

LUIZ CARLOS MAIA LADEIRA

**EFEITOS DA INFUSÃO DE *CAMELLIA SINENSIS* E DE DIFERENTES
DIETAS SOBRE A PERDA DE PESO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
ESTRUTURA HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

L154e
2017

Ladeira, Luiz Carlos Maia, 1990-

Efeitos da infusão de *Camellia sinensis* e de diferentes dietas sobre a perda de peso, parâmetros bioquímicos e estrutura hepática de camundongos C57BL/6 / Luiz Carlos Maia Ladeira. – Viçosa, MG, 2017.

viii, 29f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Chá verde. 2. Dieta. 3. Peso corporal. 4. Morfologia.
5. Fígado. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 615.321

LUIZ CARLOS MAIA LADEIRA

**EFEITOS DA INFUSÃO DE *CAMELLIA SINENSIS* E DE DIFERENTES
DIETAS SOBRE A PERDA DE PESO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
ESTRUTURA HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2017.



Maria do Carmo Gouveia Pelúzio



Sirlene Souza Rodrigues Sartori



Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, Mãe e irmãos, Lucas e Mariana, por poder sempre contar com o apoio total em todos estes anos de estudo, que ainda durarão alguns muitos anos.

À minha orientadora professora Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, por ter me acolhido e estar sempre aberta às minhas ideias desde o projeto deste trabalho até os trabalhos paralelos a este, sempre aconselhando de forma certa e com muito bom senso.

À grande amiga, Fernanda Marcondes, pela paciência, apoio, carinho e cuidados nestes anos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural, famoso 333, onde tive a oportunidade de crescer com eles, aprender e viver momentos memoráveis. Tati, Jana, Dudu, Susan, Nanda, Vivi, Felipe, Talita, Marcela, Juju, Ana Lu, Grazi, Verônica e Lidi.

À equipe dinâmica e grandes amigos, Jana, Nanda e Dudu, por terem passado os perrengues e dado risadas sem fim, até mesmo nos fins de semana e feriados e trabalho juntos. Parceiros de trabalho a qualquer hora e qualquer lugar.

À professora Marli Cupertino, pela oportunidade de estagiar em suas aulas, pelas dicas nas rotinas do laboratório e em sala de aula.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela disponibilidade em ajudar com as dicas no projeto e auxílio para resolver problemas do percurso.

Ao professor Sérgio Luís Pinto da Matta, por estar sempre aberto à conversa, nunca poupando esforços para ajudar no que foi preciso e dando dicas valiosas.

Aos alunos e professores de todos os laboratórios que passei por estes anos, laboratório de Nutrição Experimental, Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, Laboratório Beagle, Laboratório de Prospecção Fitoquímica, Laboratório de Análise de Alimentos e Laboratório de Immunovirologia.

Aos amigos André da Paz e Fábio Loatti, pela disposição em sempre ajudar e criticar construtivamente cada etapa do trabalho.

Às estagiárias, Maiã de Paula e Larissa Reis, pela disposição e vontade de ajudar.

À Nadja Marriel, Janaína Silva, Felipe Couto, Marcela Sertorio, Renan Araújo e aos alunos dos cursos de extensão em Biologia Celular e Histologia, por nos ajudarem a melhorar a cada dia a prática docente.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de realização do curso e crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

Aos amigos da República Shaolin pelo companheirismo e bons momentos.

Um abraço pra galera do Kunf Fu!

Aos camundongos, por terem dado a vida pela realização deste e de outros trabalhos, gratidão e respeito.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. Introdução Geral.....	1
2. Bibliografia	3
3. Artigo	5
Highlights.....	6
Lista de abreviações	6
Resumo.....	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e métodos.....	10
Animais	10
Desenho experimental.....	10
Dietas.....	11
Infusão de chá verde.....	11
Coleta das amostras e análises biométricas.....	12
Análises bioquímicas.....	12
Análise morfométrica do fígado.....	13
Análise estatística	13
Resultados	14
Efeitos nos parâmetros biométricos	14
Efeitos nos parâmetros morfométricos do fígado.....	15
Efeitos nos parâmetros bioquímicos.....	17
Discussão.....	19
Conclusões	22
Conflito de interesses	23
Agradecimentos.....	23
Bibliografia	24
4. Considerações finais.....	28

RESUMO

LADEIRA, Luiz Carlos Maia. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Efeitos da infusão de *Camellia Sinensis* e de diferentes dietas sobre a perda de peso, parâmetros bioquímicos e estrutura hepática de camundongos C57BL/6.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Coorientadores: Marli do Carmo Cupertino e João Paulo Viana Leite.

Introdução: A obesidade é uma realidade em vários países, afetando todas as faixas etárias e distribuída por todos os tipos de populações. O tratamento farmacológico com ênfase no gasto de energia e redução da fome tem aumentado nos últimos anos e a pesquisa acompanha a tendência, principalmente tratando-se dos fármacos fitoterápicos termogênicos. Dentre eles, destaca-se o chá verde por ser a bebida mais consumida no mundo depois da água. **Objetivo:** Avaliar o efeito da infusão de chá verde no peso corporal, perfil lipídico, estrutura e estresse oxidativo do fígado de camundongos previamente submetidos à dieta de cafeteria (DC). **Metodologia:** Após consumirem a DC por 90 dias, os animais foram divididos em quatro grupos onde foram combinados os tratamentos de dieta de cafeteria (G1 e G3) e dieta padrão para roedores (G2 e G4), mais a infusão de chá verde na dose de 100mg/Kg de peso corporal (G3 e G4) e o controle água (G1 e G2). A duração destes tratamentos foi de 35 dias. **Resultados:** A mudança na composição da dieta foi a principal causa da perda de peso, sendo o chá responsável por uma redução de aproximadamente 2% em ambos os grupos. O tratamento com a infusão de chá verde conseguiu reduzir em 50% a porcentagem de gotículas lipídicas, sendo o chá combinado com a dieta responsável por uma redução de 80% na porcentagem de inclusões lipídicas no fígado. As análises do estresse oxidativo do tecido hepático mostraram um aumento nos níveis do marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) no grupo G2 e uma tendência ao aumento na quantidade deste marcador no G4 devido ao aumento do consumo da gordura acumulada. **Conclusões:** Não houve contribuição quanto a redução do peso corporal, porém o tratamento favoreceu a melhoria dos parâmetros morfométricos do fígado, principalmente quanto ao acúmulo de lipídios e ausência de indicativos de dano celular.

ABSTRACT

LADEIRA, Luiz Carlos Maia. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Effects of *Camellia sinensis* infusion and different diets on weight loss, biochemical parameters and liver structure of C57BL/6 mice.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-advisers: Marli do Carmo Cupertino and João Paulo Viana Leite.

Introduction: The obesity is a reality in several countries, affecting all age groups and distributed by all types of populations. Pharmacological treatment with emphasis on energy expenditure and appetite reduction has increased in recent years and research follows the trend, especially in the case of thermogenic phytotherapeutic drugs. Among them, green tea stands out as the most consumed drink in the world after water.

Objective: Evaluate the effect of green tea infusion on body weight, lipid profile, structure and oxidative stress of the liver of mice previously submitted to the cafeteria diet (DC).

Methods: After consuming the DC for 90 days, the animals were divided in four groups where combined the treatments of the diet of cafeteria (G1 and G3) and standard diet for rodents (G2 and G4), plus the infusion of green tea in the dose of 100mg / kg of body weight (G3 and G4) and the water control (G1 and G2). The duration of these treatments was 35 days. The treatment lasted 35 days.

Results: The change in diet composition was the main cause of weight loss, with tea accounting for a reduction of approximately 2% in both groups. The treatment with green tea infusion was able to reduce the percentage of lipid droplets by 50%, with tea combined with the diet responsible for an 80% of reduction in the percentage of lipid inclusions in the liver. Analyzes of the oxidative stress of the liver tissue showed an increase in levels of the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) in the G2 group and a tendency to increase the amount of this marker in G4 due to the increase in accumulated fat consumption.

Conclusions: Although the dose studied did not contribute greatly to the reduction of body weight, it favored the improvement of the morphometric parameters of the liver, mainly as regards the accumulation of lipids and absence of cell damage.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Composição das dietas experimentais

Tabela 02. Parâmetros biométricos, peso absoluto e relativo do fígado dos camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

Tabela 03. Proporções volumétricas dos componentes teciduais hepáticos dos camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

Tabela 04. Indicadores do estresse oxidativo no fígado de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

Tabela 05. Níveis de colesterol total, suas frações e triglicerídeos no soro de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Conteúdo de água no fígado (%) de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde.

Figura 02. . Fotomicrografias representativas de cortes de fígado de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde.

Figura 03. Testes da função hepática de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde.

1. Introdução Geral

O excesso de peso corporal é uma realidade em países industrializados desenvolvidos (GLOY et al., 2013) e em desenvolvimento (PAPPAS, 2010). No mundo, mais de 1,9 bilhões de pessoas acima dos 18 anos são classificados como sobrepeso, ou seja, apresentam o Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 25kg/m². Destes, 600 milhões são obesos (IMC igual ou maior que 30Kg/m²) (WHO, 2000; WISSE; KIM; SCHWARTZ, 2007).

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, certos tipos de câncer, cálculos biliares, distúrbios endócrinos e metabólicos, doença pulmonar, dislipidemias, esteatose hepática, *diabetes mellitus*, e mortalidade (GLOY et al., 2013; WHO, 2000; WISSE; KIM; SCHWARTZ, 2007).

As terapias atuais para tratamento da obesidade incluem abordagens cirúrgicas e não cirúrgicas (GLOY et al., 2013), dentre estas encontram-se as farmacológicas (SANTOS; NEVES; AMATO, 2015) em combinação com mudanças no estilo de vida (PAPPAS, 2010). Segundo recomendação da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) (2009) a escolha do tratamento deve basear-se na realidade do paciente, como a gravidade do problema e a presença de comorbidades.

Os tratamentos farmacológicos tem como foco os mecanismos de controle de ingestão de alimentos, conseqüentemente, a aquisição reduzida de fontes energéticas pelo organismo. Tais terapias para a redução da ingestão alimentar apresentam sua efetividade limitada a longo prazo (SANTOS; NEVES; AMATO, 2015). A cirurgia bariátrica, apesar de ser um procedimento invasivo, é o tratamento mais efetivo na obesidade mórbida, porém, leva à redução dos níveis de hormônios secretados pelo trato digestório que atuam no controle da homeostase energética (SENIN et al., 2015). É recomendada apenas para obesos com IMC acima de 40Kg/m² sem comorbidades associadas (ABESO, 2009).

Neste sentido, novas terapias baseadas no estímulo do aumento de gasto energético, e não no controle da ingestão, tem sido sugeridas como potenciais formas de tratamento (SANTOS; NEVES; AMATO, 2015). Em tal cenário, se destacam as substâncias tidas como “termogênicas”, ou seja, que são capazes de induzir o gasto

energético através da geração de calor. Dentre estas o chá verde é a mais consumida em todo o mundo (GROVE et al., 2012).

Já foi relatado o efeito do chá verde na redução do ganho de peso corporal (GROVE et al., 2012; VERA-CRUZ et al., 2010), redução da glicemia (SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015; VERA-CRUZ et al., 2010), redução da resistência à insulina (SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015), redução da massa de depósitos de tecido adiposo uni e multiloculares (HUANG et al., 2009; SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015), e aumento na expressão de genes relacionados à termogênese adaptativa (NOMURA et al., 2008; SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015). Porém, na maioria dos estudos com a planta o tratamento é misturado à dieta dos animais, e não oferecido na forma de infusão como é consumido por humanos. De tal modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da infusão de *C. sinensis* no estado oxidativo e estrutura histológica do fígado de camundongos previamente e concomitantemente tratados com dieta hiperlipídica (dieta de cafeteria) e hipolipídica (dieta padrão), além do efeito combinado do chá com uma mudança para dieta hipolipídica.

2. Bibliografia

ABESO (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA). **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. [s.l: s.n.].

GLOY, V. L. et al. Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 347, n. (Clinical research ed.), p. 16, 2013.

GROVE, K. A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Pancreatic Lipase and Reduces Body Weight Gain in High Fat-Fed Obese Mice. **Obesity**, v. 20, n. 11, p. 2311–2313, 2012.

HUANG, Y. W. et al. Anti-obesity effects of epigallocatechin-3-gallate, orange peel extract, black tea extract, caffeine and their combinations in a mouse model. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 304–310, 2009.

NOMURA, S. et al. Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 840–7, dez. 2008.

PAPPAS, P. Health policy strategies for the treatment of obesity : a systematic review. **International Journal**, v. 3, n. 3, p. 98–105, 2010.

SAE-TAN, S.; ROGERS, C. J.; LAMBERT, J. D. Voluntary exercise and green tea enhance the expression of genes related to energy utilization and attenuate metabolic syndrome in high fat fed mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 5, p. 1156–9, 2014.

SAE-TAN, S.; ROGERS, C. J.; LAMBERT, J. D. Decaffeinated green tea and voluntary exercise induce gene changes related to beige adipocyte formation in high fat-fed obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 210–214, abr. 2015.

SANTOS, G. M.; NEVES, F. DE A. R.; AMATO, A. A. Thermogenesis in white adipose tissue: An unfinished story about PPAR γ . **Biochimica et biophysica acta**, v. 1850, n. 4, p. 691–695, abr. 2015.

SENIN, L. L. et al. Comparative secretome analysis of rat stomach under different nutritional status. **Journal of Proteomics**, v. 116, p. 44–58, 2015.

VERA-CRUZ, M. et al. Efeito do chá verde (*Camelia sinensis*) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 407–413, 2010.

WHO, W. H. O. Obesity: prevention and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. **WHO technical report series**, p. 276, 2000.

WISSE, B. E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. An integrative view of obesity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5852, p. 928–929, 2007.

3. Artigo

Infusão de chá verde reduz o acúmulo lipídico nos hepatócitos de camundongos C57BL/6

Luiz Carlos Maia Ladeira¹, Janaína da Silva¹, Fernanda Ribeiro Dias¹, Eduardo Medeiros Damasceno¹, Jerusa Maria de Oliveira², Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado^{1*}.

Filiação

¹ - Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa

² - Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa

Correspondência

* Laboratório de Biologia Estrutural. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. Campus Universitário, Avenida P. H. Rolfs, s/n. CEP:36570-000. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Artigo formatado segundo o guia para autores do periódico **Journal of Functional Foods**.
<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-functional-foods/1756-4646/guide-for-authors>

Highlights

- A substituição da dieta de cafeteria pela dieta padrão foi determinante para a redução do peso corporal dos animais com sobrepeso.
- A infusão de chá verde contribuiu para a redução do acúmulo de inclusões lipídicas nos hepatócitos.

Lista de abreviações

ALP - fosfatase alcalina

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato transaminase

CAT - catalase

DC - dieta de cafeteria

DNA - ácido desoxirribonucleico

DP - dieta padrão

EGCG - epigallocatequina-3-galato

GST - glutathiona-s-transferase

HDL - lipoproteína de alta densidade

ICV - infusão de chá verde

LDL - lipoproteína de baixa densidade

MDA - malondialdeído

PAS - ácido periódico de Schiff

PTNt - proteínas totais

SOD - superóxido dismutase

VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade

Resumo

Infusão de chá verde reduz o acúmulo lipídico nos hepatócitos de camundongos C57BL/6

Introdução: O efeito positivo do chá verde na redução do ganho de peso corporal e controle de parâmetros relacionados à desregulação metabólica, como aumento da glicemia e acúmulo de gordura é bem relatado na literatura. Adversamente, existem relatos de efeitos tóxicos ao fígado tornando necessária maiores avaliações dos efeitos do chá verde neste órgão. **Objetivo:** Avaliar o efeito da infusão de chá verde no peso corporal, perfil lipídico, estrutura e estresse oxidativo do fígado de camundongos previamente submetidos à dieta de cafeteria (DC). **Metodologia:** Após consumirem a DC por 90 dias, os animais foram divididos em quatro grupos onde foram combinados os tratamentos de dieta de cafeteria (G1 e G3) e dieta padrão para roedores (G2 e G4), mais a infusão de chá verde na dose de 100mg/Kg de peso corporal (G3 e G4) e o controle água (G1 e G2). A duração destes tratamentos foi de 35 dias. **Resultados:** A mudança na composição da dieta foi a principal causa da perda de peso, sendo o chá responsável por uma redução de aproximadamente 2% em ambos os grupos. O tratamento com a infusão de chá verde conseguiu reduzir em 50% a porcentagem de gotículas lipídicas, sendo o chá combinado com a dieta responsável por uma redução de 80% na porcentagem de inclusões lipídicas no fígado. As análises do estresse oxidativo do tecido hepático mostraram um aumento nos níveis do marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) no grupo G2 e uma tendência ao aumento na quantidade deste marcador no G4 devido ao aumento do consumo da gordura acumulada. **Conclusões:** Não houve contribuição quanto a redução do peso corporal, porém o tratamento favoreceu a melhoria dos parâmetros morfométricos do fígado, principalmente quanto ao acúmulo de lipídios e ausência de indicativos de dano celular.

Palavras-chave:

Chá verde, dieta de cafeteria, estresse oxidativo, morfologia, hepatócitos

Abstract

Green tea infusion reduces lipid accumulation in C57BL/6 hepatocytes

Introduction: The positive effect of green tea on the reduction of body weight gain and control of parameters related to metabolic dysregulation, such as increased glycemia and fat accumulation, has been reported. Adversely, there are reports of toxic effects to the liver making further assessments, of the effects of green tea on this organ, necessary.

Objective: Evaluate the effect of green tea infusion on body weight, lipid profile, structure and oxidative stress of the liver of mice previously submitted to the cafeteria diet (DC). **Methods:** After consuming the DC for 90 days, the animals were divided in four groups where combined the treatments of the diet of cafeteria (G1 and G3) and standard diet for rodents (G2 and G4), plus the infusion of green tea in the dose of 100mg

/kg of body weight (G3 and G4) and the water control (G1 and G2). The duration of these treatments was 35 days. The treatment lasted 35 days. **Results:** The change in diet composition was the main cause of weight loss, with tea accounting for a reduction of approximately 2% in both groups. The treatment with green tea infusion was able to reduce the percentage of lipid droplets by 50%, with tea combined with the diet responsible for an 80% of reduction in the percentage of lipid inclusions in the liver.

Analyzes of the oxidative stress of the liver tissue showed an increase in levels of the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) in the G2 group and a tendency to increase the amount of this marker in G4 due to the increase in accumulated fat consumption.

Conclusions: Although the dose studied did not contribute greatly to the reduction of body weight, it favored the improvement of the morphometric parameters of the liver, mainly as regards the accumulation of lipids and absence of cell damage.

Keywords:

Green tea, cafeteria diet, oxidative stress, morphology, hepatocyte

Introdução

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água (GRAHAM, 1992; GROVE et al., 2012; NAVARRO et al., 2016). As folhas da árvore da espécie *Camellia sinensis* podem ser processadas de formas diferentes originando variados tipos de chá. Dentre eles os dois mais consumidos são o chá preto e o chá verde (HUANG et al., 2009). O chá verde é preparado de forma a prevenir a oxidação de seus compostos, fazendo com que contenha altas quantidades de polifenóis (GRAHAM, 1992), que são agentes que auxiliam na prevenção de doenças relacionadas ao estilo de vida, como a obesidade e suas comorbidades (NOMURA et al., 2008).

Os polifenóis encontrados na planta podem corresponder a 30% do peso seco da folha de *C. sinensis* (GRAHAM, 1992). O principal composto, responsável pelos efeitos benéficos, é a epigallocatequina-3-galato (EGCG) (GROVE et al., 2012), podendo corresponder a 55% do total de polifenóis encontrados nas folhas frescas (PERVA-UZUNALIĆ et al., 2006).

Já foi relatado o efeito do chá verde na redução do ganho de peso corporal (GROVE et al., 2012; JOHNSON; BRYANT; HUNTLEY, 2012; SAMPATH et al., 2017; WESTERTERP-PLANTENGA, 2010; WESTERTERP-PLANTENGA; LEJEUNE; KOVACS, 2005), redução da glicemia (SAMPATH et al., 2017), resistência à insulina (SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015), redução da massa de depósitos de tecido adiposo uni e multiloculares (HUANG et al., 2009; SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015), proteção contra o estresse oxidativo (MOLINA; BOLIN; OTTON, 2015), aumento na termogênese (DULLOO et al., 1999) e na expressão de genes relacionados à termogênese adaptativa (NOMURA et al., 2008; SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015).

No fígado o chá atua auxiliando os mecanismos antioxidantes na proteção ao órgão (EL-BESHBISHY, 2005), estando relacionado à menor oxidação de DNA e de lipídios (HASEGAWA et al., 1995; SANO et al., 1995), menor risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHALOVICH; EISENBERG, 2005), além de estar relacionado ao combate de várias doenças hepáticas (JIN; ZHENG; LI, 2008). Apesar destes efeitos positivos, existem relatos na literatura científica de casos de

hepatotoxicidade, em humanos e animais de laboratório, causados por consumo exagerado de extratos de chá verde ou suas catequinas isoladas, como a EGCG (LAMBERT et al., 2010; MICHELE MOLINARI et al., 2007; NAVARRO et al., 2016).

Neste estudo utilizamos a dieta de cafeteria (DC) modificada, que consiste em uma dieta preparada com alimentos para humanos com alto teor de lipídios (MOLINA; BOLIN; OTTON, 2015). Em relação ao chá verde, o tratamento foi feito na forma de infusão, como é consumido por humanos, embora a maioria dos estudos com esta planta tenha tratado os animais com a folha misturada à dieta.

Visto isso, este trabalho teve o objetivo de examinar o efeito da infusão de chá verde no peso corporal, perfil lipídico, estrutura e estresse oxidativo do fígado de camundongos previamente e concomitantemente submetidos à dieta de cafeteria (DC), além do efeito combinado do chá com uma mudança de dieta.

Material e métodos

Animais

Vinte e quatro camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 com 30 dias de idade e pesando $19,50 \pm 1,09$ g, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Alocados em gaiolas metabólicas com uma cama de maravalha para enriquecimento ambiental, em ambiente de temperatura (22 ± 2 °C), umidade (60-70%) e luz controladas, em ciclo claro-escuro (12/12h), tendo acesso a alimento e água *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) e registrado sob o protocolo nº 73/2015.

Desenho experimental

Após 3 dias de adaptação, todos os animais foram submetidos à dieta de cafeteria por 12 semanas antes de serem divididos nos grupos experimentais e começarem a receber os tratamentos com mudança de dieta e infusão de chá verde. Após as 12 semanas iniciais, os animais foram divididos em 4 grupos da seguinte forma: controle (G1, n=6), que continuou a receber DC e recebeu água destilada (0,5mL), o segundo grupo (G2, n=6) passou a receber dieta padrão (DP) para roedores e água destilada (0,5mL), o terceiro grupo (G3, n=6) recebeu a DC e infusão de chá verde (ICV) na dosagem de 100mg/Kg de peso (0,5mL) e o quarto grupo (G4, n=6) recebeu a DP e ICV na dosagem de

100mg/Kg de peso (0,5mL) . Todos os grupos receberam o tratamento via gavagem na dosagem especificada, diariamente, e a respectiva dieta *ad libitum* por 5 semanas.

Dietas

A dieta de cafeteria foi composta de patê de presunto, batata palha, bacon, mortadela, biscoito de maisena, achocolatado, leite em pó integral e dieta padrão para camundongos (Presence Ratos e Camundongos®), nas proporções (2:1:1:1:1:1:1). Os ingredientes foram triturados em multiprocessador, homogeneizados manualmente, moldados em pellets de 30g e armazenados a -20°C até o momento de serem utilizados.

Foi utilizada também, a dieta padrão comercial (Presence Ratos e Camundongos®). A quantidade de calorias e de macronutrientes das dietas são apresentados na Tabela 01.

Tabela 01. Composição das dietas experimentais

Dieta	Dieta Padrão *		Dieta de Cafeteria **	
Kcalorias	380.00		323.71	
	g/100g	%Kcal	g/100g	%Kcal
Proteínas	23.00	24.21	12.71	15.70
Lipídios	4.00	9.48	15.50	43.07
Carboidratos	63.00	66.31	33.37	41.23
Fibra	5,00	0.00	1,15	0.00

* Informações fornecidas pelo fabricante.

** Calculado com base nas informações fornecidas pelos fabricantes dos ingredientes.

Infusão de chá verde

Foram obtidos cinco lotes diferentes de chá verde (*Camellia sinensis*) da marca Leão® – Alimentos e Bebidas (The Coca-Cola Company®). Os lotes foram misturados (1:1) e a infusão preparada misturando-se a folha em água destilada aquecida a 80°C na proporção de 1g de chá para 40mL de água. A mistura permaneceu infundindo por 20 minutos sob agitação com auxílio de um agitador magnético. Após esse tempo de extração a mistura foi filtrada em filtro poroso de 0,45µm, conforme Perva-Uzunalić et al. (2006), e então congelada a -80°C e liofilizada. Armazenou-se a -20°C até o momento de administração do tratamento, quando foi resuspendida em água destilada em temperatura ambiente.

A prospecção fitoquímica qualitativa da ICV foi realizada utilizando-se cromatofolhas de sílica gel. O extrato foi testado para a presença de taninos, flavonoides,

cumarinas, saponinas, óleos essenciais, triterpenos e esteroides, antraquinonas e alcaloides utilizando reveladores específicos para cada reação. Confirmamos a presença de catequinas, cafeína e taninos na ICV.

Coleta das amostras e análises biométricas

Os animais foram pesados no primeiro e último dia de tratamento, assim como no início de cada semana do experimento. Foram anestesiados com ketamina (10mg/Kg de peso corporal) e xylazina (2mg/Kg de peso corporal) seguido de laparotomia e coleta do sangue por punção cardíaca. O fígado foi removido inteiro e pesado em balança analítica. Foram separadas três porções do fígado, sendo que duas delas foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) e a outra imersa em solução fixadora Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). O índice hepatossomático foi calculado dividindo-se o peso do fígado de cada animal por seu peso corporal.

Um dos fragmentos de fígado congelado foi utilizado para medir a quantidade de água por unidade de peso de tecido (mL/g) segundo Novaes e colaboradores (2012). Os outros foram reservados para análises bioquímicas e morfológicas.

Análises bioquímicas

O sangue coletado foi centrifugado a 2000g por 20 minutos a 4°C e o soro foi utilizado para a quantificação das enzimas Fosfatase Alcalina (ALT), Alanina Aminotransferase (ALP) e a Aspartato Transaminase (AST), e para a quantificação do colesterol total e das frações, das proteínas totais (PTNt) e da albumina. As amostras de soro foram processadas de acordo com as informações do fabricante dos kits de análise (Human In Vitro Diagnostics).

Uma amostra de 100mg do fígado congelado a -80°C foi homogeneizada em solução tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugada a 12000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para ser usado nas determinações posteriores. A atividade da enzima catalase (CAT) foi medida pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (10nmol/L) em espectrofotômetro a 240nm por 60 segundos, como descrito por Aebi (1984). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de ELISA em 570nm de acordo com a capacidade de redução da auto-oxidação do pirogalol, pela catalização da reação do superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e do peróxido de hidrogênio (DIETERICH et al., 2000). Já a atividade da enzima glutathione-s-transferase (GST) foi medida pela

formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340nm por 60s (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974). A dosagem do malondialdeído (MDA) foi realizada segundo a metodologia de Gutteridge and Halliwell (1990) e determinada em leitor de ELISA em 535nm. Os níveis de proteínas totais no tecido foram determinados pelo método de Lowry et al., (1994).

Análise morfométrica do fígado

Após 24h de fixação em solução de Karnovsky, o fragmento de fígado foi desidratado em soluções crescentes de etanol e incluído em glicol metacrilato (Historesin, Leica®). Para a microtomia foi utilizado um micrótomo rotativo semi-automático (Leica® RM2255) e navalhas de vidro (Leica). Foram obtidos cortes semi seriados de 3µm de espessura, respeitando-se a distância de 12 cortes entre eles. As preparações foram coradas com Azul de Toluidina - Borato de Sódio para as análises morfométricas, enquanto para análise histoquímica do glicogênio foram utilizados cortes de fígado submetidos à reação de ácido periódico e reativo de Schiff (PAS). Todas as preparações foram montadas com o meio de montagem Entellan (Merck, Frankfurt, Germany). As preparações foram fotografadas em um microscópio de campo claro (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do software Image J 1.48v (National Institute of Health, USA).

A densidade volumétrica dos componentes hepáticos (núcleo e citoplasma de hepatócitos, outras células, gotículas lipídicas e vasos sanguíneos) foi determinada observando campos histológicos, com um retículo de 266 pontos sobre as imagens, até atingir o somatório de 1000 pontos por animal em um aumento de 200x (CUPERTINO et al., 2013).

Para a quantificação das inclusões de glicogênio foi utilizado o mesmo sistema de teste com 266 pontos sobre os campos histológicos, em um aumento de 200x, utilizando 10 imagens por animal, contado os pontos sobre as inclusões de glicogênio e calculada a proporção em relação à quantidade total de pontos (CUPERTINO et al., 2013).

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para análise de normalidade e posteriormente analisados usando o teste ANOVA “one way” seguido

do teste post hoc Holm-Sidak. A significância estatística foi estabelecida como $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados no SigmaStat versão 4.0 (Systat).

Resultados

Efeitos nos parâmetros biométricos

Durante o experimento a ingestão alimentar não diferiu entre os grupos (dados não mostrados). Como mostrado na Tabela 2, a mudança de dieta conseguiu reduzir, sozinha, 13,23% do peso inicial (G2). A infusão sozinha não apresentou efeitos significativos, enquanto a combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde foi mais eficiente, conseguindo reduzir em 15,10% o peso inicial (G4).

Tabela 02. Parâmetros biométricos, peso absoluto e relativo do fígado dos camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde.

	G1	G2	G3	G4
Peso inicial ⁺ *	30,42 ± 2,27 ^a	29,78 ± 2,29 ^a	30,31 ± 1,96 ^a	29,26 ± 2,35 ^a
Peso final †	30,03 ± 1,19 ^{a, 1}	25,84 ± 0,75 ^{b, 2}	29,23 ± 2,03 ^{a, 1}	24,84 ± 0,99 ^{b, 2}
Diferença	1,28%	13,23%	3,56%	15,10%
Peso do fígado *	0,98 ± 0,03	1,07 ± 0,13	1,08 ± 0,044	1,08 ± 0,09
Índice hepatossomático *	2,97 ± 0,085	3,24 ± 0,40	3,26 ± 0,13	3,07 ± 0,28

Os valores são representados pelas médias (n=6) ± desvio padrão. As médias foram analisadas pelo teste ANOVA “one way” seguido do teste *post hoc* Holm-Sidak. Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes. G1=DC+H₂O; G2=DP+H₂O; G3=DC+ICV; G4=DP+ICV.

+ Peso no primeiro dia de tratamento, após período de tratamento com a dieta de cafeteria.

* Não houve diferenças significativas entre os grupos (p>0,05).

† Houve efeito significativo para a mudança de dieta (p<0,001) e na combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde (p<0,001). Não houve efeito significativo para a infusão de chá verde com a dieta de cafeteria (p=0,310) e a infusão de chá verde com a dieta padrão (p=0,374). Os números indicam as comparações das médias dos pesos finais com os iniciais dentro de cada grupo. 1 – Não houve diferença significativa entre as médias (p>0,371). 2 – Houve diferença significativa entre as médias de peso corporal (p=0,002).

A quantidade de água no fígado (Figura 1) aumentou em função do efeito da infusão de chá verde (G3 e G4), enquanto a mudança de dieta sozinha não apresentou efeitos neste parâmetro. A combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde apresentou um efeito maior no aumento da quantidade de água no tecido.

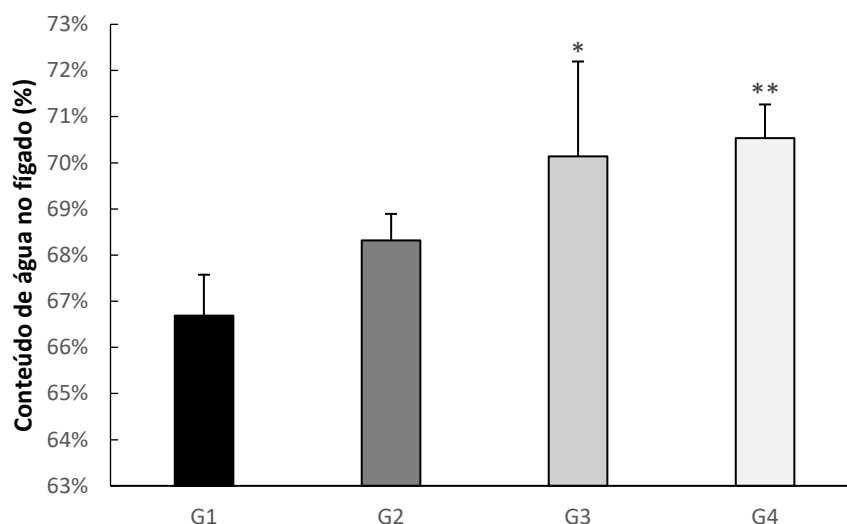


Figura 01. Conteúdo de água no fígado (%) de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde. Os valores são representados pelas médias (n=5) com seu desvio padrão representado pela barra. As médias foram analisadas pelo teste ANOVA “one way” seguido do teste *post hoc* Holm-Sidak. G1=DC+H₂O; G2=DP+H₂O; G3=DC+ICV; G4=DP+ICV.

* O valor da média foi significativamente diferente da média de G1 (p=0,002).

** O valor da média foi significativamente diferente da média de G1 (p<0,001) e da média de G2 (p= 0,042).

Efeitos nos parâmetros morfométricos do fígado

A análise histomorfométrica, apresentada na Tabela 3, mostrou aumento na porcentagem de espaço ocupado pelo citoplasma dos hepatócitos com efeitos significativos nos grupos que tomaram a infusão de chá verde (p<0,001). Houve também aumento no número de outras células no grupo que foi tratado com a combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde (G4, p=0,038). Além disso, quanto à proporção de gotas lipídicas, a mudança de dieta proporcionou uma redução significativa (p=0,041), bem como a infusão de chá verde com a dieta de cafeteria (p=0,008) e a infusão de chá verde com a dieta padrão (p=0,019) quando comparados ao G1. Houve, também, efeito significativo para a combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde (p<0,001).

A Figura 2 apresenta fotomicrografias representativas de secções de fígado dos grupos experimentais, nota-se uma diferença nítida entre a quantidade de inclusões lipídicas nos hepatócitos em G1 comparado à G4, com redução drástica destas inclusões.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as porcentagens de hepatócitos binucleados e nem na relação núcleo/citoplasma ($p>0,20$), bem como na quantidade de glicogênio no tecido ($p=0,402$).

Tabela 03. Proporções volumétricas dos componentes teciduais hepáticos dos camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

%	G1	G2	G3	G4
Núcleo de hepatócitos *	9.66 ± 1.46	10.33 ± 1.30	10.29 ± 1.44	10.42 ± 0.55
Citoplasma de hepatócitos †	62.24 ± 4.43 ^a	66.62 ± 2.20 ^a	72.00 ± 4.08 ^b	76.36 ± 2.32 ^c
Outras células ‡	2.62 ± 0.91 ^a	3.51 ± 0.68 ^{ab}	2.58 ± 0.46 ^a	3.80 ± 0.66 ^b
Inclusões lipídicas §	16.81 ± 3.35 ^a	10.58 ± 4.63 ^b	8.37 ± 4.36 ^{bc}	3.26 ± 3.56 ^c
Vasos sanguíneos *	8.67 ± 2.40 ^a	8.95 ± 2.16 ^a	6.70 ± 2.72 ^a	6.02 ± 1.31 ^a
Glicogênio *	4.44 ± 2.72	14.62 ± 12.81	5.71 ± 7.13	8.45 ± 6.18

Os valores são representados pelas médias ($n=6$) ± desvio padrão. As médias foram analisadas pelo teste ANOVA “one way” seguido do teste post hoc Holm-Sidak. Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes. G1=DC+H₂O; G2=DP+H₂O; G3=DC+ICV; G4=DP+ICV.

* Não houve diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

† Não houve efeito significativo para a mudança de dieta ($p=0,074$). Houve efeitos significativos nos grupos que tomaram a infusão de chá verde ($p<0,001$) e para a combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde ($p<0,001$).

‡ Não houve efeito significativo para a mudança de dieta ($p=0,110$), infusão de chá verde com a dieta de cafeteria ($p=0,927$) e a infusão de chá verde com a dieta padrão ($p=0,718$). Houve efeito significativo para a combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde ($p=0,038$).

§ Houve efeito significativo com a mudança de dieta ($p=0,041$), a infusão de chá verde com a dieta de cafeteria ($p=0,008$) e a infusão de chá verde com a dieta padrão ($p=0,019$), bem como para a combinação da mudança de dieta com a infusão de chá verde ($p<0,001$).

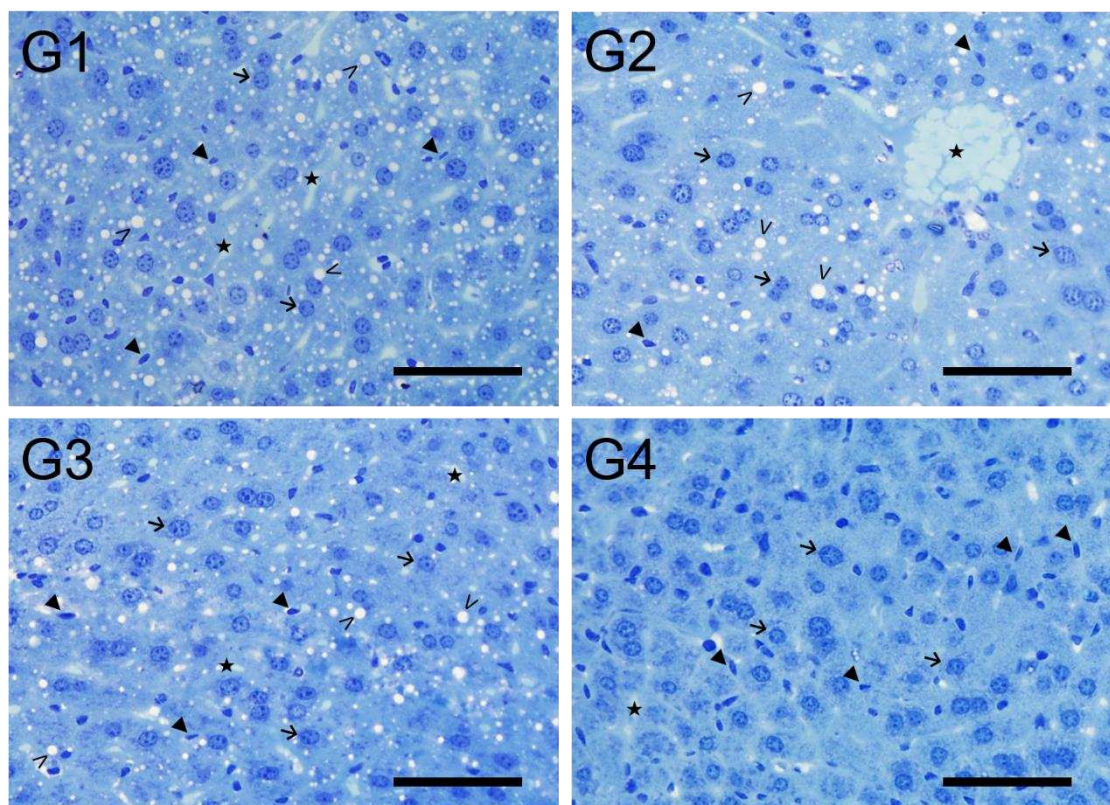


Figura 02. Fotomicrografias representativas de cortes de fígado de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde. Coloração: Azul de Toluidina - Borato de Sódio. (→) Núcleo de hepatócito; (▶) outras células; (>) Gotículas lipídicas; (★) Vasos sanguíneos. Barra = 40µm. G1=DC+H₂O; G2=DP+H₂O; G3=DC+ICV; G4=DP+ICV.

Efeitos nos parâmetros bioquímicos

As análises do estresse oxidativo do fígado mostraram um aumento nos níveis do marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) apenas no grupo que mudou de dieta (G2, $p=0,033$), como mostra a Tabela 04.

Tabela 04. Indicadores do estresse oxidativo no fígado de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

Fígado	G1	G2	G3	G4
PTNt (mg/ml) *	81,06 ± 5,55	78,64 ± 2,30	80,32 ± 8,23	82,86 ± 3,37
CAT (µMol/g/min) *	5,24 ± 2,38	6,80 ± 1,09	4,64 ± 1,26	4,76 ± 1,47
SOD (U SOD/mg protein) *	0,18 ± 0,013	0,18 ± 0,019	0,17 ± 0,027	0,16 ± 0,016
GST (µMol/g/min) *	3,98 ± 1,36	3,86 ± 0,41	3,01 ± 0,35	3,78 ± 0,56
MDA (nMol/mg protein) †	0,025 ± 0,0013 ^a	0,029 ± 0,0017 ^b	0,024 ± 0,0022 ^a	0,025 ± 0,0025 ^{ab}

Os valores são representados pelas médias ($n=6$) ± desvio padrão. As médias foram analisadas pelo teste ANOVA “one way” seguido do teste post hoc Holm-Sidak. Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes. PTNt, proteína total; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; GST, glutathiona-S-transferase; MDA, malondialdeído. G1=DC+H₂O; G2=DP+H₂O; G3=DC+ICV; G4=DP+ICV.

* Não houve diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

† Houve efeito significativo para o grupo que mudou de dieta (G2, $p=0,033$).

Não houve alterações nos níveis de albumina ($p=0,618$) e PTNt ($p=0,661$) no soro. Os níveis de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos são apresentados na Tabela 05, enquanto os níveis das enzimas indicadoras da função hepática são apresentados na Figura 03.

Tabela 05. Níveis de colesterol total, suas frações e triglicerídeos no soro de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde

mg/dL	G1	G2	G3	G4
Colesterol total *	115,86 ± 14,33	101,86 ± 9,92	102,14 ± 11,20	104,14 ± 15,99
HDL †	80,00 ± 9,04	72,71 ± 7,48	68,14 ± 5,78	67,28 ± 13,14
LDL ‡	26,29 ± 5,38 ^{ab}	20,43 ± 4,28 ^a	26,27 ± 6,40 ^{ab}	29,43 ± 6,45 ^b
VLDL §	9,57 ± 0,53 ^a	8,71 ± 1,11 ^{ab}	7,71 ± 1,89 ^{ab}	7,43 ± 1,51 ^b
Triglicerídeos **	47,29 ± 3,12 ^a	44,29 ± 6,02 ^{ab}	38,29 ± 8,54 ^{ab}	37,00 ± 7,23 ^b

Os valores são representados pelas médias ($n=6$) ± desvio padrão. As médias foram analisadas pelo teste ANOVA “one way” seguido do teste post hoc Holm-Sidak. Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes. G1=DC+H₂O; G2=DP+H₂O; G3=DC+ICV; G4=DP+ICV.

* Não houve diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

† Apresentou tendência ($p=0,064$) para redução do HDL nos grupos tratados com a ICV (G3 e G4).

‡ Houve diferença estatística apenas entre o grupo que mudou de dieta tratado com ICV e o grupo que mudou de dieta (G4 e G2) ($p=0,41$).

§ Houve diferença estatística apenas entre o grupo tratado com DC (G1) e o grupo que mudou de dieta e foi tratado com ICV (G4) ($P=0,041$).

** Houve tendência à redução no grupo tratado com DC e ICV (G3) ($p=0,08$). Houve diferença estatística entre o grupo tratado com DC (G1) e o grupo que mudou de dieta e foi tratado com ICV (G4) ($P=0,046$).

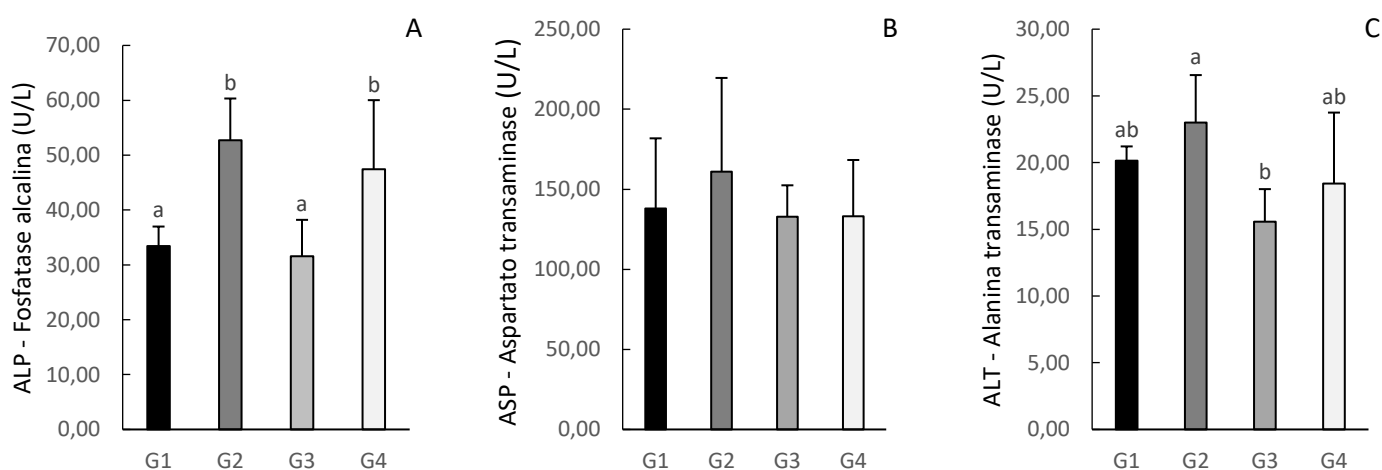


Figura 03. Testes da função hepática de camundongos tratados com dieta de cafeteria, dieta padrão e infusão de chá verde. Os valores são representados pelas médias ($n=6$) com seu desvio padrão representado pela barra. As médias foram analisadas pelo teste ANOVA “one way” seguido do teste *post hoc* Holm-Sidak. Letras diferentes indicam médias diferentes ($p\leq 0,05$). **A** – Fosfatase alcalina (ALP). ($p\leq 0,01$). **B** – Aspartato transaminase (ASP). Não houveram diferenças estatísticas entre as médias ($p=0,550$). **C** – Alanina transaminase (ALT). G2 apresentou diferença de G3 ($p=0,003$).

Discussão

A mudança na composição da dieta foi a principal causa da perda de peso, sendo responsável pela redução de 13,23% (G2). A ICV, por sua vez, contribuiu com aproximadamente 2% em ambos os grupos que a tomaram. Na literatura os resultados quanto ao peso variam dependendo da dosagem utilizada, podendo chegar à 95,6% na redução do ganho de peso em animais mantidos em dieta hiperlipídica suplementada com EGCG (75mg/Kg) (SAMPATH et al., 2017). Um dos mecanismos prováveis para a perda de peso causada pelo chá verde, seria que a EGCG poderia levar à perda de peso por inibição não competitiva da ação da enzima lipase pancreática, levando a uma diminuição na digestão e absorção dos lipídios dos alimentos ingeridos, constatado pelo aumento significativo no conteúdo lipídico nas fezes de animais tratados (GROVE et al., 2012). Porém, os mesmo autores sugerem que este mecanismo pode não ser responsável isoladamente pelo efeito na redução do ganho de peso em estudos utilizando modelos animais. Por outro lado, as catequinas presentes no chá são capazes de inibir a enzima catecol o-metiltransferase (COMT) de forma a preservar a norepinefrina, neurotransmissor que estimula a oxidação de lipídios e vias de sinalização da termogênese adaptativa, aumentando assim o gasto energético proveniente de gorduras (WESTERTERPLANTENGA, 2010), e assim contribuindo também para a redução do peso corporal.

Apesar de dietas com calorias reduzidas resultarem em perda de peso independente do balanço entre os macronutrientes (MITCHELL et al., 2009), sugerimos que o fator dieta foi importante nos nossos resultados, já que a dieta padrão para roedores é mais rica em fibras (Tabela 1) que a dieta de cafeteria, podendo assim levar a uma menor biodisponibilidade de suas calorias.

A combinação da dieta padrão com a ICV promoveu redução de 15,10% no peso ao final de 5 semanas de tratamento, levando-nos a concluir que a infusão do chá verde pode auxiliar a perda de peso, quando associada à mudanças nos hábitos alimentares. A inclusão do chá na dieta hiperlipídica levou à perda de apenas 3,56% do peso inicial (G3). Em outro estudo, as folhas do chá suplementadas na dieta, associado à atividade física voluntária promoveu uma redução de 27,1% do peso corporal dos camundongos quando comparados ao grupo controle que ingeria uma dieta com 60% de lipídios (SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014). Além disso, neste mesmo estudo, houve também a redução de indicadores da síndrome metabólica; a resistência à insulina diminuiu em

65%, assim como a insulina plasmática e a glicose em estado de jejum teve redução de 17%. Foi observado também aumento na expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos, no fígado e no músculo esquelético, dos animais tratados com chá verde associado a exercício voluntário (SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014), o que auxiliou na redução do peso corporal.

Importante também destacar que, apesar da redução do peso corporal, houve manutenção do peso do fígado e aumento da quantidade de água no órgão nos grupos tratados com a ICV. Este resultado é coerente visto que houve redução da quantidade de gotas lipídicas hepáticas, aumento do espaço citoplasmático do hepatócito e manutenção do índice hepatossomático, o que comprova não ter ocorrido edema. Outro estudo, onde foram utilizadas doses diferentes de extratos de chá verde, também não encontrou diferenças nos pesos do fígado (HUANG et al., 2009). Em um estudo recente, a dieta hiperlipídica (45% das calorias em gorduras) aumentou o peso do fígado e o tratamento com EGCG atuou reduzindo o peso do órgão (SAMPATH et al., 2017).

Os componentes do chá podem também atuar como estimulantes do metabolismo. Sabe-se que a cafeína, também encontrada no chá verde, pode atuar como estimulante da oxidação lipídica e da termogênese adaptativa (DULLOO et al., 1999; WESTERTERP-PLANTENGA; LEJEUNE; KOVACS, 2005), sendo um agente potencialmente redutor de massa corporal por si só ou agindo sinergicamente com os compostos bioativos presentes no chá verde (HUANG et al., 2009; NOMURA et al., 2008; WESTERTERP-PLANTENGA, 2010; WESTERTERP-PLANTENGA; LEJEUNE; KOVACS, 2005).

O período de indução com a dieta de cafeteria levou o fígado dos animais a um estado de esteatose hepática, com grande parte dos hepatócitos apresentando inclusões lipídicas (CHATKIN et al., 2008; SASS; CHANG; CHOPRA, 2005), como apresentado na Figura 2. A esteatose ocorre quando os níveis de lipídios importados e sintetizados no fígado excedem a taxa de exportação e catabolismo (ANSTEE; GOLDIN, 2006). O tratamento com a infusão de chá verde conseguiu reduzir em 50,2% (G3) a porcentagem de gotas lipídicas no tecido hepático, sendo o chá combinado com a dieta responsável pela redução de 80,6% (G4, Tabela 3), revertendo o estado de esteatose para um estado morfológico normal do órgão. O chá mostrou-se eficiente na redução da quantidade de inclusões lipídicas, sendo um potencial agente no controle do estado de esteatose que, se não revertido, pode evoluir para cirrose e insuficiência hepática (CHATKIN et al., 2008).

Tal resultado é pertinente ao aumento do volume de água no órgão (Figura 1) e aumento na proporção da área ocupada pelo citoplasma (Tabela 3). Estudos com camundongos alimentados com dieta hiperlipídica indicam que o uso de extratos de chá verde pode reduzir a formação e manutenção de depósitos de tecido adiposo, contribuindo para a diminuição destes depósitos (HUANG et al., 2009; SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2014, 2015) e também para aumento do recrutamento lipídico originário de outros órgãos, como o fígado.

Neste estudo observamos que, tanto a mudança de dieta, de uma dieta rica em lipídios para uma dieta padrão e o tratamento com ICV atuaram na modificação estrutural do tecido hepático e influenciaram no estado oxidativo do órgão.

A mudança de dieta elevou os níveis de peroxidação lipídica, conseqüentemente elevando os níveis de malondialdeído no fígado nos animais do grupo que trocou de dieta e não foi tratado com o chá. No grupo que alterou sua dieta e foi tratado com a ICV não foi detectado níveis superiores de MDA, provavelmente devido à ação antioxidante do extrato (WESTERTERP-PLANTENGA; LEJEUNE; KOVACS, 2005).

O fígado atua como protagonista no metabolismo de carboidratos e lipídios, tendo papel fundamental no metabolismo energético (ANSTEE; GOLDIN, 2006; CUPERTINO et al., 2013). O acúmulo de gordura no fígado, configurando a esteatose, é coadjuvante na patogênese de várias doenças do órgão (ANSTEE; GOLDIN, 2006). Neste estudo percebeu-se a modificação do perfil lipídico, com aumento no colesterol LDL em G4, que passou por mudança de dieta e tratamento com ICV. Tal aumento pode ser justificado pelo incremento do catabolismo energético no fígado elevando as partículas LDL, que por sua vez permanecem por mais tempo no sangue (SBC, 2007). Em contrapartida houve efeito positivo do ICV, com redução do colesterol VLDL e dos triglicerídeos totais também em G4 (Tabela 05).

A mudança de dieta sozinha e acompanhada pela ICV (G2 e G4) conseguiram alterar os níveis da ALP aproximando-os da normalidade para a linhagem de camundongo, porém ainda longe da média da espécie (ALMEIDA et al., 2008). Os valores de ALT também sofreram alterações de forma que o grupo G3 (tratado apenas com a ICV) diferiu do grupo que mudou apenas de dieta (G2), porém ambas as médias não diferiram do controle (G1). Tais variações podem acontecer devido às mudanças drásticas nas composições da dieta e modificação no estado metabólico dos animais, não

significando melhora ou piora na função hepática. Os dados de ALT têm pouca correlação com dados histomorfométricos (OZER et al., 2008) e a partir de nossa análise, com melhora no estado de esteatose, não podemos inferir sobre a função já que as médias da ALT foram próximas entre si e iguais ao controle.

Nossos resultados em conjunto indicam que a ICV na dose testada, apesar de ser alta e ter concentrações de extrato correspondente a aproximadamente 1,5L da bebida preparada da forma convencional como indica o fabricante na embalagem, contribuem para alterar o metabolismo lipídico de forma positiva, auxiliando na redução do acúmulo lipídico no fígado sem causar danos ao órgão.

Conclusões

Os resultados encontrados em nosso trabalho vão ao encontro de outros estudos que apontam o chá verde como um agente antioxidante, que pode ter papel coadjuvante na perda de peso, sem apresentar efeitos tóxicos ao fígado em doses comumente utilizadas por humanos. Somado ao fato de ser amplamente consumido em todo o mundo, o chá verde pode ser considerado uma opção de fitoterápico que pode auxiliar no combate a obesidade e sobrepeso, bem como atuar como coadjuvante no tratamento da esteatose hepática.

Conflito de interesses

Não há conflito de interesses relativos a este artigo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por fornecer apoio e estrutura para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Laboratório de Nutrição Experimental, por permitir o uso do biotério de experimentos. Ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, pelo apoio com as análises de estresse oxidativo. Ao Laboratório de Biologia Estrutural, pelo apoio com as análises morfológicas e desenvolvimento do experimento e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado de L. C. M. Ladeira.

Bibliografia

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. Methods in Enzymology. [s.l.] Elsevier, 1984. v. 105p. 121–126.
- ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 429–432, 2008.
- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 1, p. 1–16, 2006.
- CHALOVICH, J. M.; EISENBERG, E. Green tea consumption, inflammation and the risk of primary hepatocellular carcinoma in a Chinese population. **Biophysical Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2432–2437, 2005.
- CHATKIN, J. M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of cirrhosis. **Scientia Medica**, v. 18, n. 4, p. 172–176, 2008.
- CUPERTINO, M. C. et al. Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 5, p. 343–351, 2013.
- DIETERICH, S. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33–39, 2000.
- DULLOO, A. G. et al. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 6, p. 1040–1045, 1999.
- EL-BESHBISHY, H. A. Hepatoprotective effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 5, p. 563–570, 2005.
- GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 3, p. 334–350, 1992.

- GROVE, K. A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Pancreatic Lipase and Reduces Body Weight Gain in High Fat-Fed Obese Mice. **Obesity**, v. 20, n. 11, p. 2311–2313, 2012.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 129–135, 1990.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 22, p. 7130–7139, 1974.
- HASEGAWA, R. et al. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 11, p. 961–965, 1995.
- HUANG, Y. W. et al. Anti-obesity effects of epigallocatechin-3-gallate, orange peel extract, black tea extract, caffeine and their combinations in a mouse model. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 304–310, 2009.
- JIN, X.; ZHENG, R.; LI, Y. Green tea consumption and liver disease: a systematic review. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 28, n. 7, p. 990–996, 2008.
- JOHNSON, R.; BRYANT, S.; HUNTLEY, A. L. Green tea and green tea catechin extracts: An overview of the clinical evidences. **Maturitas**, v. 73, n. 4, p. 280–287, 2012.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137–138, 1965.
- LAMBERT, J. D. et al. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 409–416, 2010.
- LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 217, n. 2, p. 220–230, 1994.
- MICHELE MOLINARI et al. Acute Liver Failure Induced by Green Tea Extracts: Case Report and Review of the Literature. **Liver Transplantation**, v. 13, n. 3, p. 465–466, 2007.

MITCHELL, P. et al. Comparison of Weight-Loss Diets with Different Compositions of Fat, Protein, and Carbohydrates. **The New England Journal of Medicine**, p. 557–568, 2009.

MOLINA, N.; BOLIN, A. P.; OTTON, R. Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. **International Immunopharmacology October**, v. 28, n. 2, p. 985–996, 2015.

NAVARRO, V. et al. Liver Injury from Herbal and Dietary Supplements. **Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 1–37, 2016.

NOMURA, S. et al. Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 840–7, dez. 2008.

NOVAES, R. D. et al. Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 1, p. 62–70, 2012.

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194–205, 2008.

PERVA-UZUNALIĆ, A. et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 597–605, 2006.

SAE-TAN, S.; ROGERS, C. J.; LAMBERT, J. D. Voluntary exercise and green tea enhance the expression of genes related to energy utilization and attenuate metabolic syndrome in high fat fed mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 5, p. 1156–9, 2014.

SAE-TAN, S.; ROGERS, C. J.; LAMBERT, J. D. Decaffeinated green tea and voluntary exercise induce gene changes related to beige adipocyte formation in high fat-fed obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 210–214, abr. 2015.

SAMPATH, C. et al. Green tea epigallocatechin 3-gallate alleviates hyperglycemia and reduces advanced glycation end products via nrf2 pathway in mice with high fat diet-induced obesity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 73–81, 2017.

SANO, M. et al. Effect of Tea (*Camellia sinensis* L.) on Lipid Peroxidation in Rat Liver and Kidney: a Comparison of Green and Black Tea Feeding. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 7, p. 1006–1008, 1995.

SASS, D. A.; CHANG, P.; CHOPRA, K. B. Nonalcoholic fatty liver disease: A clinical review. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 1, p. 171–180, 2005.

SBC, S. B. D. C. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v. 8, n. SUPL.1, p. 2–19, 2007.

WESTERTEP-PLANTENGA, M. S. Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. **Physiology and Behavior**, v. 100, n. 1, p. 42–46, 2010.

WESTERTEP-PLANTENGA, M. S.; LEJEUNE, M. P. G. M.; KOVACS, E. M. R. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. **Obesity research**, v. 13, n. 7, p. 1195–1204, 2005.

4. Considerações finais

O projeto proposto no início do meu treinamento de mestrado, intitulado **“Efeitos da ingestão do chá verde (*Camellia sinensis*) sobre a morfo-fisiologia do tecido adiposo branco e pardo em camundongos C57BL/6, após a indução da obesidade”** tinha como principal objetivo avaliar as mudanças ocorridas no tecido adiposo dos animais submetidos ao tratamento com a infusão de chá verde. De fato, o experimento foi desenhado com este propósito e as análises ainda *seguem* a fim de alcançar os objetivos deste projeto.

O artigo apresentado contempla um dos objetivos traçados no projeto original, que consistia na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do chá na dose testada. De tal forma, avaliamos o fígado e o rim. Escolhemos apresentar os resultados pertinentes ao fígado por estarem completos e com todas as análises prontas, visto que o treinamento de mestrado é um período curto, com disciplinas, e com desafios que muitas vezes se colocam frente ao andamento das atividades.

Tais desafios no mestrado me serviram para entrar no ritmo da pesquisa e, um após o outro, foram se tornando mais fáceis de superar. Trabalhamos em vários laboratórios com o auxílio e participação de várias pessoas, pois não é possível desenvolver tal trabalho de maneira isolada e independente. Cada pessoa contribuiu de sua forma com o desenvolvimento do trabalho, seja com as análises, experimento, escrita do texto ou no dia a dia da pesquisa.

Ainda há uma parcela considerável de trabalho para alcançarmos os objetivos propostos e estamos trabalhando para o cumprimento de todos eles. Consideramos não coletar apenas os órgãos de interesse para o projeto original, mas também outros que poderiam sofrer efeitos do tratamento utilizado. Com isso, obtivemos uma grande quantidade de material biológico derivado deste experimento que aguarda considerações sobre viabilidade de análise e podem gerar futuros trabalhos.

Um dos órgãos colhidos, o coração, já está sendo trabalhado, em parceria com uma estagiária do curso de Ciências Biológicas, e esperamos poder com os resultados advindos desta análise, contribuir para a elaboração de uma monografia de conclusão de curso.

Os depósitos de tecido adiposo já foram processados e não aparecem neste documento final por problemas técnicos com o microscópio onde as lâminas foram fotografadas. Tal problema levou a perda de todas as fotos salvas no computador do microscópio. Frente a isso, resolvemos focar os esforços no término do artigo sobre os efeitos no fígado pois o prazo já estaria curto para refazer as fotos. Apesar disso, com o trabalho ainda em andamento, estamos produzindo um artigo que responderá às questões sobre as modificações morfológicas no tecido adiposo.

Além disso, a pós-graduação enquanto formadora de futuros professores do ensino superior, me deu a oportunidade de desenvolver outros dois projetos de extensão. Ambos com uma proposta parecida porém com temas diferentes. Em 2016, no primeiro semestre, desenvolvi, juntamente com outra estudante de mestrado e dois estudantes do doutorado, um Curso Lúdico de Biologia Celular (CUR-310/2016). Neste projeto tivemos a participação de 90 alunos da disciplina BIO 111 – Biologia Celular, e apresentamos o conteúdo da disciplina através de metodologias lúdicas. Nossos alunos tiveram médias finais 6% maiores que a média dos alunos que não atenderam ao curso.

No segundo semestre, com o mesmo grupo somado a mais dois alunos da pós-graduação, desenvolvemos o Curso de Extensão em Histologia (CUR-530/2016), com 75 alunos matriculados, aberto a todos os interessados no assunto. A proposta foi apresentar os conteúdos da Histologia com metodologias alternativas como filmes e jogos. Tais projetos nos proporcionaram espaços para aprender e exercitar a prática docente, além do estágio em ensino, tão importantes para futuros professores como nós, alunos da pós-graduação.

O mestrado trouxe vários desafios e com eles tiramos lições importantes para a nossa formação. Sem dúvida, há, ainda, muito trabalho pela frente.