nível de colesterol no plasma, e estudos epidemiológicos
348 demonstram que os chás da planta *Camellia sinensis* poderiam diminuir as
349 concentrações plasmáticas do colesterol (Imai e Nakachi 1995). A diminuição
350 plasmática de colesterol pelos polifenóis presentes no chá é resultado do aumento na
351 expressão do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR), que é requerido para
352 remover o colesterol da circulação (Brown e Goldstein 1998). Foi também demonstrado
353 que os polifenóis poderiam inibir o processo de aterosclerose pela diminuição do
354 colesterol plasmático (Vinson *et al.* 2004)

355 Os triglicerídeos do presente trabalho aumentaram no segundo mês de
356 experimento no grupo do chá branco, momento em que houve também um maior
357 consumo de ração. Além disso, Sohle *et al.* (2009) demonstraram que o chá branco tem
358 forte atividade lipolítica e anti-adipogênica *in vitro*.

359 Islam e Choi (2007) não encontraram efeito significativo do chá verde em
360 reduzir os níveis de glicose no soro, o mesmo foi observado para o chá branco no

361 presente trabalho. A suplementação diária com uma catequina (epigallocatequina galato)
362 reduziu a glicose sérica, o colesterol total e triglicérides de ratos diabéticos (Roghani e
363 Baluchenejadmojarad 2010). Entretanto, o efeito da catequina deve ser diferente do chá
364 branco que contem outros componentes bioativos.

365 Conclui-se que o consumo prolongado de chá branco evita o ganho excessivo de
366 peso dos animais e diminui a concentração sérica de colesterol no organismo aos 90 dias
367 e não interfere no número de corpos lúteos, nem no peso dos ovários de ratas
368 superovuladas.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da FAPESP (processo número 2010/20100-1).

Referências Bibliográficas

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

Alcazar A, Ballesteros O, Jurado JM, Pablos F, Martin MJ, Vilches JL, et al, 2005: Differentiation of green, white, black, oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content. *J. Agric. Food Chem.* *55* 5960–5965.

Armstrong DT, Opavsky MA, 1988: Superovulation of immature rat by continuous infusion of follicle stimulating hormone. *Biol. Reprod.* *39*: 511-518.

Astrup A, Toubro S, Cannon S, Hein P, Breum L, Madsen J, 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, Prapocharung M, Tunkamnerdthai O, Sripanidkulchai BO, Auvichayapat N, Thinkhamrop B, Kunhasura S, Wongpratoom S, Sinawat S, Hongprapas P, 2008: Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial. *Physiol. Behav.* *93* 486-491.

Basini G, Bianco F, Grasselli F, 2005: Epigallocatechin-3-gallate from green tea negatively affects swine granulosa cell function. *Domest Anim. Endocrinol.* *28* 243–256.

Berisha B, Schams D, 2005: Ovarian function in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* *29* 305-317.

Bertan CM, Cunha PM, Binelli M, Visintin JA, Assunção MEOD, Arruda RP, 2006: Avaliação de bioensaios para a determinação da atividade biológica da gonadotrofina coriônica humana (hCG) *Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo.* *43* 3 321-328.

Bertagnolli AC, Gonçalves, PBD, Giometti IC, Costa LFS, Oliveira JFC, Gonçalves, IDV, Barreto KP, Emanuelli IP, Borges LFK, 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.

Borchardt RT, Huber JA, 1975: Catechol-*O*-methyltransferase: structureactivity relationships for inhibition by flavonoids. *J. Med. Chem.* *18* 120–2.

Bracco D, Ferrarra JM, Arnaud MJ, Jequier E, Schutz Y, 1995: Effects of caffeine on energy metabolism, heart rate, and methylxanthine metabolism in lean and obese women. *Am. J. Physiol.* *269* E671–8.

Brown MS, Goldstein JL, 1998: Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): controllers of lipid synthesis and cellular uptake. *Nutr. Rev.* 56 *S1-3 discussion S54-75*.

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

Chantre P, Lairon D, 2002: Recent findings of green tea extract AR25 (Exolise) and its activity for the treatment of obesity. *Phytomedicine.* 9 3–8.

Danforth DR, Abrogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI, 2003: Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol. Reprod.* 68 1736-1741.

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

Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, 1992: Potentiation of the thermogenic antiobesity effects of ephedrine by dietary methylxanthines: adenosine antagonism or phosphodiesterase inhibition? *Metabolism.* 41 1233–41.

Dulloo AG, Duret C, Rohrer D, Girardier L, Mensi N, Fathi M, Chantre P, Vandermander J, 1999: Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 70 1040–5.

Engelbregt MJT, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA, 2002: Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *Journal of Endocrinology.* 173 297–304.

Ferrara N, Davis-Smyth T, 1997: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18 4-25.

Fraser HM, Wulff C, 2001: Angiogenesis in the primate ovary. *Reprod. Fertil Dev.* 13 557-66

Giometti IC, Castilho ACS, Sá Filho OG, Papa PC, Buratini Jr J, 2009: Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33 34-52.

Giometti IC, Papa PC, Castilho C, Laposy CB, Zanfolin, LRL, Donadeli, JPP, Santos, CM, 2011: Influência do chá verde proveniente da erva *Camellia sinensis* no leucograma de ratas Wistar.. *Colloquium Agrariae.* 7 261-261.

Goodin MG, Rosengren, RJ, 2003: Epigallocatechin gallate modulates CYP450 isoforms in the female Swiss-Webster mouse. *Toxicol Sci.* 76 262–70.

- Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H, 2001: Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *98* 10350–10355.
- Hapon MB, Gamarra-Luques C, Jahn GA, 2010: Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reproductive Biology and Endocrinology.* *8-14*
- Harada U, Chikama A, Saito S, Takase H, Nagao T, Hase T, Tokimitsu I, 2005: Effects of the long-term ingestion of tea catechins on energy expenditure and dietary fat oxidation in healthy subjects. *J. Health Sci.* *51* 248–252.
- Hase T, Komine Y, Meguro S, Takeda Y, Takahashi H, Matsui Y, Inaoka S, Katsuragi Y, Tokimitsu, I, Shimasaki H, Itakura H, 2001: Anti-obesity effects of tea catechins in humans. *J. Oleo Sci.* *50* 599–605.
- Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Q, Liao S, 2002: Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochem Pharmacol.* *63* 1165–1176.
- Hilal Y, Engelhardt U, 2007: Characterization of white tea – comparison to green and black tea. *J. Vergbr. Lebensm.* *2* 414–421.
- Imai K, Nakachi K, 1995: Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br. Med. J.* *310* 693-696.
- Islam MS, Choi H, 2007: Green tea, anti-diabetic or diabetogenic: a dose response study. *Biofactors.* *29* 45–53.
- Islam MS, 2011: Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine.* *19* 25-31.
- Jain NC, 1993: *Essentials of Veterinary Hematology.* Philadelphia. Lea & Febiger. 417.
- Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE, Ellis LM, 2001: EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br. J. Cancer.* *84* 844–850.
- Kagabu S, Umezu M, 2006: Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of Wistar-Imamichi adult rats superovulated with eCG-hCG. *Exp. Anim.* *55* 45-48.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, 2008: *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6^a ed. San Diego: Academic Press. 932.
- Kao Y, Hiipakka RA, Liao S, 2000: Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology.* *141* 980-987.
- Kito S, Yano H, Ohta Y, Tsukamoto S, 2010: Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats. *Exp. Anim.* *59* 1 35-45.

Kon H, Tohei A, Hokao R, Shinoda M, 2005: Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult Wistar-Imamichi rats. *Exp. Anim.* 54 185-187.

Kuntze LB, Kondo AK, Bezerra BTS, Pinto T, Camargo ICC, 2012: Estudo comparativo dos efeitos do extrato de Ginkgo biloba L. e Panax ginseng C.A. na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* 14 1 34-42.

Kramer B, Stein BA, van der Walt LA, 1990: Exogenous gonadotropins - serum oestrogen and progesterone and the effect on endometrial morphology in the rat. *J. Anat.* 173 177-186 177.

Liao S, Hiipakka RA, 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.

Maughan RJ, Griffin J, 2003: Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *J. Hum. Nutr. Diet.* 16 411-420.

Mukumoto S, Mori K, Ishikawa H, 1995: Efficient induction of superovulation in adult rats by PMSG and hCG. *Exp. Anim.* 44: 111-118.

Nagao T, Meguro S, Soga S, Otsuka A, Tomonobu K, Fumoto S, Chikama A, Mori K, Yuzawa M, Watanabe H, Hase T, Tanaka Y, Tokimitsu I, Shimasaki H, Itakura H, 2001: Tea catechins suppress accumulation of body fat in humans. *J. Oleo Sci.* 50 717-728.

Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, Tokimitsu I, 2005: Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 122-129.

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

Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S, 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 Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P, 2003: Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum. Reprod.* 18 2270-2274.

Popova E, Bader M, Krivokharchenko A, 2005: Strain differences in superovulatory response, embryo development and efficiency of transgenic rat production. *Transgenic Res.* 14 729-738.

Roghani M, Baluchenejadmojarad T, 2010: Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology*. 17 55–59

Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL, 2002: Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J. Nutr.* 132 2307–2311.

Schams D, Berisha B, Kosmann M, Amselgruber WM, 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. *Domest Anim. Endocrinol.* 22 51-72.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC, 1995: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376 62-66.

Sher R, Conceição ACV, Pantaleão SM, Freire ER, Farias AS, Umbelino LA, 2003: Avaliação do efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) poit. (Lamiaceae) em ratas Wistar. *Biologia Geral e Experimental*, 3 5-8.

Sohle J, Knott A, Holtzmann U, Siegner R, Gronniger E, Schepky A, Gallinat S, Wnck H, Stab F, Winnefeld M, 2009: White tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in human subcutaneous (pre)-adipocytes. *Nutr. Metab.* 6 20.

Sotomaru Y, Kamisako T, Hioki K, 2005: Estrous stage- and animal age-independent superovulation in the BrlHan:WIST@Jcl(GALAS) rat. *Exp. Anim.* 54 137-141.

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

Tsuchida T, Itakura H, Nakamura H, 2002: Leptin: fundamental aspects. *Prog. Med.* 22 2189–2203.

Van Cappellen WA, Kramer P, van Leeuwen ECM, de Leeuw R, de Jong FH, 1997: Induction of superovulation in cyclic rats by administration of decreasing doses of recombinant follicle stimulating hormone (Org32489) *Human Reproduction*. 12 2 224–230.

Venditti E, Bacchetti T, Tiano L, Carloni P, Greci L, Damiani E, 2010: Hot vs. cold water steeping of different teas: do they affect antioxidant activity? *Food Chem.* 119 1597–1604.

Vinson J, Teufel K, Wu N, 2004: Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 52 3661-3665.

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

Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M, 2001: 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.* 86 768-772.

Reproduction in Domestic Animals

Downloads: [Copyright Transfer Agreement](#)

1. General

Reproduction in Domestic Animals is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. Reproduction in Domestic Animals is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Feature articles or reviews should summarise work in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Please mark these submissions as 'Urgent Short Communication' and provide a brief explanation of the urgency. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

2. Manuscript submission

The submission and review process of Reproduction in Domestic Animals is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to Reproduction in Domestic Animals, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website wileyonlinelibrary.com/journal/rda. Please note that it is compulsory to include include all authors with their affiliation and valid email addresses.

Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.

2.1. Licence to publish

Additionally, the corresponding author **MUST** submit a [Copyright Transfer Agreement](#). This form includes, among other items, your complete corresponding address, the number of your submission (Manuscript number) and the copyright transfer agreement. The form is to be retrieved, filled and signed, and then scanned in .pdf format to be uploaded in the submission of your manuscript, alongside with the other manuscript files. Please mark this CTA as supplementary file. The CTA will thereafter follow the handling of your manuscript and only become effective if the manuscript is accepted for publication. **Please note that a missing CTA in the submission will mean that the paper shall not be processed.**

2.2. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Reproduction in Domestic Animals adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. **Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.**

Acknowledgements: Authors **must** acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors **must** acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

Conflict of interest: A subheading "Conflict of interest statement" **must** be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

Funding sources: All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

Use of non-commercially available instrumentation, substances , antibodies or assays: When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

3. Manuscript Requirements

3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing *throughout* and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word), .doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

3.2. Length

Original papers, including figures, tables and references, should not exceed 25 typed or computer-written DIN A4 pages. Review articles can have an extended length. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 6 manuscript pages including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum.

3.3. Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a **registered** trademark should be marked with ®. When **non-commercially available** substances or reagents are used, the following text must be provided: "[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]"

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour

print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Please direct queries to the Production Editor at rda@wiley.com.

Tables should be created using the table function.

3.5. References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumonie der Stewing. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 102 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J. Vet. Med. A 35 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

NEW: References in Articles - We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager to reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.Endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

3.6. Laboratory animals

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

4. Copyright Assignment

*Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. A completed **Copyright Transfer Agreement (CTA)**, found at www.wiley.com/go/ctaaglobal, must be included as described in 2.1 as supplementary file when the manuscript is submitted.*

5. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them **electronically** to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as **e-annotated proofs**. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To view, print and annotate the proofs of your article you will

need Adobe Reader version 7 (or higher). This software can be downloaded (free of charge) for a whole series of platforms that include PC, Mac, and UNIX and can be downloaded from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. Further instructions will be sent with the proof. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

6. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

7. Supplements

As the official organ of the ESDAR, the EVSSAR and AERA, the journal publishes the proceedings (fully refereed main papers and abstracts) of the societies' Annual Meetings. Other Proceedings, as hard copy and/or online, can be published as Supplements following agreement with the Editor-in-Chief (for contents and scope) and the publisher (for terms and cost).

Wiley-Blackwell's Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Reproduction in Domestic Animals is covered by Wiley Online Library's **Early View** online service. **Early View** articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. **Early View** articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of **Early View** articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so **Early View** articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Last update: April 2010