

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Efeito dos diferentes chás da *Camellia sinensis* sobre danos  
causados pela obesidade induzida pela dieta de cafeteria**

**Melina Bucco Soares**

**Uruguaiana**

**2018**

**MELINA BUCCO SOARES**

**Efeito dos diferentes chás da *Camellia sinensis* sobre danos causados pela  
obesidade induzida pela dieta de cafeteria**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francielli Weber Santos Cibin

**Uruguaiiana**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S576e Soares, Melina Bucco

Efeito dos diferentes chás da *Camellia sinensis* sobre danos  
causados pela obesidade induzida pela dieta de cafeteria /  
Melina Bucco Soares.

101 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO  
EM BIOQUÍMICA, 2018.

"Orientação: Francielli Weber Santos Cibirin".

1. Dieta de Cafeteria. 2. Memória. 3. *Camellia sinensis*. 4.  
Obesidade. 5. Ovário. I. Título.

**MELINA BUCCO SOARES**

**Efeito dos diferentes chás da *Camellia sinensis* sobre danos causados pela  
obesidade induzida pela dieta de cafeteria**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto  
Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do  
Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título  
de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Tese defendida e aprovada em 14 de Julho de 2018.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francielli Weber Santos Cibin  
Orientadora  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mauren Assis de Souza  
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Prigol  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiana Ávila  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

“Dedico esta tese aos meus pais, irmão Pablo e esposo Vinícius .... Com vocês ao lado, o caminho torna-se mais leve, obrigada pelo amor, carinho e presença”

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus, pela vida! Por todas as vitórias que tive, e por todas as quedas eu ter sido amparada e ter aprendido a valorizar ainda mais os degraus. Obrigada por todas as pessoas que passaram pela minha vida, e principalmente pelas que permanecem e me fazem uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Izabel, por estarem sempre no meu lado, acreditarem e me ampararem nos meus sonhos. Por todas as vezes que tiveram que secar minhas lágrimas (mesmo que a distância) e sorrirem comigo. Sou muito grata por todo apoio, pelo amor sem medidas, pelos exemplos, pelas orações. Ao meu irmão, Pablo, minha família é o alicerce de tudo, onde me sinto amparada e protegida. Obrigada por entenderem minha ausência. Amo vocês! Com certeza essa vitória também é de vocês!

Falando em família, obrigada Vine! Tenho certeza que tu és papel fundamental na conclusão do doutorado, sempre me apoiando e me incentivando. Quantas vezes não acreditei em mim, e tu estava ao lado, para me dizer que eu realmente era capaz. Foi de ti que ouvi as palavras mais incentivadoras. Obrigada pela ajuda (principalmente na padronização e realização das “bolachinhas” das camundongas, foram 16 semanas intensas de fabricação), pelo amor, incentivo! Joeyzinho.. meu fiel companheiro!! Amor e lambidas essenciais... Carmela, gatinha que chegou para completar e alegrar nossa família! Obrigada minha nova família.

Fran! Não poderia ter orientadora melhor! Agradeço a Deus, por ter te encontrado na minha vida acadêmica, e na minha vida pessoal. Tu és uma pessoa iluminada! Exemplo de pessoa, de profissional, de pesquisadora. Obrigada pela dedicação e incentivo, e por nos ensinar a amar a ciência! Se tenho orgulho da pesquisadora que me tornei, foi graças a teu exemplo. Obrigada por tudo!!

Família BIOTECH! Todo trabalho é mais prazeroso quanto temos amigos ao lado! Obrigada a todos, que estão sempre prontos para ajudar e fazer as coisas acontecerem! Obrigada Cris Spiazzi!! Pelas caronas, pelas correções, pelo trabalho (com música), e principalmente pela amizade!! Ju, Cris, Vine e Diogo, nosso cafezinho e risadas depois do almoço, tornaram esses últimos dias mais leves e agradáveis (todo fim de tese é tensa).

Quero agradecer a ajuda, aos aprendizados e carinho da Professora Pâmela Carpes e também a Helen...muito aprendi com vocês! Helen, tu fois muito importante no meu trabalho! Sempre alto astral nas tão longas horas de comportamento! Obrigada

Obrigada SUPERS, Laurinha e Mauren, pelas conversas, risadas, incentivo e principalmente pela amizade! Vocês são essenciais na minha vida.

## RESUMO

Ao longo das últimas décadas, o consumo de dietas ricas em gordura e açúcar tem aumentado significativamente gerando grandes problemas de saúde mundial incluindo obesidade e suas complicações. Além disso, tem sido sugerido que a obesidade pode gerar alterações na memória e no sistema reprodutivo. Neste contexto, a utilização de compostos naturais com baixos custos e efeitos colaterais reduzidos e que apresentem atividade antioxidante, como os chás, poderiam reduzir os danos induzidos pelo modelo experimental de obesidade. Este estudo tem por objetivo investigar o efeito dos diferentes chás (*Camellia sinensis*) branco, verde, vermelho e preto sobre parâmetros bioquímicos, alterações reprodutivas e de memória induzidos por uma dieta de cafeteria (DC) em um modelo de obesidade. Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss, com 20-25g e os animais receberam dieta padrão ou DC, durante 8 semanas. Concomitante os animais receberam por via oral os Chás (preto, verde, branco e vermelho) (dose de 1%) ou água. As camundongas foram pesadas semanalmente para avaliar o ganho de peso final. Após o tempo de tratamento, foram realizados testes comportamentais para avaliar a atividade locomotora (open field), comportamento tipo ansioso (labirinto em cruz elevada), teste de memória (reconhecimento de objetos). Os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para a realização de testes bioquímicos (glicose, colesterol, triglicérides, leptina). A gordura visceral foi retirada e pesada, além disso, para analisar parâmetros de estresse oxidativo foram removidos hipocampo e ovário, sendo que desse último também foi analisado por histologia. No artigo 1: as camundongas que foram submetidas a DC apresentaram ganho de peso, acúmulo de gordura corporal, aumento dos níveis de glicose, colesterol e triglicérides, associados a déficits de memória e aumento dos níveis de espécies reativas (ER) e da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo. Todos os chás reduziram significativamente a atividade da AChE e parcialmente o acúmulo de gordura. Chás verdes e vermelhos reduziram o déficit de memória. Os chás branco, verde e preto reduziram os níveis de ER, enquanto apenas o chá verde e o preto reduziram os níveis de triglicérides no plasma. Diante dos resultados obtidos, o chá verde foi melhor que os demais chás na redução de efeitos dos danos causados pela CD uma vez que foi capaz de proteger em um maior número de parâmetros analisados. No manuscrito 1 após as 8 semanas de tratamento as camundongas que ingeriram a CD apresentaram estresse oxidativo nos ovários, evidenciado pelo aumento significativo de ER e diminuição da capacidade antioxidante total. Além disso, houve aumento de oito vezes na concentração de leptina sanguínea nos animais alimentados com dieta comparados com o controle. Os chás verde, vermelho e preto reverteram parcialmente a hiperleptinemia, enquanto os chás branco, verde e preto restauraram a FRAP aos níveis do controle. Tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que o consumo de uma DC causa prejuízos ao organismo, como déficit de memória e alterações no ovário e os chás poderiam, ao menos em parte, em proteger dos danos causados pelo consumo deste tipo de dieta.

Palavras-chave: Dieta de Cafeteria, Obesidade, Memória, *Camellia sinensis*, Leptina, Ovário.

## ABSTRACT

Over the past few decades, consumption of high-fat and high-sugar diets has increased significantly, generating major health problems worldwide including obesity and its complications. In addition, it has been suggested that obesity can impair memory and reproductive system. In this context, the use of natural compounds with low costs and reduced side effects and antioxidant activity, such as teas, could reduce the damages induced by the experimental model of obesity. This study aims to investigate the effect of different white, green, red and black teas (*Camellia sinensis*) on parameters of obesity induced by a cafeteria diet (CD). Swiss female mice were used with 20-25g and the animals received standard or CD diet for 8 weeks. Concomitant animals received orally the Teas (black, green, white and red) (1% dose) or water. The mice were weighed weekly to evaluate the final weight gain. After treatment, behavioral tests were performed to evaluate the locomotor activity (open field), axiolitic like behavior (plus maze), behavioral memory test (object recognition). The animals were euthanized and blood was collected for biochemical tests (glucose, cholesterol, triglycerides, leptin). Visceral fat was removed and weighed; in addition, to analyze parameters of oxidative stress were removed hippocampus and ovary, and the latter was also analyzed by histology. In the first article, mice submitted to CD presented weight gain, accumulation of body fat, increased levels of glucose, cholesterol and triglycerides, associated with memory deficits and increased levels of reactive species (RS) and acetylcholinesterase activity (AChE) in hippocampus. All teas significantly reduced AChE activity and partially fat accumulation. Green and red teas reduced memory deficit. White, green and black teas reduced ER levels, while only green and black tea reduced plasma triglyceride levels. Considering the results obtained, green tea was better than others teas in reducing the damages caused by the CD since it was able to protect in a greater number of parameters analyzed. In the first manuscript, after 8 weeks treatment mice that ingested the CD presented oxidative stress in the ovaries, evidenced by the significant increase of ER and decrease of the total antioxidant capacity. In addition, there was an eight-fold increase in blood leptin concentration in diet fed animals compared to control. Green, red and black teas partially reverse hyperleptinemia, while white, green and black teas restore FRAP to control levels. Considering the results obtained with this study, we can conclude that the consumption of CD causes damages the body, such as memory deficit and alterations in the ovary and teas could, at least in part, protect against the damages caused by the consumption of this type of diet.

Key-words: Cafeteria diet, Obesity, Memory, *Camellia sinensis*, Leptin, Ovary.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Figura 1 – Representação esquemática do efeito da leptina sobre receptores do hipotálamo	20
Figura 2 – Diferença entre ciclos reprodutivos em humanos e em ratas	23
Figura 3 – A potencial interação entre adipocinas e a reprodução feminina	27
Figura 4 – Imagem da planta <i>Camellia sinensis</i>	35
Figura 5 – Estrutura das principais catequinas.	39
Figura 6 - Etapas do processamento dos chás	42

### ARTIGO 1 - Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet

Figure 1 - Experimental procedure.	52
Table 1 - Catechins concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) in sample of white, green, red, and black tea.	51
Table 2 - Effect of CD and teas on body weight, body fat, levels of glucose, total cholesterol, triglycerides	53
Table 3 - Effects of CD and teas on locomotor and anxiety parameters evaluated in the OF test.	54
Figure 2 - Effect of CD and teas on OR memory test in mice (n = 8–10).	54
Figure 3 - Effect of CD and teas on OR memory (OR index) (n = 8–10).	54
Figure 4 - Effect of CD and teas on RS levels in mice hippocampus (n = 6).	55
Figure 5 - Effects of CD and teas on SOD in mice hippocampus (n = 6).	55

Figure 6 - Effect of CD and teas on AChE activity in mice hippocampus (n = 6).	55
Figure 7 - Effects of CD and teas on FRAP in mice hippocampus (n = 6).	55
<b>MANUSCRITO 1 -</b>	
Table 1 - Content of phenolic compounds and flavonoids present in <i>Camellia sinensis</i> tea.	68
Figure 1- Effect of CD and teas on RS levels in mice ovary (n = 6).	69
Figure 2 - Effects of CD and teas on FRAP in mice ovary (n = 6).	69
Figure 3 - Effect of CD and tea on plasma leptin levels of mice after 8 weeks of treatment. (n = 4).	69
Figure 4 – Histological structure of mouse ovary	70

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina  
AChE: Acetilcolinesterase  
AgRP: proteína relacionada a agouti  
BDNF: Fator Neurotrófico derivado do encéfalo  
BHE: Barreira hematoencefálica  
CART: Transcrito regulado por cocaína e anfetamina  
CAT: Catalase  
CTC: Crush tea curl  
DA: Doença de Alzheimer  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
EC: Epicatequina  
ECG: Epicatequina Galato  
ECGC: Epigallocatequina Galato  
EGC: Epigallocatequina  
ERN: Espécie Reativa de Nitrogênio  
ERO: Espécies reativas de Oxigênio  
FSH: Hormônio folículo estimulante  
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas  
GPx: Glutathione Peroxidase  
GR: Glutathione Redutase  
GSH: Glutathione  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
IL 6: Interleucina 6  
IMC: Índice Massa Corporal  
LDL: Low density lipoprotein  
LH: Hormônio Luteinizante  
MCP: Proteína Quimiotática para Monócitos  
NO: Óxido Nítrico  
NOO: Peroxinitrito  
NPY: Neuropeptídeo y  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion Superóxido  
Ob/ob: obeso/obeso  
OH: Radical Hidroxil  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PFO: Polifenol Oxidase  
POMC: Pro-opiomelanocortina  
RL: Radicais Livres  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SOD: Superóxido Dismutase  
SOP: Síndrome Ovário Policístico  
TAS: Tecido Adiposo Subcutâneo  
TAV: Tecido Adiposo Visceral  
TNF  $\alpha$ : Fator de Necrose tumoral alfa  
VIGITEL: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico  
 $\alpha$ - MSH: alfa hormônio estimulador de melanócito

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	11
2.	Referencial teórico .....	14
2.1	Dieta de cafeteria .....	14
2.2	Obesidade .....	15
2.2.1.	Tecido Adiposo .....	17
2.2.2.	Leptina .....	19
2.2.3.	Sistema Reprodutivo .....	22
2.2.3.1.	Ciclo estral .....	22
2.2.3.2.	Obesidade e Reprodução .....	24
2.2.4.	Obesidade e déficit cognitivo .....	27
2.3.	Estresse Oxidativo .....	30
2.4.	<i>Camellia sinensis</i> .....	32
2.4.1	Histórico e Origem dos chás .....	33
2.4.2	Características da planta .....	34
2.4.3	Composição .....	35
2.4.4	Compostos fenólicos .....	37
2.4.4.1.	Flavonoides .....	38
2.4.4.2.	Catequinas .....	38
2.4.5.	Processamento dos chás .....	40
4.4.5.1.	Processo Ortodoxo ou Tradicional .....	40
4.4.5.2.	“Crush, Tear, Curl” .....	40
4.4.5.3.	Chá Branco .....	43
4.4.5.4.	Chá Verde .....	43
4.4.5.5.	Chá Vermelho .....	44
4.4.5.6.	Chá Preto .....	44
2.4.6.	Efeito dos chás à saúde .....	45
3.	Objetivos .....	47
3.1	Objetivo Geral .....	47
3.2	Objetivos Específicos .....	47
4.	Artigos .....	48
5.	Discussão dos Artigos .....	76
6.	Conclusão .....	78
7.	Referências .....	79
	ANEXO I – Certificado de aprovação de Protocolo para uso de animais em pesquisa .....	98

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública em diversos países do mundo, principalmente nas sociedades ocidentais e industrializadas (Baker, Olsen et al. 2007; Cobayashi, Oliveira et al. 2010). Ela pode ser caracterizada por um processo patológico complexo que inclui um estado de estresse oxidativo crônico (Higdon and Frei 2003), associado a processos metabólicos e inflamatórios (Hursting and Berger 2010), levando ao desenvolvimento de diversas doenças: diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão arterial (Eikelis, Schlaich et al. 2003), câncer (Shehzad, Khan et al. 2012), déficit cognitivo (de la Monte, Longato et al. 2009) e disfunção reprodutiva (Brewer and Balen 2010).

A principal causa do sobrepeso e da obesidade está relacionada com o desequilíbrio prolongado entre o consumo alimentar e o gasto energético, resultando no excesso de gordura corporal (Sarturi, das Neves et al. 2010; Pinho, Diniz Ada et al. 2013). O tecido adiposo, antes considerado um simples reservatório de energia, passou a ser entendido como um complexo órgão com múltiplas funções, participando da regulação endócrina do organismo (Volp 2008). Ele é responsável pela liberação de proteínas conhecidas como adipocinas dentre elas: adiponectina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), leptina (Ouchi, Parker et al. 2011), que exercem ações sobre diferentes sistemas biológicos e que são importantes reguladores do metabolismo energético e de processos inflamatórios (Scherer 2006).

A leptina é um hormônio presente na circulação em quantidade proporcional à quantidade de tecido adiposo (Maffei, Halaas et al. 1995), e atua sobre os reguladores centrais da ingestão alimentar produzindo saciedade. Além disso, é um componente importante no processo de sinalização do estado nutricional ao eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas, influenciando os estados de transições reprodutivas, como a puberdade e a maturação sexual em roedores (Iwasa, Matsuzaki et al. 2010; Elias and Purohit 2013).

Na obesidade, os altos níveis circulantes de leptina não induzem a diminuição do consumo alimentar, indicando que pessoas obesas estão resistentes à ação da leptina (Jung and Kim 2013). Uma concentração suficiente de leptina é necessária para a função reprodutiva normal (Landry, Cloutier et al. 2013) sendo que o aumento na sua concentração está associada com piora da fecundidade (Brewer and Balen 2010). Mulheres obesas sofrem mais de alterações do ciclo menstrual, piora da ovulação, com

consequente efeito negativo sobre o endométrio e implantação. Também ocorre piora da resposta destas mulheres obesas aos tratamentos de reprodução assistida, bem como nas taxas de fertilização, implantação e concepção (Penzias 2012; Bellver, Mifsud et al. 2013).

Diversos estudos também têm demonstrado que a obesidade está fortemente relacionada à vulnerabilidade cerebral e aos distúrbios cognitivos (Bruce-Keller, Keller et al. 2009; van den Berg, Kloppenborg et al. 2009; Galioto, Alosco et al. 2013). Evidências sugerem que diversos mecanismos são susceptíveis de vincular obesidade e déficit cognitivo, supondo que a inflamação sistêmica e central presente na obesidade podem comprometer estruturas responsáveis pela memória (Nummenmaa, Hirvonen et al. 2012; Miller and Spencer 2014). Isso acontece devido as alterações envolvidas na fisiopatologia da obesidade, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Galic, Oakhill et al. 2010; Thaler, Yi et al. 2012), bem como presença de estresse oxidativo (de Farias, Bom et al. 2013).

Os sistemas envolvidos no processo de memória, dependem do bom funcionamento do SNC que, transmitem informações aos neurônios através de neurotransmissores específicos, como acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina e glutamato (Zimmerman and Soreq 2006). Nesse sentido, a acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina, é importante para o funcionamento do SNC, já que é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos, e está associada ao desenvolvimento encefálico, aprendizagem, memória (Zimmerman and Soreq 2006; Smith 2007).

Novas estratégias para o controle de peso contemplam o uso de compostos bioativos na dieta fornecendo potenciais efeitos antiobesidade. O chá tem sido utilizado no contexto de manter ou melhorar a saúde. O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Existem três tipos de chás obtidos da planta *Camellia sinensis*: não oxidados (chá branco e verde), parcialmente oxidado (Chá vermelho e oolong) e completamente oxidado (chá preto) (Almajano, Carbó et al. 2008). Tem sido relatado que os chás contêm muitas substâncias, tais como catequinas e outros polifenóis (Moriyama 2008), que parecem ser eficazes para a prevenção de diversas doenças (Basu and Lucas 2007; Bolling, Chen et al. 2009).

Considerando o número de indivíduos com sobrepeso e obesidade e o risco de desenvolver outras doenças associadas, apresenta-se a necessidade de conhecer mais sobre a fisiopatologia desta doença e os danos causados pela mesma sobre a memória e

sobre o sistema reprodutor. Além disso, comparar um possível efeito benéfico dos diferentes chás (*Camellia sinensis*): branco, verde, vermelho e preto.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. DIETA DE CAFETERIA

Existe uma grande variedade de modelos utilizados na indução da obesidade em animais. Alguns estudos baseiam-se em lesões em regiões específicas do SNC, como no núcleo ventromedial do hipotálamo, induzindo hiperfagia (Peters, Pellerin et al. 2007). Outras investigações, utilizam os modelos genéticos de obesidade, como os camundongos ob/ob, db/db e Agouti amarelo e os ratos Zucker (fa/fa) para a avaliação das anormalidades genéticas envolvidas no controle da homeostase energética (Sampey, Vanhoose et al. 2011). Entretanto, os modelos que induzem obesidade pelas mudanças na dieta são os que mais se assemelham à obesidade humana, por oferecer maior aporte calórico e são chamados de dieta de cafeteria, hiperlipídica ou dieta hiperpalatável (Kretschmer, Schelling et al. 2005; Prada, Zecchin et al. 2005; Cesaretti and Kohlmann Junior 2006; Sampey, Vanhoose et al. 2011).

Esse tipo de dieta com alta palatabilidade tem elevado teor de carboidratos, na sua maioria carboidratos simples, provenientes do uso de cereais refinados; grandes quantidades de gordura, principalmente gorduras saturadas e/ou *trans* e baixo teor de proteínas, fibras alimentares e micronutrientes (Elahi, Cagampang et al. 2009; Bayol, Simbi et al. 2010). Nas sociedades modernas, o consumo de grandes quantidades de açúcares e lipídios, bem como um estilo de vida sedentário, tem sido associado a distúrbios metabólicos e comprometimento da função cerebral (Unger and Orci 2001; Molteni, Barnard et al. 2002). Estudos em humanos com sobrepeso ou obesos mostram aumento na taxa de transtornos psiquiátricos, em especial transtornos de humor e ansiedade (Becker, Rinck et al. 2001; Chakravarthy and Booth 2004; Simon, Von Korff et al. 2006; Teegarden and Bale 2007)

A dieta de cafeteria produz aumento da ingestão calórica, aumento significativo de peso corporal e na quantidade de gordura visceral, alterações no metabolismo glicídico e lipídico, resistência à insulina e hiperleptinemia (Bailey, Flatt et al. 1986; Prada, Zecchin et al. 2005; Goularte, Ferreira et al. 2012).

A introdução da dieta de cafeteria aos animais pode ocorrer em diferentes etapas da vida, como estudos demonstraram aos 7 dias pós-parto (Dameto, Rayo et al. 1994),

após o desmame (Prats, Monfar et al. 1989), ou ainda, na fase adulta (Rothwell and Stock 1979). A ingestão dessa dieta por ratas prenhas produz também um quadro semelhante ao diabetes gestacional (Holemans, Caluwaerts et al. 2004). Estudos têm mostrado que o consumo desta dieta causa o estresse oxidativo (Barnard, Gonzalez et al. 2006; Campion, Milagro et al. 2006; Bullo, Casas-Agustench et al. 2007), por aumentar dos níveis de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica.

## **2.2. OBESIDADE**

O mundo vive atualmente o que podemos chamar de epidemia da obesidade, uma vez que a prevalência dessa doença tem crescido em proporções alarmantes durante os últimos anos. A obesidade é classificada como um problema de saúde pública em diversos países do mundo, principalmente nas sociedades ocidentais e industrializadas (WHO 2012; Mattes 2014)

A preocupação com a desenfreada expansão da obesidade ocorre devido a ela ser considerada o quinto maior fator de risco para doenças em todo o mundo (Keller and Lemberg 2003; Dulloo, Jacquet et al. 2010). A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos. No Brasil, a obesidade está crescendo cada vez mais, sendo que alguns levantamentos apontam que mais de 50% da população está acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade (Brasil 2017)

A etiologia da obesidade é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, ambientais, comportamentais e socioculturais (Sarturi, das Neves et al. 2010; Pinho, Diniz Ada et al. 2013). Nos últimos tempos ocorreu uma mudança muito grande tanto na composição da dieta diária, quanto como nos hábitos alimentares das sociedades ocidentais, em que uma percentagem crescente da população consome principalmente dietas ricas em gordura, ou açúcares, além de dietas com excesso de calorias (Weisburger 1997; Shaw, Hall et al. 2005). Além disso, os padrões alimentares adotados pela sociedade no atual estilo de vida, acarretaram em um modelo de sedentarismo que não se resume apenas na quantidade de calorias gastas, mas sim no excesso de calorias que é ingerido ao realizarmos certas atividades rotineiras como assistir televisão, ouvir música, jogar videogame (Chaput, Klingenberg et al. 2011).

A obesidade pode ser conceituada como uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, devido balanço energético positivo, acarretando repercussões à saúde, com perda importante na qualidade e no tempo de vida. Uma das classificações da obesidade foi proposto pela OMS, baseando-se no Índice de Massa Corporal (IMC) definido pelo cálculo do peso corporal, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros quadrados ( $IMC = kg/m^2$ ). Para ser classificada como obesa, uma pessoa necessita apresentar o IMC igual ou superior a 30, sendo que o indivíduo com IMC entre 25 e 29,9, ele já é classificado com sobrepeso (Pi-Sunyer 2000; WHO 2012).

O peso corporal de indivíduos obesos está acima do aceitável, entretanto, não é importante apenas a quantidade total de gordura, mas também onde ela se encontra em excesso no corpo (Pi-Sunyer 2000; Haslam and James 2005; Despres and Lemieux 2006). A distribuição de gordura é tão importante que, junto com o cálculo do IMC, normalmente é feita a medida da circunferência abdominal. Valores maiores que 94 cm para homens, ou 80 cm para mulheres, são considerados risco de complicações metabólicas associadas a obesidade (OMS, 1998).

Na obesidade existe uma disfunção do metabolismo do tecido adiposo e de seus componentes, podendo ocasionar um distúrbio metabólico importante, gerando a síndrome metabólica, risco de doenças cardiovasculares e outros distúrbios, tais como hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertensão arterial, aterosclerose, dislipidemia e diabetes tipo II (Haslam and James 2005; Knight 2011; Alosco and Gunstad 2014; Mattes 2014). Além disso, indivíduos obesos apresentam maior risco de desenvolver outros problemas de saúde, como certos tipos de câncer, apneia, problemas respiratórios, osteoartrite (Lyznicki, Young et al. 2001; Castillo-Martinez, Lopez-Alvarenga et al. 2003), aumento do risco cirúrgico e anestésico, diminuição da agilidade física e distúrbios na gestação e na fertilidade, como ausência de ovulação (Tavares 2010). Estudos recentes relacionam a obesidade com efeitos cognitivos adversos (de la Monte, Longato et al. 2009; van den Berg, Kloppenborg et al. 2009; Galioto, Alosco et al. 2013) e o risco de demências, tais como a doença de Alzheimer (Miller and Spencer 2014; Toda, Ayajiki et al. 2014).

Evidências em torno da obesidade apontam esta doença como sendo um estado de estresse oxidativo sistêmico devido a vários possíveis mecanismos, dentre eles, o acúmulo de gordura corporal, a diminuição das defesas antioxidantes, hiperglicemia, inflamação crônica subclínica e hiperleptinemia (Higdon and Frei 2003; Vincent and

Taylor 2006; Vincent, Innes et al. 2007). Estudos verificaram que a obesidade está diretamente relacionada a alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo, sendo que em indivíduos obesos, esse tecido aumenta a capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatórias (Bullo, Casas-Agustench et al. 2007; Cai, Cole et al. 2008).

O tratamento da obesidade é benéfico na medida em que a perda de peso reduz o risco de mortalidade e morbidade. Ainda que a perda de peso moderada seja somente 5 a 10 % do peso inicial, já é possível observar os efeitos benéficos para a saúde (Van Gaal, Wauters et al. 1997).

### **2.2.1. TECIDO ADIPOSO**

O tecido adiposo é constituído por diferentes componentes, incluindo adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, monócitos, macrófagos e tecido conjuntivo fibroblástico (Lee, Wu et al. 2010). Além disso, o tecido adiposo visceral e subcutâneo apresentam diferenças na capacidade metabólica e no padrão de adipocinas secretada (Hajer, van Haeften et al. 2008; Surmi, Atkinson et al. 2008; Maury and Brichard 2010)

O tecido adiposo não é um mero reservatório de energia ou regulador da temperatura corporal, mas um órgão endócrino, metabolicamente ativo, secretor de peptídeos bioativos que apresentam ação local ou sistêmica. O tecido adiposo é um órgão multicelular com inúmeras funções: isolamento térmico, barreira física ao trauma (Godoy 2014; Speretta 2014), desempenha papel ativo na regulação da homeostasia da energia corporal e em outros processos fisiológicos como: metabolismo de lipídeos e glicose, inflamação, coagulação, pressão sanguínea e comportamento alimentar, além de comunicação com o SNC e o trato gastrointestinal, afetando dessa forma o metabolismo e função de alguns órgãos e tecidos como músculos, fígado, vasos sanguíneos e cérebro (Hajer, van Haeften et al. 2008; Heilbronn and Campbell 2008)

O tecido adiposo é geralmente separado em tecido adiposo visceral (TAV) e subcutâneo (TAS). O TAV refere-se ao tecido adiposo no interior da cavidade abdominal, o que representa entre 10 e 20% da gordura corporal total de homens obesos e magros, e entre 5 e 10% de gordura total em mulheres (Kaminski and Randall 2010). O TAS representa aproximadamente 80% da massa de gordura total em indivíduos saudáveis,

porém o TAV é metabolicamente mais ativo, e o acúmulo é mais preditivo de mortalidade associada à obesidade (Girard and Lafontan 2008).

O risco de saúde aumentado decorrente da obesidade é dependente da quantidade e da localização do tecido adiposo (Ohlson, Larsson et al. 1985; Bjorntorp 1997). As mulheres apresentam maior quantidade de tecido adiposo subcutâneo comparado aos homens (Lonnqvist, Thorne et al. 1997; Mujica, Leiva et al. 2008), e apresentam um excesso de adiposidade na região subcutânea glútea ou femoral, que é associado com riscos para desordens metabólicas (Ohlson, Larsson et al. 1985; Bjorntorp 1996). A gordura subcutânea está dispersa dentro de uma grande área sob a pele, é relativamente pouco inervada e vascularizada e tem células com maior diâmetro que dos adipócitos intra-abdominais (Wajchenberg 2000). Este tecido realiza a captação de ácidos graxos e estoca o excesso de calorías (Michailidou, Jensen et al. 2007; Shadid, Kanaley et al. 2007), sendo importante para as mulheres quando necessitam utilizar-se dos estoques de energia para suprir a demanda calórica durante a amamentação.

O tecido adiposo ainda pode ser classificado em dois tipos: tecido branco e tecido marrom, e essa classificação ocorre de acordo com sua estrutura celular, localização, coloração, vascularização e função. O tecido adiposo marrom dissipa seus depósitos de gordura, produzindo calor (termogênese adaptativa) como consequência do desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Lowell and Spiegelman 2000), sendo presente em grandes quantidades durante a infância, mas é escasso nos indivíduos adultos. Por outro lado, o tecido adiposo branco é encontrado em maior quantidade nos adultos e armazena triglicérides e libera ácidos graxos conforme a necessidade do organismo, bem como secreta várias adipocitocinas importantes na regulação da ingesta energética, metabolismo lipídico e homeostase da glicose (Pond and Mattacks 1991). Sabe-se que os adipócitos do tecido adiposo branco produzem uma variedade de citocinas inflamatórias na proporção de seus volumes, e a obesidade está associada com o aumento de vários destes peptídeos pró- inflamatórios (Trayhurn and Wood 2004)

A quantidade de adipócitos, bem como o seu tamanho, depende do balanço entre o acúmulo de gordura (lipogênese) e a sua utilização (lipólise) (Ahima 2006). Estes fenômenos são influenciados por diversos fatores como a quantidade de tecido adiposo, sexo, impulsos neuronais, hormônios (estrogênios, androgênios, insulina, hormônio de crescimento e cortisol) e ainda atividade física (Bohler, Mokshagundam et al. 2010). A hipertrofia dos adipócitos, possui alta correlação com a obesidade, pois ocasiona uma redução no fluxo sanguíneo com consequente hipóxia, infiltração e ativação de

macrófagos no tecido adiposo. Isso, por sua vez, leva a um aumento do processo inflamatório crônico (Skinner, Steiner et al. 2010)

O efeito entre a quantidade de tecido adiposo e a inflamação é sinérgico, ou seja, quanto mais adiposidade, maior os níveis de citocinas inflamatórias e quanto maior a quantidade de tecido adiposo (obesidade central e abdominal) maior associação com a síndrome metabólica (Volp 2008).

As células do tecido adiposo, os adipócitos, produzem a maior parte das citocinas envolvidas no processo inflamatório, como as adipocinas: IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina e adiponectina, resistina e proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) (Halberg, Wernstedt-Asterholm et al. 2008). Essas adipocinas estão envolvidas na regulação da pressão arterial, homeostase vascular e angiogênese e diretamente relacionadas com as doenças cardiovasculares (Prado 2009). Além disso, são importantes reguladores do metabolismo energético e de processos inflamatórios (Scherer 2006) e podem ter impacto sobre vários aspectos biológicos, incluindo homeostasia energética, função imunológica, neurológica e reprodutora (Costa, Cintra Ide et al. 2006; Bruce-Keller, Keller et al. 2009; Ouchi, Parker et al. 2011).

### 2.2.2. LEPTINA

Em 1994, Zhang e colaboradores conseguiram identificar o gene *ob* em humanos e roedores, demonstrando ainda que o produto do gene *ob* era um transcrito de 4,5 kb especificamente expresso no tecido adiposo, e codificava um peptídeo a ser secretado de 167 aminoácidos (Gualillo, Gonzalez-Juanatey et al. 2007). Este hormônio peptídico foi chamado de leptina (do grego *leptos*, que significa magro). A leptina é secretada primariamente pelos adipócitos e transmite um sinal periférico para o SNC sobre a reserva de gordura corporal, tendo sido por este motivo denominado de fator de saciedade.

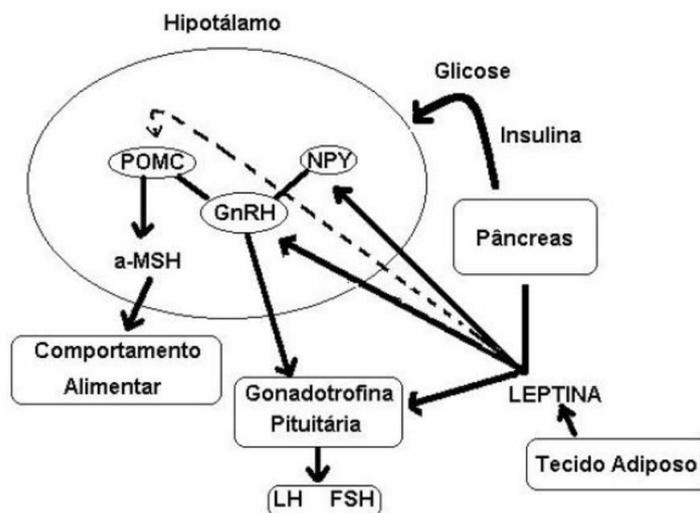
O principal efeito biológico da leptina é o controle da ingestão alimentar e aumento do gasto energético por ativação de receptores altamente expressos no hipotálamo (Jung and Kim 2013). A leptina tem um papel significativo na manutenção do metabolismo corporal (Wasim, Awan et al. 2016), sendo responsável por estimular a captação de glicose pelo músculo esquelético, a lipólise no adipócito, a oxidação de ácidos graxos em diferentes tecidos, a termogênese no tecido adiposo marrom e por inibir

a gliconeogênese e a lipogênese hepática (Vazquez-Vela, Torres et al. 2008). Tem sido sugerido também, que ela possui ação quimiotática e pode iniciar o recrutamento de monócitos e macrófagos no tecido adiposo (Tilg and Moschen 2006; Surmi, Atkinson et al. 2008).

Os níveis de leptina circulante podem ser alterados, principalmente, pela ingestão alimentar, porém, diversos estudos têm demonstrado o papel de outros fatores sobre a concentração desse hormônio no plasma. Dentre os fatores que podem interferir na secreção da leptina, além do ciclo alimentação/jejum, pode-se citar o IMC, o exercício físico, a exposição ao frio e o consumo de álcool (Margetic, Gazzola et al. 2002).

O aumento nos níveis de leptina no sangue faz com que ocorra a liberação de  $\alpha$ -MSH (alfahormônio estimulador de melanócitos) através de POMC (pro-opiomelanocortina) e de CART (transcrito regulado por cocaína e anfetamina), nos neurônios do núcleo arqueado. Tais peptídeos atuam no encéfalo e são designados anorexigênicos, por inibirem o apetite e aumentarem a taxa metabólica (Kristensen, Judge et al. 1998; Cowley, Smart et al. 2001). Em contrapartida, uma redução nos níveis sanguíneos de leptina estimula outro tipo de neurônio do núcleo arqueado, o qual contém sua própria mistura de peptídeos: NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (proteína relacionada a agouti). Os efeitos desses peptídeos no balanço energético são de estimular o apetite e diminuir o metabolismo (Billington, Briggs et al. 1991; Shutter, Graham et al. 1997). Sendo conhecidos como peptídeos orexigênicos (Leininger 2009).

Figura 1 - Representação esquemática do efeito da leptina sobre receptores do hipotálamo



Fonte:(Willians 2002)

Como a leptina é secretada de acordo com a quantidade de gordura corporal, indivíduos obesos secretam grandes quantidades desse hormônio (Zhang and Scarpace 2006). Porém, o que não se observa nesses indivíduos é a ação anorexígena da leptina, já que esses indivíduos fazem grande consumo de alimentos. Alguns estudos mostraram que indivíduos obesos apresentam elevados níveis plasmáticos de leptina, cerca de cinco vezes mais que aqueles encontrados em magros (Considine 1996)

A falta de ação da leptina parece não ser por uma deficiência em sua produção, mas por um quadro de resistência ao hormônio, de forma similar à resistência à insulina que ocorre nos diabéticos do tipo 2. Possíveis explicações para a resistência à leptina em indivíduos obesos incluem problemas na barreira-hemato-encefálica (BHE), que não permitiria a passagem do hormônio ao encéfalo, e/ou problemas na sinalização do receptor da leptina nos neurônios hipotalâmicos (Banks, Farr et al. 2006; Berthoud and Morrison 2008). Além disso, a alta concentração de triglicerídeos circulantes com o consumo de dietas palatáveis parece contribuir para o bloqueio do transportador de leptina da BHE, contribuindo para o quadro de resistência a esse hormônio (Banks, Coon et al. 2004). Dessa forma, a resistência à leptina não impede o aumento da adiposidade ou o consumo excessivo de alimentos que se observa na obesidade (Morrison 2008).

A hiperleptinemia seguida da resistência à leptina pode ser uma importante causa da disfunção do adipócito e suas consequências, e da sobrecarga de lipídeos em tecidos periféricos na obesidade, fator favorável ao desenvolvimento de resistência à insulina (Vazquez-Vela, Torres et al. 2008).

O principal local de produção da leptina é no tecido adiposo, porém diversas evidências demonstraram sua produção em outros tecidos, como na placenta, ovários, células epiteliais mamárias humanas (Smith-Kirwin, O'Connor et al. 1998), medula óssea de humanos e de ratos recém nascidos (Chen, Hausman et al. 1998; Laharrague, Larrouy et al. 1998; Chen, Gu et al. 1999), estômago (Bado, Lévassieur et al. 1998), músculo esquelético (Wang, Liu et al. 1998), glândula pituitária (Morash, Li et al. 1999; Jin, Zhang et al. 2000). Os receptores de leptina também foram identificados em células da teca e granulosa (Agarwal, Vogel et al. 1999), oócitos (Ryan, Woodhouse et al. 2002) e embriões (Kawamura, Sato et al. 2002).

Algumas evidências sugerem que um determinado limiar de concentração plasmática de leptina é indispensável para a instalação da puberdade e a manutenção da

capacidade reprodutiva, principalmente em fêmeas, através da regulação do eixo reprodutivo (Elias and Purohit 2013), embora algumas evidências sugiram que em condições fisiológicas a leptina não é um fator deflagrador da puberdade, mas sim atua como um fator permissivo para o curso normal da maturação sexual e início da puberdade (Cheung, Thornton et al. 1997; Tena-Sempere 2007). Alguns estudos também têm demonstrado um papel potencial direto da leptina na regulação da função ovariana dos mamíferos, bem como no desenvolvimento embrionário de oócitos e pré-implantação, já que foi demonstrado a presença de leptina nos fluidos foliculares e uterinos (Butzow, Moilanen et al. 1999; Kawamura, Sato et al. 2002).

No ovário, os níveis de leptina elevados em mulheres obesas, diminuem a produção de estradiol nas células da granulosa em resposta ao FSH, atuando através dos receptores da teca e granulosa (Polotsky, Allshouse et al. 2015). Níveis elevados de leptina suprimem diretamente as gônadas e têm o potencial de comprometer a esteroidogênese ovariana normal, mesmo em ciclos ovulatórios (Smith, Jackson et al. 2002). Foi demonstrado anteriormente que a leptina inibe significativamente o crescimento folicular precoce em camundongos imaturos e adultos e que essa inibição é dependente de FSH (Kikuchi, Andoh et al. 2001).

### **2.2.3. SISTEMA REPRODUTOR**

#### **2.2.3.1. CICLO ESTRAL**

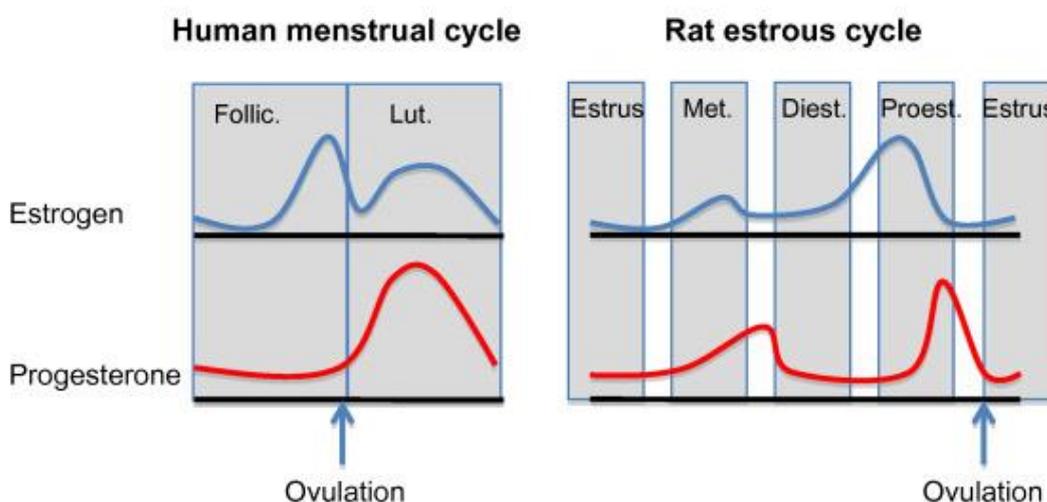
O conhecimento atual sobre o ciclo ovariano de mamíferos baseia-se, sobretudo, em estudos realizados em ratas, visto que muitas similaridades são encontradas entre o ciclo da mulher e o da rata: ovulam cíclica e espontaneamente, independente de alterações sazonais ou de atividade sexual, e apresentam um perfil de variações de gonadotrofinas e esteroides gonadais semelhante (Matthews and Kenyon 1984; Freeman 1994). Entretanto, existem algumas diferenças: na mulher o marco do ciclo menstrual é a menstruação e na rata é a ovulação, caracterizado pela receptividade sexual (Martinelli 2005). Outra diferença é em relação à formação dos folículos primordiais, já que nas mulheres estes folículos estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal, e nas fêmeas de roedores formam-se nos primeiros três dias de vida após o nascimento. E em relação ao

recrutamento e seleção do folículo antral, os mecanismos são semelhantes, entretanto, em roedores, múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo estral, portanto, o processo de ovulação é de vários oócitos por ciclo enquanto na mulher, normalmente, somente um torna-se dominante para ovular. (Hirshfield 1991)

O ciclo reprodutivo das ratas é chamado de ciclo estral e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (Freeman 1994; Westwood 2008). A ovulação ocorre do início do proestro até o fim do estro. A duração do ciclo é em média de quatro dias e isso faz com que sejam animais ideais para investigação das mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (Marcondes, Bianchi et al. 2002). A fase proestro tem duração de 12 a 14 horas e antecede o estro, o qual tem duração de 25 a 27 horas, e é a fase em que ocorre a ovulação. O metaestro ou diestro I dura em torno de 6 a 8 horas e o diestro II, 55 a 57 horas (Smith, Freeman et al. 1975).

A caracterização de cada fase se faz de maneira rápida e fácil através da citologia vaginal, coletada através de lavados vaginais diariamente pela manhã, as quais podem ser determinadas através das mudanças que ocorrem na mucosa vaginal, caracterizadas por um padrão distinto de células epiteliais, leucócitos e células queratinizadas em cada período (Matthews and Kenyon 1984; Marcondes, Bianchi et al. 2002). Em cada fase do ciclo estral verifica-se variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas, que estão relacionadas com alterações comportamentais (Smith, Freeman et al. 1975; Freeman 1994).

Figura 2 – Diferença entre ciclos reprodutivos em humanos e em ratas.



Fonte: (Lebron-Milad and Milad 2012)

### 2.2.3.2. OBESIDADE E REPRODUÇÃO

Estudos já demonstravam que uma quantidade mínima de gordura corporal é necessária para o início e manutenção dos ciclos ovulatórios (Kennedy and Mitra 1963; Frisch and McArthur 1974). O tecido adiposo é um sítio de ativa produção de andrógenos (Pasquali and Gambineri 2006) e é um local de ativa conversão de andrógenos a estrógenos, que é um processo intensamente dependente e diretamente proporcional à quantidade de gordura corporal (Longcope, Kato et al. 1969). De fato, meninas excessivamente magras comumente apresentam atrasos na menarca e amenorreia (Golden and Shenker 1994). Entretanto, o excesso de gordura corporal também parece interferir negativamente na função reprodutiva, pois observações clínicas têm sugerido que existe uma forte relação entre a adiposidade e a infertilidade feminina (Bolumar, Olsen et al. 2000; Pasquali, Pelusi et al. 2003).

A obesidade pode interferir na reprodução de homens e mulheres. Nos homens a obesidade pode aumentar a quantidade de testosterona circulante para ser transformada em estradiol, assim diminuindo a produção de testosterona e espermatozoides. Em mulheres, a obesidade pode levar a alteração do ciclo menstrual, já que há aumento de estrogênio, interfere na fertilidade, no desenvolvimento dos óvulos e das características femininas.

O desenvolvimento dos folículos nos ovários depende da integridade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, sendo que o FSH produzido pela hipófise vai atuar nas células da granulosa dos folículos promovendo seu crescimento. O estrogênio aumentado induz a liberação pela hipófise do pico pré-ovulatório de LH que promove a maturação do oócito e a, conseqüente, ovulação (Broekmans, de Ziegler et al. 2010). Esse crescimento, basicamente, inicia-se quando as concentrações de estrogênio estão baixas e sinalizam para o hipotálamo liberar o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), que age na hipófise liberando o FSH, que estimula o crescimento dos folículos nos ovários (Silva, van den Hurk et al. 2004; Speroff, Kenemans et al. 2005).

Um fino balanço hormonal regula o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, e tem sido observado que a obesidade pode alterar o ambiente hormonal, levando a anovulação associada à Síndrome do Ovário Policístico (SOP) (Brewer and Balen 2010). Além disso, já foi demonstrado que fêmeas de roedores com obesidade

induzida por dieta de cafeteria apresentam ausência dos picos pré-ovulatórios de LH e progesterona, com conseqüente redução na ovulação (Pasquali and Gambineri 2006).

Estudos em animais sugerem que níveis elevados de leptina exercem um efeito inibitório direto sobre a função ovariana por perturbação da esteroidogênese e comprometimento da foliculogênese e da maturação oocitária (Butzow, Moilanen et al. 1999; Duggal, Van Der Hoek et al. 2000). A leptina mostrou-se elevada no líquido folicular de mulheres obesas (Michalakis, Mintziori et al. 2013) indicando que alterações sistêmicas associadas à obesidade também podem afetar o tecido ovariano.

O surgimento precoce da obesidade, principalmente na adolescência, favorece o desenvolvimento de ciclos irregulares, oligo/anovulação crônica e infertilidade nos adultos (Pasquali and Gambineri 2006). Tem sido observado tanto em mulheres com IMC mais elevado, quanto em roedores fêmeas obesas uma redução na maturação da idade sexual, início mais precoce da puberdade, com antecipação da menarca (Sagae, Menezes et al. 2012).

Mulheres obesas têm três vezes mais probabilidade de sofrer de infertilidade do que as mulheres com IMC normal (Brewer and Balen 2010). O excesso de gordura corporal aumenta a disfunção ovulatória, apresenta maior prevalência e a SOP, caracterizada por sintomas ginecológicos e endócrinos, apresenta maior prevalência em mulheres obesas (Pasquali, Pelusi et al. 2003). Também ocorre piora da resposta aos tratamentos de reprodução assistida, bem como nas taxas de fertilização, implantação e concepção, devido à piora na qualidade oocitária e/ou defeitos na receptividade endometrial (Penzias 2012; Bellver, Mifsud et al. 2013) e também menor número de oócitos maduros (Wittemer, Ohl et al. 2000; Dokras, Baredziak et al. 2006) podendo apresentar maiores taxas de abortos e perdas gestacionais precoces (Robker 2008).

Com a obesidade gestacional surgem maiores riscos de alterações metabólicas adversas, desordens hipertensivas, diabetes gestacional, infecções, tromboembolismo, alterações de humor, complicações durante o trabalho de parto, e também aumenta o risco de problemas nos filhos ((Ramsay, Greer et al. 2006; Yu, Teoh et al. 2006; Huda, Brodie et al. 2010; Seabra, Padilha Pde et al. 2011; Vernini, Moreli et al. 2016). As taxas de gravidez também seriam diminuídas nas pacientes com sobrepeso por alterações no meio ambiente folicular, como níveis de insulina, lactato, triglicerídeos e proteína C reativa (Sharma, Biedenharn et al. 2013).

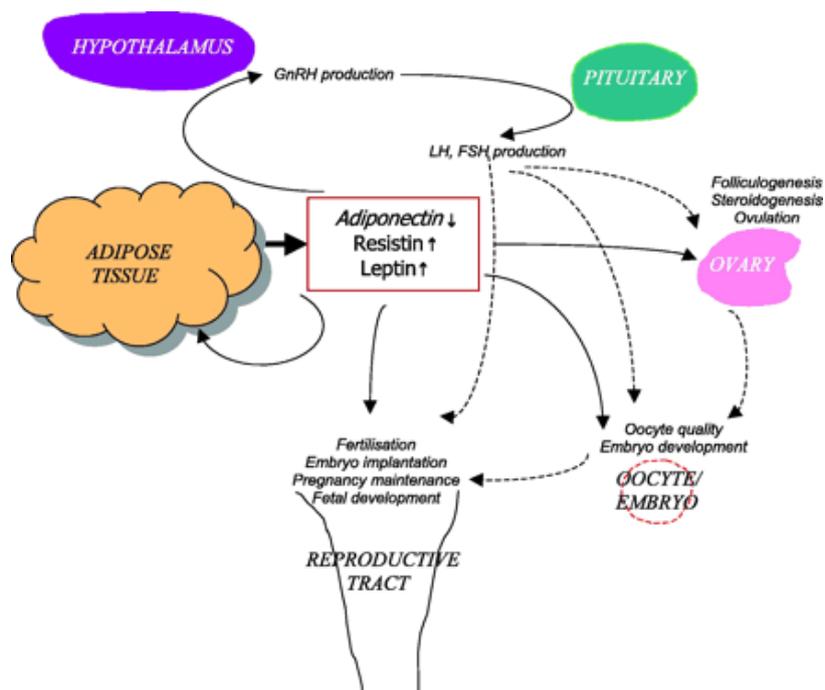
A obesidade da prole também pode ser influenciada pelo IMC tanto materno como paterno, sendo assim, um fator de risco para desenvolvimento da síndrome metabólica e

obesidade na infância ou na fase adulta. A genética predispõe os indivíduos à obesidade, no entanto para que ela se manifeste há a necessidade de um meio ambiente adequado e de hábitos alimentares alterados (Pereira 2003)

Sagae et al estudaram o impacto de uma dieta altamente calórica em ratas iniciada logo após o período de amamentação, tendo concluído que esta levou a obesidade na idade adulta bem como a alterações morfológicas e estruturais dos ovários e a alterações significativas nos níveis séricos dos hormônios reprodutivos (Sagae, Menezes et al. 2012). Em relação a questões reprodutivas, ratas tratadas com a dieta de cafeteria apresentam uma redução no número de concepções e de nascimentos (Wehmer, Bertino et al. 1979; Rolls, Rowe et al. 1980) e irregularidades no ciclo estral (Glick, Yamini et al. 1990).

Os efeitos negativos da obesidade em mulheres inférteis podem ser reversíveis. Clark et al. (1998) encontraram retorno da ovulação em 90% das mulheres obesas anovulatórias após perda de peso (Clark, Thornley et al. 1998). Nas mulheres subférteis, intervenções no estilo de vida podem aumentar as chances de concepção espontânea e evitar o tratamento desnecessário de fertilidade, bem como complicações obstétricas. Estudos de intervenção e de observação mostram que a modesta perda de peso está relacionada com a restauração da ovulação em mulheres anovulatórias e melhoraria a probabilidade de gravidez. A perda de peso pode ser conseguida por programas de intervenção de estilo de vida que incluem a combinação de uma dieta saudável, e o aumento da atividade e a modificação comportamental (Mutsaerts, Groen et al. 2010).

Figura 3 - A potencial interação entre adipocinas e a reprodução feminina



Fonte: (Mitchell, Armstrong et al. 2005)

#### 2.2.4. OBESIDADE E DÉFICIT COGNITIVO

A memória está envolvida no processo de codificação e armazenamento de informações, persistência e evocação das informações adquiridas. Cada etapa pode ser caracterizada por alterações nos níveis celulares, moleculares e comportamentais (Bonini, Bevilaqua et al. 2006; Bonini, Da Silva et al. 2007; Cammarota, Bevilaqua et al. 2007). Diferentes classificações vêm sendo propostas para as memórias, considerando sua função, conteúdo e tempo de duração (Helene and Xavier 2006).

As lembranças ou informações que serão armazenadas, temporariamente ou permanentemente, dependem do bom funcionamento do SNC bem como de comunicações efetivas entre os neurônios, que através de impulsos levam as informações de um neurônio a outro, através de sinapses (Sherwood 2011). Ainda, os sistemas envolvidos no processo de memória, dependem do bom funcionamento do SNC que, transmitem informações aos neurônios através de neurotransmissores específicos, como acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina e glutamato (Zimmerman and Soreq 2006). As estruturas cerebrais envolvidas na memória e as transmissões que acontecem para formação, armazenamento e evocação da memória são prejudicadas na obesidade.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma serina hidrolase que desempenha papel essencial no mecanismo colinérgico. É uma enzima que catalisa a hidrólise da ACh na transmissão do impulso nervoso na sinapse colinérgica entre neurônios (Andres, Ducray et al. 2008). A atividade da AChE tem sido alvo de estratégias terapêuticas emergentes para o tratamento de distúrbios cognitivos como a DA. Além disso, vem sendo associada ao desenvolvimento cerebral, aprendizagem, formação de memória e dano neural (Davidson, Hargrave et al. 2013) sendo que atividade da AChE também é sensível a fatores exógenos, como dietas (Kaizer, da Silva et al. 2004). Tem sido demonstrado na literatura que dietas ricas em gordura induzem alterações na atividade de enzimas-chave do SNC e, conseqüentemente, induzem modificação na composição e função das membranas biológicas pela peroxidação lipídica (Winocur 1999).

Uma dieta rica em gordura pode levar à obesidade e conseqüente inflamação crônica periférica, ocorrendo a liberação de citocinas, que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e chegar até estruturas neurais. Estas citocinas influenciam as vias envolvidas na cognição, incluindo o metabolismo de neurotransmissores, funções neuroendócrinas e a plasticidade neural (Stranahan, Norman et al. 2008), indicando que a obesidade está fortemente relacionada à vulnerabilidade cerebral e aos distúrbios cognitivos (Whitmer, Sidney et al. 2005; Bruce-Keller, Keller et al. 2009; Galioto, Alosco et al. 2013).

Estudos mostram que homens e animais obesos e que consomem dietas hiperlipídicas ou hipercalóricas apresentam pior desempenho em testes de aprendizagem e memória (Goldbart, Row et al. 2006; Halyburton, Brinkworth et al. 2007; Abildgaard, Solskov et al. 2011; Benito-Leon, Mitchell et al. 2013). Além disso, Thaler e colaboradores afirmam que o consumo de dieta rica em gordura é caracterizado por inflamação, tanto em tecidos periféricos como em certas áreas do hipotálamo, fundamentais na homeostase energética (Thaler, Yi et al. 2012).

Diversos mecanismos são susceptíveis de associar a obesidade e o déficit cognitivo, supondo que a inflamação sistêmica e central, presentes na obesidade podem levar a morte neuronal e ao comprometimento de estruturas responsáveis pela memória (Nummenmaa, Hirvonen et al. 2012; Miller and Spencer 2014). Isso ocorre devido as alterações envolvidas na fisiopatologia da obesidade, presença de estresse oxidativo (de Farias, Bom et al. 2013), bem como com o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Galic, Oakhill et al. 2010; Thaler, Yi et al. 2012), diminuição na expressão de genes

mitocondriais (Crowe, Turpin et al. 2008), fornecendo menos energia para as células neurais realizarem suas funções (Ritov, Menshikova et al. 2005).

Além dos prejuízos induzidos por alterações hormonais, dietas hiperlipídicas e hipercalóricas que induzem à obesidade podem alterar o comportamento cognitivo através da diminuição direta da plasticidade neuronal. Em suporte a essa possibilidade, foi encontrado em vários estudos que o consumo prolongado dessas dietas resulta em declínio no aprendizado e na memória espacial e em redução da expressão e sinalização do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) hipocampal (Stranahan, Norman et al. 2008; Dinel, Andre et al. 2011; Kanoski and Davidson 2011; Davidson, Monnot et al. 2012).

Embora a relação entre inflamação induzida pela obesidade e função sináptica esteja rapidamente ganhando atenção no hipotálamo (Wisse and Schwartz 2009), as consequências da inflamação se estende para outras regiões do cérebro. Além do hipotálamo, acredita-se que exista uma associação da obesidade com outras estruturas cerebrais, dentre elas o hipocampo, considerado vulnerável a esses processos inflamatórios, pela migração de citocinas (Miller and Spencer 2014), sendo que foi constatado prejuízo nos processos de aprendizagem relacionados ao hipocampo em roedores com obesidade induzida pela dieta rica em gordura (Kanoski and Davidson 2011).

O dano oxidativo pode ocorrer em todos os tecidos humanos, entretanto, o cérebro parece ser o mais suscetível a este tipo de lesão, provavelmente por ser um tecido com elevado consumo de oxigênio (Halliwell 2007), metabolismo oxidativo, ao elevado conteúdo de ácidos graxos facilmente oxidáveis e aos baixos níveis de enzimas detoxificadoras de radicais livres e moléculas antioxidantes (Cardenas-Rodriguez, Coballase-Urrutia et al. 2013).

### **2.3. ESTRESSE OXIDATIVO**

As células são formadas por diferentes moléculas que consistem em um ou mais átomos ligados quimicamente uns aos outros. Moléculas ou átomos que possuem elétrons não pareados no seu orbital mais externo são chamados de radicais livres (RL), desemparelhamento dos elétrons gera uma espécie com alta reatividade e energeticamente

instável, tendendo, assim, a iniciar reações a fim de retirar elétrons de moléculas vizinhas para preencher seu próprio orbital (Halliwell 2007).

A presença de radicais livres pode ser benéfica para as células, já que são constantemente produzidos no organismo e que vários deles são fundamentais para realização de determinadas reações biológicas, como sinalização e diferenciação celulares, fagocitose, reações do sistema imune, entre outros. Além disso, o organismo utiliza esse processo para transformar energia na forma de ATP e para combater invasores virais, bacterianos ou fúngicos (Halliwell 2007). Porém, quando ocorre produção exacerbada destas substâncias, certos efeitos maléficos podem ocorrer, ocasionando danos em moléculas, membranas e conteúdos celulares. Os componentes celulares, como por exemplo, os lipídios, proteínas e DNA podem ser danificados, desencadeando o aparecimento de distúrbios metabólicos e celulares (Halliwell and Whiteman 2004; Halliwell 2006; Sies 2007; Steinbrenner and Sies 2009).

Diversas são as fontes geradoras de RL nos sistemas biológicos, tanto endógenas quanto exógenas. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas durante o metabolismo celular normal, e são produzidas principalmente pela mitocôndria, pelo sistema de citocromos P450, pelos peroxissomos e através da ativação de processos inflamatórios (Cardenas-Rodriguez, Coballase-Urrutia et al. 2013). Além disso, podem ser produzidas por fontes exógenas, tais como: consumo de álcool, tabaco e outras drogas, exposição à radiação ionizante e eletromagnética e poluição atmosférica (Droge 2002; Halliwell 2007).

Os RL possuem meia vida extremamente curta, são altamente reativas, produzidas em todos os sistemas biológicos e reagem facilmente com moléculas que se localizam em torno do seu sítio de formação (Roberts and Sindhu 2009). As principais EROs são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), e os não radicais peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Halliwell 2012; Halliwell 2014). Apesar de não ser considerado um RL verdadeiro, o  $H_2O_2$  é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de reações enzimáticas (Anderson 1996).

A geração de EROs no organismo pode ser inativada ou eliminada por antioxidantes. Por definição, antioxidante é qualquer substância que, mesmo quando presente em baixa concentração comparada à de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (Halliwell 2007). Estes antioxidantes podem ser produzidos pelo corpo (endógenos) ou absorvidos da dieta (exógenos), sendo que incluem basicamente dois grupos de natureza enzimáticos e não-enzimáticos (Sies

1993; Sies and Stahl 1995; Halliwell 2007). Exemplo destas defesas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR), entre outras. Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutatona (GSH) o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipoico, os carotenoides, os flavonoides, entre outros (Valko, Leibfritz et al. 2007).

O desequilíbrio entre o sistema de defesas antioxidantes e a produção de RL é denominado de estresse oxidativo e apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Bonnes 1992).

O estresse oxidativo contribui para o declínio das funções celulares, o envelhecimento, doenças neurodegenerativas, doença renal crônica (Pennathur and Heinecke 2007), aterosclerose, câncer, diabetes e obesidade (Vincent and Taylor 2006; Valko, Leibfritz et al. 2007). Além disso, o estresse oxidativo está implicado também em manifestações relacionadas à síndrome metabólica, como adiposidade e resistência à insulina, e na fisiologia da hipertensão e da aterosclerose por afetar diretamente as células da parede vascular (Furukawa, Fujita et al. 2004; Roberts and Sindhu 2009).

O excesso de gordura corporal, o sedentarismo, o consumo alimentar excedente e a baixa ingestão de alimentos contendo nutrientes com função antioxidante contribuem para o estresse oxidativo na obesidade (Vincent and Taylor 2006; Sledzinski, Goyke et al. 2009). Os possíveis mecanismos associados ao estresse oxidativo em obesos são decorrentes do acúmulo excessivo de gordura corporal (Gletsu-Miller, Hansen et al. 2009), estado crônico de inflamação subclínica devido à liberação aumentada de adipocinas pró-inflamatórias (Skalicky, Muzakova et al. 2008; Iyer, Fairlie et al. 2010), hiperleptinemia (Uzun, Zengin et al. 2004; Sledzinski, Goyke et al. 2009), hiperglicemia (Choi, Benzie et al. 2008), a diminuição das defesas antioxidantes (Kisakol, Guney et al. 2002), entre outros.

A ingestão de uma dieta altamente calórica resulta num estado pós-prandial de hipertrigliceridemia, hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, gerando um estado de estresse oxidativo (Esposito and Giugliano 2005). A hiperglicemia leva ao aumento na produção de EROs na mitocôndria, por aumentar o gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial.

Furukama et al. (2004) demonstraram que o aumento de EROs no tecido adiposo de camundongos KK (modelo de obesidade) está associado ao aumento na expressão de

NADPH oxidase, e expressão reduzida de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT; e que o estresse oxidativo aumentado no tecido adiposo está fortemente correlacionado com aumento de marcadores inflamatórios, desregulação de adipocinas e resistência à insulina (Furukawa, Fujita et al. 2004; Rudich, Kanety et al. 2007).

Estudos demonstraram que o estresse oxidativo representa um papel causal na resistência à insulina e está ligado à adiposidade visceral (Pennathur and Heinecke 2007). O estresse oxidativo no tecido adiposo visceral é considerado atualmente um marcador precoce da síndrome metabólica em animais e humanos e pode ser considerado, portanto, um novo alvo terapêutico para essa desordem (Hoops, Roberts et al. 2010).

#### **2.4.CAMELIA SINENSIS**

A sociedade atual tem buscado na natureza hábitos mais saudáveis de vida. Essa tendência tem levado ao aumento progressivo da produção e utilização de produtos naturais e conseqüentemente, maiores preocupações em relação à qualidade destes produtos (Rocha 2004; Lima 2009; Vuong 2011).

Além do seu potencial terapêutico amplamente considerado na medicina popular, as plantas constituem a maior fonte de matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, sendo que muitas são utilizadas na clínica até os tempos atuais, como a morfina (*Papaver somniferum*), digoxina (*Digilanata Talis*), teobromina (*Theobroma cacao*), vimblastina (*Catharanthus roseus*), entre outras (Calixto, Scheidt et al. 2001). Segundo Lahlou (2013), 45% dos medicamentos mais vendidos da atualidade são provenientes de produtos naturais ou de seus derivados (Lahlou 2013).

As plantas medicinais são fontes de moléculas bioativas que apresentam uma estrutura química diferenciada e um mecanismo de ação particular e inovador (Simões 2003). Muitos destes compostos exibem significativas propriedades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-tumoral, com grande potencial de exploração nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, químicas e cosmeceúticas (Faller 2009; Fang 2010).

Para que uma substância possa ser um antioxidante, ela precisa possuir uma estrutura química que lhe permita não apenas ligar RL, mas também estabilizá-los para que os mesmos não possam propagar o processo oxidativo (Mates and Sanchez-Jimenez

2000). As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenóis e flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzoico e cinâmico), derivados de polimerização (taninos e ligninas) e outras substâncias encontradas nos vegetais (Rice-Evans, Miller et al. 1996). Os flavonoides presentes nos chás obtidos da *C. sinensis* exercem a ação de proteger as células contra vários efeitos dessas espécies reativas de oxigênio.

#### **2.4.1. HISTÓRICO E ORIGEM DO CHÁ**

O conhecimento empírico dos benefícios trazidos pelas plantas medicinais é milenar, despertando o interesse de muitos pesquisadores com o objetivo de adquirir maior e melhor ciência sobre novas moléculas que possam ser usadas na terapêutica (Gomes 2010).

Em relação à origem exata da planta do chá, alguns autores sugerem as cordilheiras de montanhas entre Yunnan (Sudeste da China) e Assam (Nordeste da Índia), mas estudos indicam uma área mais extensa compreendendo a China, o Japão, Burma, Índia, Sri Lanka e outras regiões da Ásia Oriental (Engelhardt 2010).

Historicamente, o cultivo da planta *Camellia sinensis* iniciou-se no Himalaia, por monges budistas, que utilizavam as folhas para o preparo de uma tradicional bebida. Uma lenda chinesa descreve que o chá foi descoberto pelo imperador Shen Nung no ano 2737 a. C. Na China antiga, o chá era considerado milagroso por trazer vários benefícios à saúde, sendo utilizado como medicamento para dores de cabeça, dores no corpo, depressão, melhora da ação do sistema imune, para detoxificação, como energizante, antioxidante e como forma de prolongar a vida (Basu and Lucas 2007).

A China atuou ativamente na disseminação da bebida no mundo, já que os produtos orientais exerciam grande fascínio sobre os europeus. Os portugueses quando contataram com esses povos do Oriente conheceram a bebida do chá, já usual nesses territórios há mais de 2 mil anos. Adotaram a designação de Cantão-tcha que deu origem à palavra chá. Outros povos europeus adotaram a designação de Tonquim-té, que, por exemplo, em espanhol deu origem à palavra “te” e em inglês “tea”. Os portugueses e os holandeses foram os primeiros a terem contato com o chá, que era adquirido em Macau, colônia portuguesa na China (Pettigrew 1999).

O consumo de chá foi introduzido na corte real inglesa por Catarina de Bragança, princesa portuguesa que se casou com o inglês Carlos II em 1660, entretanto o famoso "chá das cinco" se iniciou por volta de 1800 com a duquesa de Bedford. O chá chegou ao Brasil juntamente com a família Real Portuguesa, no início do século XIX, sendo o plantio da *C. sinensis* estimulado por D. João VI para o abastecimento da corte. Entretanto, o plantio foi gradativamente substituído pela cultura do café (Lima 1997).

No Brasil, acredita-se que o chá tenha chegado por intermédio de Luiz de Abreu, um pequeno comerciante e agricultor de Portugal, que obteve as sementes de *C. sinensis* e as ofereceu a D. João VI, quando esse chegou ao Brasil. Logo depois houve uma grande difusão do cultivo da planta, pela criação do Jardim Botânico no Rio de Janeiro em 1808, onde foram feitas as primeiras plantações. Em 1814, após a chegada de alguns chineses, houve um aumento na produção e também um aprimoramento no consumo dos chás (Basu and Lucas 2007).

#### **2.4.2. CARACTERÍSTICAS DA PLANTA *CAMELLIA SINENSIS***

A *Camellia sinensis* pertence à família *Theaceae* originária do sudoeste da China que foi gradualmente sendo introduzida na Índia, Sri Lanka e em muitos países tropicais e subtropicais (Simões 2010). Na forma selvagem, pode atingir de 10 a 15 metros de altura e em cultivo no máximo 1,5 metros. As flores são brancas de 2,5 a 4 cm de diâmetro, podendo aparecer solitária ou em grupos (Saito, Gosmann et al. 2007; Mahmood 2010). O gênero *Camellia* caracteriza-se por agrupar espécies arbustivas, de folhas longas, escuras, lustrosas, com nervuras bem marcadas nas superfícies as quais são curtamente pecioladas e serrilhadas, sendo que as folhas mais novas são cobertas de pequenos tricomas brancos. Já os frutos são cápsulas pequenas e globosas, com 1 a 3 sementes também globosas, que possuem um óleo que pode ser utilizado para o consumo humano (Saito, Gosmann et al. 2007; Lima 2009).

A planta do chá (*C. sinensis*) foi descrita taxonomicamente pela primeira vez em 1753 por Carl Linnaeus em *Species plantarum*. Ele referiu-se a planta do chá como *Thea* e posteriormente refinado a espécie em chá preto (*Thea bohea*) e chá verde (*Thea viridis*) (Lorenzi 2002).

O cultivo da *C. sinensis* se dá preferencialmente por meio de estacas e depende de solo fértil, ácido e bem irrigado, sob sol pleno ou até mesmo ao abrigo deste. Necessita de temperatura moderada (aproximadamente 20 °C), por isso tem sido plantada em altitudes consideráveis, junto a montanhas e planaltos com até 1600 metros de altitude (Lorenzi 2002).

Devido ao seu aroma, sabor e efeitos sobre a saúde o chá de *Camellia sinensis* se tornou a bebida mais consumida depois da água. Estima-se que são consumidos em torno de 18 a 20 bilhões de xícaras por dia no mundo (Hilal 2007; Karak 2010). Atualmente, o chá é considerado um alimento funcional, conferindo inúmeros benefícios à saúde humana quando consumido diariamente devido aos seus componentes bioativos (Khan and Mukhtar 2007).

Figura 4 – Imagem da planta *Camellia sinensis*



Fonte: (Paganini-Costa 2011)

### 2.4.3. COMPOSIÇÃO

A qualidade do chá é influenciada pelos componentes orgânicos e inorgânicos das folhas jovens e dos brotos, que funcionam como precursores e são alterados durante a sua

transformação (aquecimento e oxidação) em substâncias que determinam o sabor (Lima 2009). Apesar de ser de extrema importância a manutenção das características dos chás após a colheita e processamento, outros fatores que afetam as características da bebida estão relacionados ao local de crescimento da planta, como a altitude, temperatura, umidade e características geoquímicas do solo. A composição química dos chás pode variar quanto à espécie, idade das folhas, estação, clima (umidade, temperatura, latitude) e condições de cultivo (solo, água, minerais, fertilizantes, entre outros) (Jayasekera 2011).

Quando cultivados em regiões de altitudes mais altas, temperaturas amenas e baixa umidade, a planta tem crescimento mais lento, com o acúmulo de nutrientes e compostos bioativos, resultando em um chá com qualidade superior das propriedades sensoriais quando comparado com o chá cultivado em regiões de baixa altitude, com temperatura e umidades mais altas. Outros importantes fatores que afetam o crescimento da planta de *C. sinensis* e a qualidade do chá é a composição geoquímica de rochas e solos (Lima 2009), em parte pelo fato dessa espécie acumular metais essenciais ou tóxicos para maioria das plantas. Como consequência, pode haver acúmulo de metais benéficos ou prejudiciais à saúde humana. Desse modo, o teor de metais tem sido considerado atributo de qualidade, sendo utilizado inclusive para inferir sobre o país de origem do chá (Fernández-Cáceres 2001).

As partes da planta utilizadas na produção dos chás são as folhas e brotos, que concentram em média 30% de compostos fenólicos, dependendo das condições de cultivo (Simões 2010). Sabe-se que o conteúdo de polifenóis nos chás de *C. sinensis* pode variar, e que, no chá verde é de 30 a 40%, enquanto que no preto apenas de 3 a 10% (Sharangi 2009). Além disso, dentre os compostos fenólicos, no chá verde os que se destacam são os flavanois ou catequinas e no chá preto as teaflavinas, formadas pela condensação de catequinas. No chá verde, as catequinas podem chegar a 75% do conteúdo de flavonoides, enquanto no chá preto elas representam somente 20 a 30%. Estas diferenças podem influenciar o sabor da bebida, e servir também como um indicativo da qualidade do produto (Scoparo 2013).

Os principais constituintes incluem proteínas, carboidratos, lipídeos, ácido ascórbico, terpenos (óleos essenciais, saponinas,  $\beta$ -caroteno), alcaloides (cafeína, teobromina, teofilina), compostos fenólicos (catequinas, ácido cafeico), além de frações voláteis, carotenoides, tocoferóis, vitaminas (A, K, B, C), aminoácidos (ácido gama-etilamina-L-glutâmico) e minerais, como, flúor, potássio, magnésio, ferro, manganês, fósforo, entre outros (Chen 2004; Engelhardt 2010; Nie 2011).

Os fenólicos são os responsáveis por proporcionar o efeito antioxidante do chá verde, mas além delas existem muitos tipos de compostos solúveis indispensáveis para o aroma e sabor do chá, incluindo flavonóis, proteínas aminoácidos, açúcares, polissacáridos, lipídios, cafeína, minerais, dentre outros (Jiang 2015). Além disso, a cor, o sabor e o aroma dos chás estão diretamente associados à quantidade de polifenóis presentes que são os principais compostos que definem sua qualidade

#### **2.4.4. COMPOSTOS FENÓLICOS**

Dentre os compostos bioativos mais estudados com atividade antioxidante estão os compostos fenólicos. O consumo destas substâncias, presentes na maioria das frutas e vegetais, tem sido associado à potencialização de efeitos promotores da saúde humana através da prevenção e tratamento de várias doenças. Além disso, apresentam ação anti-inflamatória, antiplaquetária, efeitos anti-alérgico (Miean and Mohamed 2001; Villarreal-Lozoya, Lombardini et al. 2009), bem como ações fisiológicas relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante (Hilal 2007; Faller 2009).

Os chamados compostos fenólicos são substâncias que apresentam pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. São amplamente distribuídos em plantas como produtos do metabolismo secundário, especializados em exercer funções fisiológicas (Rusak, Krajacic et al. 1997). As plantas os sintetizam para proteger-se contra o estresse oxidativo, contra espécies reativas de oxigênio e contra os herbívoros (Imtiaz A.; Siddiqui F.A.; Vaqar M.; Adhami 2004; Souza 2008).

Existem cerca de 5000 polifenóis conhecidos (Lima 2009), dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, lignina e tocoferóis (King and Young 1999; Robards 1999; Lee, Lee et al. 2005). Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Bravo 1998).

#### 2.4.4.1.FLAVONOIDES

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendo amplamente distribuídos em frutas, vegetais, sementes, flores e cascas de árvores, portanto parte integrante da dieta humana (Cook 1996). Estes compostos apresentam uma forma estrutural característica, o núcleo tricíclico. São conhecidos mais de 4.200 tipos de flavonoides, apresentando propriedades medicinais importantes como: ação antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, anticarcinogênica e capacidade de se complexar com macromoléculas (proteínas e polissacarídeos) (Zuanazzi 2002).

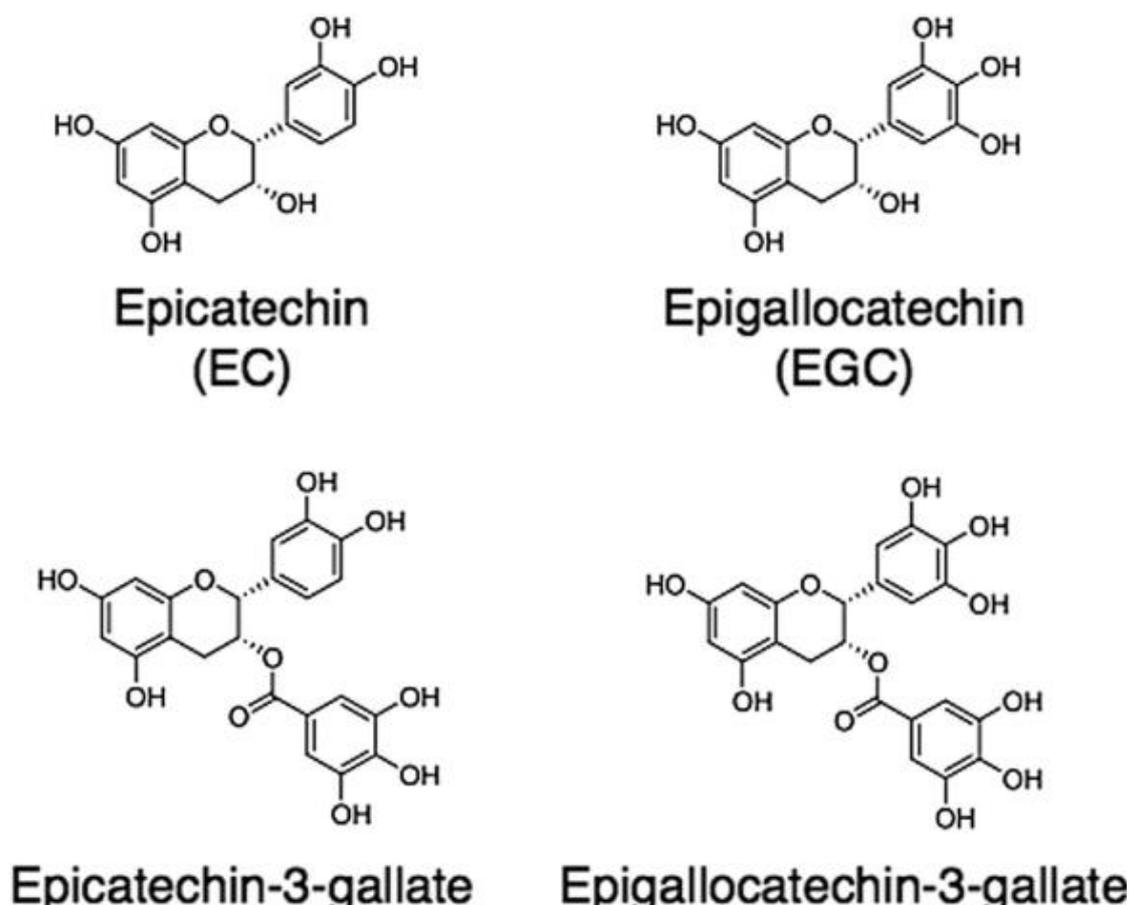
Os flavonóides são os principais componentes químicos terapêuticos da planta *C. sinensis*, sendo potentes antioxidantes, *scavengers* de RL, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação (Peron 2008). Suas propriedades estão relacionadas com a presença, em sua estrutura, de radicais ligados aos seus anéis (Anghileri 2000)

A estrutura química dos flavonoides consiste em 2 anéis aromáticos denominados anel A e B, unidos por 3 carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição do anel C padrão, resultam em importantes classes de flavonoide, como: flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianidinas e flavanois (ou catequinas) (Bravo 1998).

#### 2.4.4.2.CATEQUINAS

As catequinas pertencem a um grupo de polifenóis encontrados nas folhas de *Camellia sinensis* (Matsubara 2006). As principais catequinas encontradas na planta são epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epigalocatequina galato (ECGC) e epicatequina galato (EG) (Sharma 2008).

Figura 5 - Estrutura das principais catequinas.



Fonte: (Sonoda, Ikeda et al. 2014)

Entre as catequinas, a epigalocatequina galato representa de 50 a 80% do total de catequinas e acredita-se ser a responsável pela maior parte dos efeitos benéficos atribuídos ao chá (Liao 2001). A ECGC apresenta maior atividade antioxidante que as vitaminas C e E, que são antioxidantes conhecidas (Saito, Gosmann et al. 2007). O teor de catequinas no chá verde representa pouco mais de 90% do teor total de flavonoides, sendo que de 20 a 30% podem estar na forma oxidada. Entretanto, durante a revisão foram encontradas diferentes faixas teores de compostos ativos do chá verde. Isto se deve tanto à qualidade do material vegetal, quanto ao processo utilizado na extração dos compostos bioativos (Hara 2001; Matsubara 2006; Zaveri 2006).

Com relação à composição de fenólicos nos chás de *C. sinensis*, o destaque no chá verde são os flavanois ou catequinas e no chá preto as teaflavinas. Embora o conteúdo total de polifenóis dos chás verde e preto seja semelhante, os tipos de flavonoides presentes neles são diferentes, devido ao processamento desses chás, que levam à

formação de estruturas provenientes da oxidação a que são submetidos (Engelhardt 2010; Scoparo 2013).

As catequinas também estão no grupo de antioxidantes naturais, sendo a propriedade antioxidante dependente de sua estrutura química. Quando existem radicais ligados aos anéis da catequina e a presença de grupos hidroxila nos anéis, a atividade do composto é potencializada. As catequinas são capazes de capturar as espécies reativas de oxigênio, como os radicais  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e o  $OH^-$ , sendo os radicais considerados como extremamente danosos aos lipídios, proteínas e DNA. O modo de ação consiste basicamente em transferir elétrons para as espécies reativas de oxigênio, estabilizando-as através da formação de um composto menos reativo (Senanayake 2013).

#### **2.4.5. PROCESSAMENTO DOS CHÁS *CAMELLIA SINENSIS***

##### **2.4.5.1. PROCESSO ORTODOXO OU TRADICIONAL**

O procedimento tradicional é utilizado para fazer chá a granel, onde as folhas, dependendo do tipo de chá desejado, devem ser submetidas basicamente aos processos de: vaporização ou tratamento com calor seco (para inativar a enzima polifenol-oxidase (PFO), murchamento ( para reduzir a umidade das folhas do chá e permitir uma leve oxidação, sendo que este processo leva entre 12 e 17 horas), seguido da rolagem (no que as folhas são esmagadas), oxidação (ocorre quando as enzimas endógenas entram em contato com o oxigênio, de 2 a 6 h) e secagem final (é realizada afim de que ocorra a interrupção do processo de oxidação e a redução do teor de umidade total) (Engelhardt 2010).

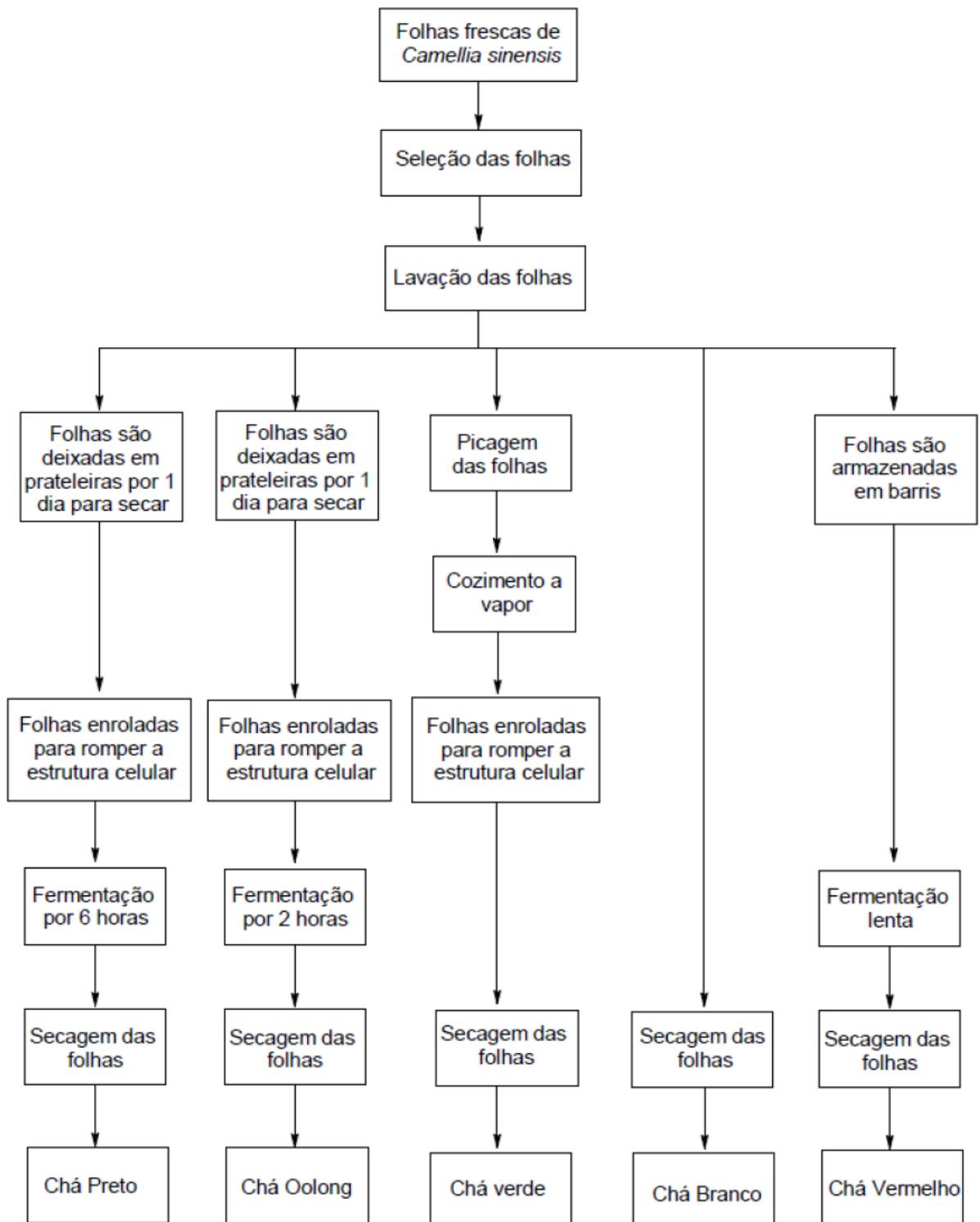
##### **2.4.5.2. CRUSH, TEAR, CURL (CTC)**

O CTC foi inventado durante a Segunda Guerra Mundial para aumentar a quantidade de chá a ser armazenado. O processo de produção segue o modo tradicional

até a fase de rolagem, a qual é substituída pela técnica CTC, em que as folhas são conduzidas por uma série de rolos cilíndricos com centenas de pequenos "dentes" que cortam, rasgam e enrolam as folhas. Isso origina fragmentos de folhas com tamanhos muito reduzidos, ideal para fabricação de chás em saquinhos. Vale ressaltar que o método CTC não altera a qualidade das folhas do chá. Após essa etapa, as folhas seguem os mesmos processos de oxidação e secagem (Hampton 1992; Engelhardt 2010).

Levando-se em consideração que o processo ao qual as folhas de *C. sinensis* são submetidas após a colheita leva à diferenciação dos tipos de chás. Existem cinco diferentes tipos de chás provenientes da planta *C. sinensis*: branco, preto, verde, amarelo (oolong) e vermelho (Paganini-Costa 2011), podendo ser divididos de acordo com o processo de oxidação: não oxidados (verde e branco), semi oxidados (oolong e vermelho) e oxidado (preto) (Almajano, Carbó et al. 2008; Engelhardt 2010).

Figura 6 - Etapas do processamento dos chás



Fonte: (Paganini-Costa 2011)

### **2.4.5.3. CHÁ BRANCO**

O chá branco é preparado a partir de folhas jovens e botões que são retirados antes que as flores desabrochem, colhidos apenas uma vez ao ano, no início da primavera. Para tanto, os botões foliares estão protegidos da luz do sol, impedindo-se assim, a formação de clorofila. O processo básico para preparação do chá branco consiste apenas na secagem mecânica, corte e mistura das folhas, sendo que estas não sofrem nenhum tipo de oxidação (Hilal 2007; Gonzalez 2009).

O Chá Branco que é o mais raro e menos processado dos chás. A planta não sofre nenhum processamento além da secagem pelo sol, conferindo-lhe um sabor leve e delicado (Santana-Rios, Orner et al. 2001; Rusak, Komes et al. 2008).

Os principais compostos presentes nesse chá são os polifenóis monoméricos, caracterizados pelas epicatequinas e seus derivados, bem como vários ácidos como gálico e cumárico, além de alcaloides, representados principalmente pela cafeína (Rusak, Komes et al. 2008).

### **2.4.5.4. CHÁ VERDE**

O chá verde é produzido por meio de folhas jovens de *Camellia sinensis*, as quais são enroladas e vaporizadas para minimizar a oxidação (Rusak, Komes et al. 2008); o emprego de calor inativa a enzima PFO, conferindo a coloração verde, característica das folhas (Kuroki 2007; Engelhardt 2010).

O chá verde tem muitos compostos ativos biológicos como catequinas, saponina, cafeína, teanina e vitaminas (Takeo 1992; Cabrera, Gimenez et al. 2003). O chá verde é rico em vitamina K, nutriente essencial para a coagulação sanguínea (Zeeb, Nelson et al. 2000). No chá verde, encontramos uma alta concentração de catequinas e baixa de teaflavinas, demonstrando seu sabor adstringente e amargo (Matsubara 2006; Lima 2009).

#### 2.4.5.5. CHÁ VERMELHO

O chá vermelho (Pu-erh) é preparado pela fermentação completa e por longo tempo das folhas (no mínimo 3 anos), sendo que durante esse processo observa-se a presença do microorganismo *Aspergillus niger*. Ao longo deste tempo a bebida vai adquirindo a sua cor característica. Acredita-se que quanto maior for o tempo de preservação das folhas do chá, melhor será sua qualidade (Okada 1996; Wu 2007).

#### 2.4.5.6. CHÁ PRETO

Para se obter o chá preto, a primeira etapa consiste em deixar as folhas em uma sala, espalhadas em prateleiras, durante um dia, com o objetivo de reduzir a umidade das folhas. No final desse tempo, as folhas estão macias o suficiente para serem enroladas no formato de pequenas bolas. O rompimento da estrutura celular das folhas permite a liberação de enzimas que irão causar a sua fermentação. As folhas enroladas são, então, espalhadas em prateleiras para que ocorra a fermentação por aproximadamente 6 horas. A seguir, as folhas são colocadas em câmaras de ar quente para secar e para bloquear a sua fermentação por meio da desnaturação das enzimas. Durante esse processo, as folhas tornam-se escuras, perdem cerca de 2% de umidade e o sabor característico do chá preto é obtido (Vinson 1998; Wang, Provan et al. 2000)

Durante o processo de oxidação para a produção dos chás *oolong* e preto, as catequinas entram em contato com as enzimas polifenoloxidasas e dão origem as teaflavinas (estruturas dímeras). O chá preto apresenta elevada concentração de teaflavinas e baixa de catequinas (Valenzuela 2004).

Quando comparado aos demais chás provenientes da *C. sinensis*, o chá preto é o mais oxidado e apresenta um sabor mais forte e acentuado principalmente devido a grande quantidade de teaflavinas (Balentine, Wiseman et al. 1997; Matsubara 2006; Lima 2009).

#### 2.4.6. EFEITOS DOS CHÁS À SAÚDE

A pesquisa sobre os efeitos do chá na saúde humana ocorre devido a crescente necessidade de fornecer dietas naturalmente saudáveis, que incluam polifenóis derivados de plantas. Outros estudos associaram o consumo de chá com menor risco de vários tipos de câncer, incluindo câncer de cavidade oral, esôfago e pulmão (Chung, Schwartz et al. 2003).

Os chás da *C. sinensis* são muito utilizados na medicina tradicional para o tratamento de várias desordens tais como obesidade, hipercolesterolemia e dispepsia. Vários estudos têm comprovado estas propriedades terapêuticas, além de evidenciarem outras como a anticarcinogênica (Yang and Lambert 2011), antiobesidade, antidiabética e hipocolesterolêmica (Sae-Tan, Grove et al. 2011), antioxidante (Cooper, Morre et al. 2005), anti-inflamatória (de Mejia 2009), redução do risco de doenças cardiovasculares (Mineharu, Koizumi et al. 2011), melhora da função cognitiva (Kuriyama, Hozawa et al. 2006), e aumento da densidade mineral óssea (Devine, Hodgson et al. 2007). Estas atividades biológicas podem ser atribuídas a composição química bastante diversificada desta planta.

O chá verde e seus constituintes são mais conhecidos por suas propriedades antioxidantes, o que levou à sua avaliação sobre uma série de doenças associadas com ERO, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como proporcionar uma proteção significativa contra a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, e danos isquêmicos (Mandel and Youdim 2004; Senger 2010).

Já foi relatado o efeito do chá verde na redução do ganho de peso corporal (Grove, Sae-tan et al. 2012; Johnson, Bryant et al. 2012; Sampath, Rashid et al. 2017), redução da glicemia (Sampath, Rashid et al. 2017), resistência à insulina, redução da massa de depósitos de tecido adiposo (Sae-Tan, Rogers et al. 2014; Sae-Tan, Rogers et al. 2015), proteção contra o estresse oxidativo (Molina, Bolin et al. 2015), aumento na termogênese (Dulloo, Duret et al. 1999) e na expressão de genes relacionados à termogênese adaptativa (Nomura, Ichinose et al. 2008; Sae-Tan, Rogers et al. 2014; Sae-Tan, Rogers et al. 2015).

Alguns estudos relacionam a indução da perda de peso com o efeito termogênico resultante da interação entre as catequinas e a cafeína presentes no chá verde e chá preto (Freitas 2007), resultando na redução da gordura corporal e nos índices de colesterol

séricos, envolvidos no controle da obesidade abdominal (Choo 2003; Auvichayapat, Prapochanung et al. 2008)

Foi relatado que a administração crônica de extratos polifenólicos descafeinados do chá verde, Oolong ou preto diminui o peso corporal, o volume total de gordura visceral, o conteúdo lipídico do fígado e a inflamação em camundongos alimentados com dietas ricas em gordura ou com alto teor de sacarose (Heber, Zhang et al. 2014).

Os benefícios para a saúde associados ao consumo de chá têm sido atribuídos em parte à atividade antioxidante e *scavenger* de RL dos flavonoides mais abundantes do chá (Rusak et al., 2008). Embora a EGCG seja o polifenol mais abundante e mais estudado do chá verde, parece que os efeitos preventivos do mesmo estão mais relacionados com uma mistura de catequinas do chá (Fu 2007; Bode 2009).

Koutelidakis e colaboradores (2009) relataram que a suplementação com extrato de chá branco durante cinco dias consecutivos, aumenta a capacidade antioxidante do plasma e também em diferentes órgãos de camundongos (Koutelidakis 2009). Além disso, foi demonstrado que o chá branco tem efeito quimiopreventivo e antineoplásico em células de cancro do pulmão (Mao 2010) e pode proteger a pele humana a partir da estimulação solar da luz ultravioleta (Camouse 2009). O chá branco também demonstrou ter forte atividade lipolítica e anti-adipogênica *in vitro* (Sohle 2009).

O Chá Pu-erh está ganhando muita atenção por suas atividades benéficas a saúde. Os efeitos conhecidos que são associados ao Pu-erh incluem retardamento ou prevenção do cancro, da doença cardíaca, artrite reumatóide e doença imunitária (Kuo 2005; Way 2009). Além disso, Duh e colaboradores (2004) verificaram que a epicatequina, o ácido ascórbico e os compostos polifenólicos estão presentes nos extratos aquosos do chá pu-erh, o que poderia que pode contribuir para o efeito protetor sobre danos oxidativo, bem como a captura do óxido nítrico (Duh 2004)

A administração de polifenóis do chá preto reduziram o ganho de peso corporal, a massa de tecido adiposo e conteúdo lipídico hepático em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (Uchiyama, Taniguchi et al. 2011). No entanto, a maioria dos estudos sobre polifenóis do chá foi realizada com catequina pura, extrato de catequina, teaflavinas purificadas, infusão de chá, mas não com folhas de chá preparadas como decocção, embora este método seja popular.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo avaliar e comparar o efeito benéfico dos diferentes chás (*Camellia sinensis*) branco, verde, vermelho e preto sobre alterações, metabólicas, cognitivas e reprodutivas, induzidas pelo consumo da dieta de cafeteria durante 8 semanas em camundongas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

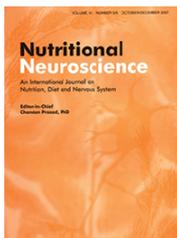
- a) Comparar o ganho de peso e acúmulo de gordura visceral nos animais;
- b) Avaliar parâmetros bioquímicos, tais como, glicose, colesterol, triglicerídeos no plasma.
- c) Avaliar os níveis plasmáticos de leptina.
- d) Realizar testes para avaliar a atividade locomotora e teste de memória;
- e) Realizar avaliação histológica do ovário, a fim de verificar a função reprodutiva;
- f) Determinar os parâmetros de estresse oxidativo, níveis de espécies reativas e a capacidade antioxidante total nos tecidos (hipocampo, ovário)
- g) Determinar a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo de camundongas após 8 semanas de dieta de cafeteria;

#### 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo científico e um manuscrito. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio artigo e no manuscrito.

O primeiro artigo está apresentado conforme sua publicação na revista “Nutritional Neuroscience” com o título “Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet”.

Os demais resultados obtidos estão apresentados no formato de manuscrito que será submetido a uma revista científica com Qualis A ou B da CAPES na área de avaliação do PPGBioq (CBII), após as considerações finais da banca.



## Nutritional Neuroscience

An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System



ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ynns20>

### Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet

Melina Bucco Soares, Juliana Bernera Ramalho, Aryele Pinto Izaguirry, Natasha Frasson Pavin, Cristiano Chiapinotto Spiazzi, Helen Lidiane Schmidt, Pâmela Billig Mello-Carpes & Francieli Weber Santos

To cite this article: Melina Bucco Soares, Juliana Bernera Ramalho, Aryele Pinto Izaguirry, Natasha Frasson Pavin, Cristiano Chiapinotto Spiazzi, Helen Lidiane Schmidt, Pâmela Billig Mello-Carpes & Francieli Weber Santos (2017): Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2017.1418726](https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1418726)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1418726>



Published online: 27 Dec 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ynns20>

# Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet

Melina Bucco Soares<sup>1</sup>, Juliana Bernera Ramalho<sup>1</sup>, Aryele Pinto Izaguirry<sup>1</sup>,  
Natasha Frasson Pavin<sup>1</sup>, Cristiano Chiapinotto Spiazzi<sup>1</sup>, Helen  
Lidiane Schimidt<sup>2</sup>, Pâmela Billig Mello-Carpes<sup>3</sup>, Francielli Weber Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil, <sup>2</sup>Applied Neuromechanics Research Group, Federal University of Pampa, CEP 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil, <sup>3</sup>Physiology Research Group, Federal University of Pampa, CEP 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil

**Objectives:** Consumption of high-fat and high-sugar diets in Western countries has increased significantly causing major global health problems including metabolic syndrome and obesity. In addition, studies have suggested that obesity can lead to learning and memory deficits. In this context, the use of natural compounds with low costs, minor side effects and increased antioxidant activity, such as teas, could reduce the damages induced by obesity. We investigated the effect of white, green, red, and black teas (*Camellia sinensis*) and their possible neuroprotective mechanisms in an experimental obesity model induced by a cafeteria diet (CD).

**Methods:** Female Swiss mice (20–30 g) were used; they received a normal diet or a hypercaloric diet (CD) during 8 weeks. Concomitantly, some mice received orally white, green, red, or black teas (1% dose) or water.

**Results:** The mice subjected to CD showed weight gain, body fat accumulation, increased glucose, cholesterol, and triglycerides, associated to recognition memory deficits and increased reactive species (RS) levels and acetylcholinesterase (AChE) activity in the hippocampus. All teas significantly reduced AChE activity and partially reduced fat accumulation. Green and red teas reduced memory deficit. White, green, and black teas reduced RS levels, while only green and black tea reduced plasma triglyceride levels. **Discussion:** According to the results obtained it is possible to conclude that green tea was better than other teas in reducing effects of the CD model, being able to protect a greater number of parameters.

**KEYWORDS:** *Camellia sinensis*, Cafeteria diet, Memory deficits, White tea, Green tea, Red tea, Black tea, Oxidative stress

## Introduction

Consumption of high-fat diets in Western countries has increased significantly, leading to major health issues, including a worldwide epidemic of metabolic syndrome and obesity.<sup>1,2</sup> Since 1980, obesity has nearly doubled worldwide,<sup>3</sup> and according to the World Health Organization (WHO), in 2014, 39% of adults over the age of 18 were classified as overweight and 13% were classified as obese (WHO, 2014). Obesity produces adverse health consequences, such as dyslipidemia, insulin resistance, hypertension, and cardiovascular disease.<sup>4</sup>

In addition, many comorbidities related to obesity have been associated with cognitive impairment and

increased risk of dementia, such as hypertension,<sup>5</sup> elevated triglycerides,<sup>6,7</sup> and type 2 diabetes.<sup>8</sup> Epidemiological data have also associated the consumption of high energy diets with an increased risk of age-related memory deficits and neurological diseases, including Alzheimer's disease (AD) and other types of dementia.<sup>9,10</sup> Moreover, high energy diet intake impairs the structure and function of the hippocampus, including synaptic plasticity and neurogenesis which are necessary for learning and memory processes.<sup>11–13</sup> Studies with rodents have confirmed that long-term intake of such diets produces cognitive deficits, especially in spatial tasks that require the hippocampus.<sup>14–16</sup>

Acetylcholinesterase (AChE) activity is also sensitive to exogenous factors like diets<sup>17</sup> and has been the target of emerging therapeutic strategies to treat

Correspondence to: Francielli Weber Santos, Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil. Email: francielliweber@yahoo.com.br

cognitive disorders. AChE is an important regulatory enzyme, that quickly hydrolyses the neurotransmitter acetylcholine (ACh),<sup>18</sup> which is known to influence novelty-seeking and exploration behaviors. ACh also has a role in mediating emotional behavior changes induced by high-fat diet consumption.<sup>19,20</sup> In addition, deficiencies in learning and memory are associated with an increase in AChE activity,<sup>21</sup> reinforcing the relationship between this enzyme and cognitive alterations.

Obesity adversely affects the brain, but the physiological mechanisms of how this occurs are not well understood. Experimental and human studies have shown that obesity is associated with increased oxidative stress,<sup>22,23</sup> which is strongly implicated in cognitive decline caused by brain injury<sup>24</sup> or neurodegenerative disease.<sup>25,26</sup>

In recent years, interest in using natural products for pharmacological purposes, as a form of complementary or replacement therapy, has increased. The consumption of dietary antioxidants, for example, contributes to the enhancement of endogenous defense mechanisms (non-enzymatic antioxidant system)<sup>27,28</sup> and could slow down or reverse damages caused by an excessive production of reactive species (RS).<sup>29,30</sup>

Tea is one of the most widely consumed beverages in the world, second only to water, and its medicinal properties have been widely explored. There are three kinds of teas obtained from *Camellia sinensis* plant: non-fermented (white and green tea), partially fermented (red and oolong tea) and completely fermented (black tea),<sup>31</sup> and their composition is affected by the fermentation process. These teas are a rich source of flavonoids, polyphenols, and several other catechins which have potent antioxidant, free radical scavenging, and anti-diabetic activities.<sup>32-36</sup> Furthermore, it has been reported that chronic administration of decaffeinated polyphenol extracts from green, oolong or black tea decreases body weight, total visceral fat volume, hepatic lipid content, and inflammation in mice fed high-fat or high-sucrose diets.<sup>37</sup>

The main catechins in green tea are epicatechin (EC), epicatechin-3-gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), with the latter being the highest in concentration.<sup>38,39</sup> During a 4 months high-fat diet (HFD), a supplementation with dietary EGCG, one of the major green tea polyphenols, reduces body weight gain, body fat mass, and liver triglycerides in mice, effects that are associated with increased fecal lipids.<sup>40</sup>

The present study has been designed to investigate the neuroprotective effects of white, green, red, and black teas on memory deficits induced by a hypercaloric diet, and the possible mechanisms involved in these

effects, evaluating hippocampal oxidative stress and AChE activity.

## Material and methods

### Chemicals

(-)-Epicatechin (EC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), and bovine serum albumin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All chemicals and solvents used in high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis were of analytical reagent grade quality and were used as received. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### Herbal materials

White, Green, Red, Black, and teas were purchased from a local supermarket (Madrugada Alimentos Ltda, Venâncio Alves, RS, Brazil). Teas were prepared daily in the early morning and administered at room temperature. They were brewed immediately before each experiment using distilled water (95–100°C), and the brewing concentration was 1% (1 g of tea per 100 ml of water).<sup>41</sup> After 10 minutes the infusions were filtered through paper filter. Liquid volume intake was monitored daily.

After preparation, the contents of catechins were analyzed by HPLC, to the presence of epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), and epigallocatechin gallate (EGCG) (Table 1).

### Animals

Experiments were conducted using female Swiss mice (20–30 g). The mice were obtained from Federal University of Santa Maria vivarium (Santa Maria, Brazil). Animals were kept in an appropriate cabinet with forced air ventilation, in a 12-hour light/dark cycle, at a controlled room temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . This study was approved by Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pampa (Uruguaiana, Brazil) (Protocol no 024/2015).

### Experimental procedure

Mice received normal diet (standard diet, Puro Lab 22 PB, Puro Trato<sup>®</sup>) or cafeteria diet (CD) for 8 weeks of treatment.<sup>42</sup> CD is highly palatable and highly caloric,

**Table 1. Catechins concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) in sample of white, green, red, and black tea.**

	White tea	Green tea	Red tea	Black tea
Epicatechin ( $\mu\text{g/ml}$ )	13.30	63.07	ND	ND
Epigallocatechin gallate ( $\mu\text{g/ml}$ )	46.29	178.79	63.21	47.62
Epicatechin gallate ( $\mu\text{g/ml}$ )	9.11	111.57	ND	ND

ND = not detected.

rich in carbohydrates and fats, being prevalent in industrialized countries,<sup>43</sup> consisted of commercial rat chow, peanuts, milk chocolate, and sweet biscuit in the proportion of 3:2:2:1, with all components powdered, mixed and pelleted.<sup>44</sup> Animals received orally water or tea (White, green, red, or black).

Group 1 (Control): standard diet (SD) + water

Group 2 (Cafeteria Diet): cafeteria diet (CD) + water

Group 3 (White + CD): cafeteria diet (CD) + white tea

Group 4 (Green tea + CD): cafeteria diet (CD) + green tea

Group 5 (Red tea + CD): cafeteria diet (CD) + red tea

Group 6 (Black tea + CD): cafeteria diet (CD) + black tea

The mice were weighed weekly and consumption of food and liquids were measured daily for comparison. At the end of the 8 weeks of treatment all groups were subjected to a battery of neurobehavioral tests as described below. The supplementation was continued during the testing days. Twenty-four hours after the last behavioral test, mice were euthanized and blood samples were taken by cardiac puncture, retroperitoneal and gonadal fat were removed and weighed, and bilateral hippocampi were removed for biochemical analysis. The experimental design is shown in Fig. 1.

#### Control behavioral tests

Control behavioral tests were performed after 8 weeks of supplementation to ensure that parameters that could alter memory tests results were not altered, as the exploratory and locomotor activities, and the anxiety behavior.

#### Open field test

The open field (OF) apparatus consisted of a 30 × 25 × 20 cm open arena painted white except for the frontal wall, which was made of glass. The floor was divided into 12 equal rectangles by black lines. The number of crossings (four paws criterion) and rearings (two paws criterion), as measures for locomotor and exploratory activity, respectively, were counted. The mice were individually placed in the arena and observed for 5 minutes.<sup>45</sup>

#### Elevated Plus Maze

Elevated Plus Maze (EPM) was a plus-shaped maze made of dark gray plastic with two opposing open

arms (30 × 8 cm) and two opposing closed arms (30 × 8 × 15 cm) connected by a central platform (8 × 8 cm) and elevated 120 cm above the floor. Each mouse was placed in the center of the maze facing an open arm and the number of arm entries, as well as the percent of time spent in open arms, was assessed during a 5-minute period. An entry was scored as such only when the mouse placed all four limbs into any given arm. A reduction of the percent of time spent and number of entries into the open arms is considered as an anxiety-like index, independent of locomotor activity.<sup>46</sup>

#### Object recognition test

Recognition memory was evaluated through the object recognition (OR) test using a 30 × 25 × 20 cm open arena as described previously.<sup>47</sup> All animals were habituated to the experimental arena for 20 minutes/day for 4 days in the absence of any specific behavioral stimulus. On the first day after habituation, the animals were placed in the arena with two different objects (A and B) and were free to explore for 5 minutes (training session); the mice were tested 24 hours later to evaluate long-term memory (LTM). In the tests, one of the objects was removed and replaced with a new object (C) and the mice were introduced in the arena for 5 minutes. The time spent exploring each object was recorded by an observer blind to the treatment and was expressed as a percentage of the total exploration time computed in seconds.<sup>48</sup>

#### Biochemical testing

Dosages of plasmatic triglycerides, total cholesterol, and glucose were performed using commercial kits (Labtest Diagnostica, MG, Brazil) and levels are expressed as mg/dl.

#### Tissue preparation

Mice were euthanized 24 hours after the conclusion of the behavioral experiments. Bilateral hippocampi were removed and homogenized in 50 mM Tris HCl, pH 7.4, (1/10, w/v). Afterwards, samples were centrifuged at 2400 rpm for 10 minutes and the supernatants (S1) were used for further analysis.

#### Reactive species

The levels of the RS were determined by a spectrofluorimetric method, using 2,7-dichlorofluorescein

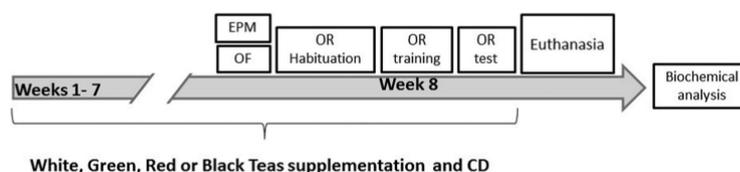


Figure 1. Experimental procedure.

diacetate (DCHF-DA) assay.<sup>49</sup> The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 488 nm excitation) 2 hours after the addition of DCHF-DA to the medium. The results were expressed as fluorescence units.

#### Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined as described by Misra and Fridovich.<sup>50</sup> This method is based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction is measured at 480 nm. One unit (IU) of enzyme is defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of autoxidation of adrenaline to 50%.

#### AChE activity

The activity of AChE was carried out according to the method of Ellman *et al.*,<sup>51</sup> using acetylthiocholine as substrate. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid, measured by absorbance at 412 nm. AChE activity was expressed as  $\mu\text{mol AcSCh}/\text{hour}/\text{mg}$  protein.

#### Ferric reducing antioxidant potential

Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay was done according to Benzie and Strain.<sup>52</sup> This assay is based on reduction capacity of ferric to ferrous ion at low pH resulting in a color complex ferrous-tripyridyltriazine. Readings of the colored product were then taken at 593 nm. A standard curve of ascorbic acid was used and results are expressed in  $\mu\text{g}$  equivalent of ascorbic acid.

#### Protein determination

Protein concentration was measured by the method of Bradford,<sup>53</sup> using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical analysis

Data were checked for normality of distribution using the Shapiro–Wilk test. The OR test results were expressed as the percentage of total time spent exploring each object. Results were analyzed using an unpaired *t*-test to compare exploration of familiar and novel object in the test session. Additionally, the

discrimination index was determined by the difference of time spent exploring the new (Tnovel) and the familiar (Tfamiliar) objects in the test session:  $[(\text{Tnovel} - \text{Tfamiliar})/(\text{Tnovel} + \text{Tfamiliar}) \times 100 (\%)]$ , and used as a memory parameter. The results of the index were analyzed using ANOVA with Tukey's post hoc. OF and EPM results were compared between groups using one-way ANOVA.

Regarding biochemical and oxidative stress tests, independent *t*-test was used to compare control and CD groups. Differences in treatments were analyzed using a one-way ANOVA followed by the Duncan test when necessary. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### Catechins content

Non-fermented teas presented three catechins (EC: 13.30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; EGCG: 46.29  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ECG: 9.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in white tea; EC: 63.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; EGCG: 178.79  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; ECG: 111.57  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in green tea), while partially or fully fermented teas only had EGCG (63.21  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in red tea; 47.62  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in black tea).

### Biochemical analysis

Body weight, body fat, plasma glucose, and lipid parameters of mice are shown in Table 2. The results show that body weights, serum cholesterol, glucose, and triglycerides levels were significantly higher in the CD group when compared with the control group. The therapy with green and black teas decreased triglycerides levels compared with the control group. All teas reduce fat accumulation compared to CD group.

### Control behavioral tests

No differences were verified on locomotor and exploratory activities or anxiety behavior, since there were no differences between groups in the numbers of crossings and rearings in the OF test and in the percent of time spent in the open arms in the EPM (Table 3).

**Table 2.** Effect of CD and teas on body weight, body fat, levels of glucose, total cholesterol, triglycerides.

	Body weight gain (g)	Body fat (g)	Glucose (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)
Control	4.44 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	136.99 $\pm$ 8.93 <sup>a</sup>	110.07 $\pm$ 16.64 <sup>a</sup>	152.98 $\pm$ 25.29 <sup>a</sup>
CD	11.78 $\pm$ 4.17 <sup>b</sup>	5.18 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>	144.79 $\pm$ 4.27 <sup>b</sup>	172.27 $\pm$ 8.73 <sup>b</sup>	248.69 $\pm$ 50.72 <sup>b</sup>
CD + White tea	14.4 $\pm$ 6.45 <sup>b</sup>	3.57 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	146.98 $\pm$ 16.89 <sup>ab</sup>	174.97 $\pm$ 17.84 <sup>b</sup>	224.61 $\pm$ 50.63 <sup>b</sup>
CD + Green tea	12.6 $\pm$ 5.21 <sup>b</sup>	3.35 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>	151.75 $\pm$ 9.02 <sup>ab</sup>	168.99 $\pm$ 29.47 <sup>b</sup>	176.76 $\pm$ 25.92 <sup>a</sup>
CD + Red tea	11.4 $\pm$ 4.85 <sup>b</sup>	3.54 $\pm$ 0.49 <sup>c</sup>	151.50 $\pm$ 11.3 <sup>b</sup>	169.45 $\pm$ 21.89 <sup>b</sup>	211.6 $\pm$ 35.02 <sup>b</sup>
CD + Black tea	11.5 $\pm$ 3.34 <sup>b</sup>	4.06 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>	144.29 $\pm$ 14.5 <sup>ab</sup>	186.04 $\pm$ 21.79 <sup>b</sup>	165.04 $\pm$ 63.25 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ). Different lowercase letters represent statistically significant differences. <sup>a</sup>Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup>significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup>significantly different from control and CD group ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Effects of CD and teas on locomotor and anxiety parameters evaluated in the OF test.

	OF		Elevated plus Time in open arms (%)
	Crossing (s)	Rearing (s)	
Control	91.91 ± 7.55	38.09 ± 2.88	48.84 ± 4.83
CD	103.40 ± 11.77	37.45 ± 4.83	55.58 ± 4.81
CD + White tea	83.36 ± 7.11	37.64 ± 3.13	43.49 ± 2.58
CD + Green tea	103.27 ± 9.61	34.00 ± 3.16	55.27 ± 6.12
CD + Red tea	69.09 ± 3.88	28.09 ± 3.88	44.19 ± 5.00
CD + Black tea	128.80 ± 17.72	41.70 ± 17.72	50.61 ± 3.77

Data are expressed as mean ± S.E.M. ( $n = 8-10$ ).

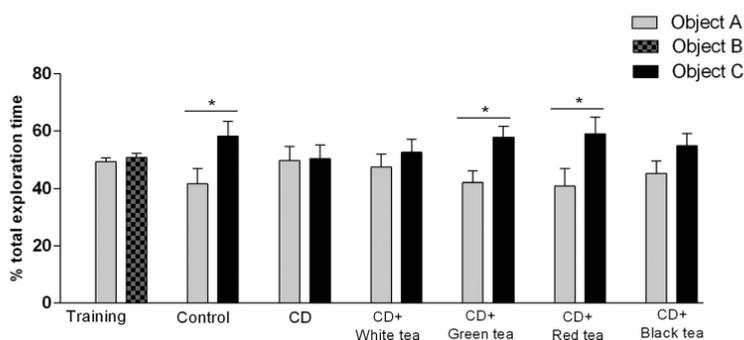
### Memory test

#### OR test

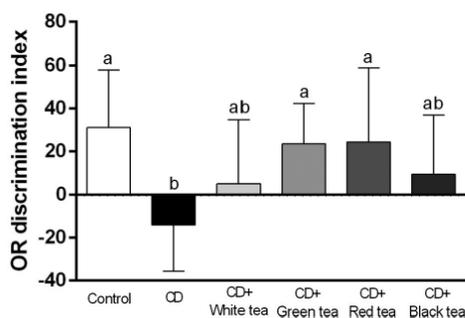
In the OR training session, animals from all groups explored each of the objects (A and B) for a similar percentage of the time (about 50%). LTM evaluation (24 hours after the training session) indicated that the control mice spent more time exploring the novel object (C) ( $P < 0.05$ ; unpaired *t*-test A vs. C, Fig. 2).

CD caused memory deficits (the mice spent about 50% of the total exploration time exploring the familiar object and about 50% the new object, A and C respectively;  $P = 0.9354$ , Fig. 2). Green tea and the red tea ameliorated the memory deficits caused by CD consumption, since animals supplemented with these teas spent significantly more time exploring the new object (C) in comparison to the familiar (A) ( $P = 0.0092$ ;  $P = 0.0413$ , respectively; Fig. 2). The same was not observed with white and black teas supplementation (Fig. 2).

Object discrimination index differed between the groups ( $P = 0.005$ ; Fig. 3). CD group showed a lower discrimination index for novel object compared to control ( $P < 0.01$ , Fig. 3). Importantly, green and red teas avoided OR memory deficits ( $P < 0.05$ , Fig. 3).



**Figure 2.** Effect of CD and teas on OR memory test in mice ( $n = 8-10$ ). Data are reported as means ± S.E.M. \* $P < 0.05$  (object familiar vs. novel).



**Figure 3.** Effect of CD and teas on OR memory (OR index ( $n = 8-10$ )). Data were reported as mean ± SD. Different lowercase letters represent statistically significant differences.

### Biochemical analysis

#### Reactive species

We observed a significant increase (approximately 34%) in hippocampus RS levels on CD-fed mice when compared with control group. White, green, and black teas were able to reduce RS levels, while red tea did not (Fig. 4).

#### SOD activity

Mice that received CD showed a significant increase on the SOD activity (approximately 42%) in the hippocampus, compared to the control group. Teas therapies did not alter the hippocampal enzyme activity of CD-treated rats (Fig. 5).

#### AChE activity

Animals that received CD for 8 weeks showed an increase on AChE activity (30.5%) in the hippocampus compared to the control group. All teas supplementations were able to prevent this enhance on enzyme activity (Fig. 6).

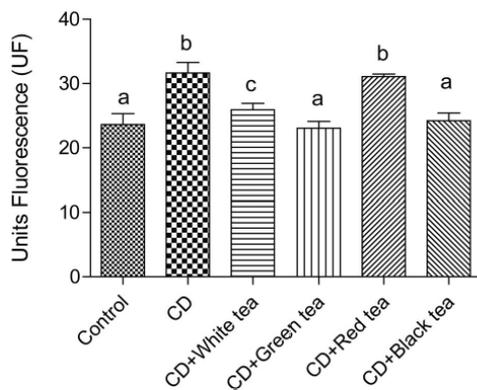


Figure 4. Effect of CD and teas on RS levels in mice hippocampus ( $n = 6$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as UF. Different lowercase letters represent statistically significant differences. <sup>a</sup>Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup>significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup>significantly different from control and CD group ( $P < 0.05$ ).

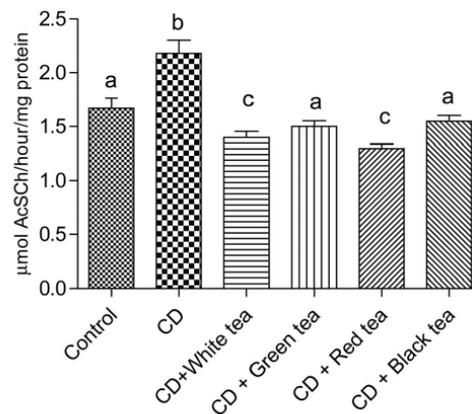


Figure 6. Effect of CD and teas on AChE activity in mice hippocampus ( $n = 6$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as  $\mu\text{mol AcSch/hour/mg protein}$ . Different lowercase letters represent statistically significant differences. <sup>a</sup>Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup>significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup>significantly different from control and CD group ( $P < 0.05$ ).

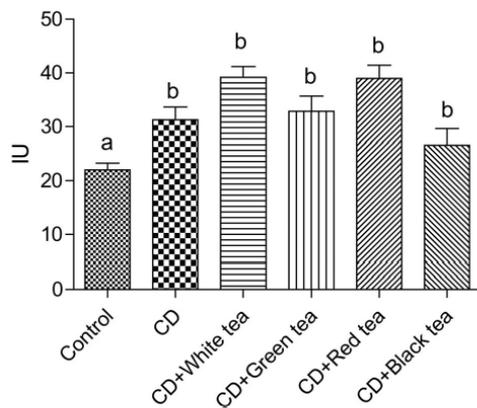


Figure 5. Effects of CD and teas on SOD in mice hippocampus ( $n = 6$ ). One unit (IU) of enzyme is defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of autoxidation of adrenaline to 50%. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as international units (IU). Different lowercase letters represent statistically significant differences. <sup>a</sup>Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup>significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup>significantly different from control and CD group ( $P < 0.05$ ).

#### Ferric reducing antioxidant potential

There was no statistically significant difference in FRAP on the hippocampus of mice that received CD and/or teas supplementation, as shown in Fig. 7.

#### Correlation analysis of the AChE activity and oxidative stress parameters

In attempt to verify a direct interaction between AChE and oxidative stress parameters, we conducted a

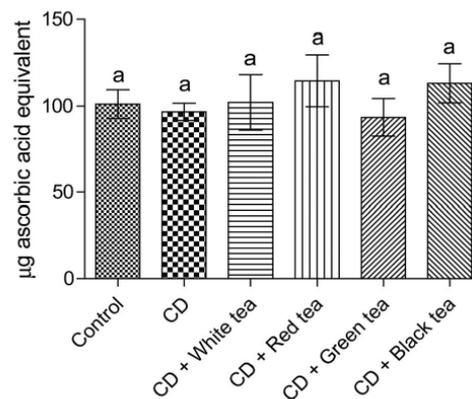


Figure 7. Effects of CD and teas on FRAP in mice hippocampus ( $n = 6$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as  $\mu\text{g ascorbic acid equivalent}$ . Different lowercase letters represent statistically significant differences. <sup>a</sup>Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup>significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup>significantly different from control and CD group ( $P < 0.05$ ).

correlation analysis (Spearman rank correlation). We verified a weak negative correlation between AChE and FRAP ( $r = -0.033$ ,  $P = 0.02$ ) as well as between AChE and SOD ( $r = -0.034$ ,  $P = 0.02$ ). No correlation was observed between AChE and RS ( $r = -0.08$ ,  $P = 0.60$ ).

#### Discussion

This study is the first to compare beneficial health effects from daily oral administration of different

types of tea from *C. sinensis* in protecting against oxidative damage in the hippocampus, as well as memory deficit in novel OR task in an obesity model induced by CD in mice. Tea, one of the most popular beverages worldwide, can be categorized into three types: non-fermented white and green, partially fermented oolong and red, and fully fermented black tea.<sup>54</sup> These different teas contain varying amounts of compounds known to have beneficial effects. Polyphenols are relatively more abundant in green tea,<sup>55</sup> while the black and Pu-erh teas are relatively rich in natural statins.<sup>56,57</sup>

We opted for the use of female mice because according to the latest surveys done by WHO, women are most affected by overweight and obesity. Probably could have a hormonal effect related with this point. When females are housed in groups and isolated from males normally occurs the suppression or prolongation of estrous cycle of mature female mice (and other rodents). This phenomenon is known as Lee-Boot effect.<sup>58</sup> Thus, considering that in this study females were kept in an appropriate cabinet with forced air ventilation, isolated from males, we believe that all females were in the same estrous cycle stage. This reduces possible differences among groups related with hormonal alterations.

Animals that received CD presented a characteristic obesity profile that was observed by a significant increase in body weight, adipose tissue, and circulating concentration of total cholesterol, glucose, and triglyceride compared to mice fed only the standard diet. Green and black teas reduced triglyceride levels while fat accumulation was lower in animals that consumed the diet associated with white, green or red teas. Our results are consistent with studies that have shown that green tea extracts decrease triglycerides in diabetic rats. In addition, the continuous ingestion of a green tea extract high in catechins led to a reduction in body fat and LDL cholesterol, suggesting that the ingestion of such an extract contributes to a decrease in obesity.<sup>59</sup> Also, the results support the hypothesis that both green and black teas may have beneficial effects against the risks of metabolic syndrome and cardiovascular complications, as shown in rat models of obesity and diabetes.

Based on epidemiological studies and experimental evidence in rodents it is probable that western diet may prompt metabolic disturbances that consequently can induce cognitive impairment and neuropathology.<sup>60–62</sup> In our study, CD animals presented a memory deficit in the OR test. Jurdak and Kanarek<sup>63</sup> reported impaired OR memory after 8 weeks in sucrose supplemented rats. Neuroprotective effects of green and red teas were evident in OR memory. Other study also observed the protective effect of green and red teas, but not

black tea, on cognitive deficit caused by ischemic stroke in rats.<sup>64</sup>

Hippocampus is the site of structural abnormalities associated with early stages of AD and other cognitive dementias.<sup>65,66</sup> In fact, it is preferentially susceptible, compared to other brain regions, to a variety of insults that promote cognitive dysfunction as their signature symptoms.<sup>67</sup> Additionally, hippocampus is particularly susceptible to oxidative stress due to the simultaneous presence of high levels of polyunsaturated fatty acids and iron.<sup>68</sup>

Obesity induced by CD is associated with increased oxidative stress,<sup>69</sup> which cause remains unclear, but may be related to the accumulation of toxic metabolites that lead to excessive production of free radicals or to depletion of cell antioxidant defenses. Oxidative damages observed in the hippocampus, evidenced by increased ROS levels and SOD activity, can contribute to the impairment of learning and memory.<sup>70</sup> The beneficial effects of tea consumption are mainly related to its bioactive components, catechins polyphenol and their derivatives, which have shown to act directly as radical scavengers, iron chelators, and to exert indirect antioxidant effects through activation of transcription factors and antioxidant enzymes, thus modulating the cellular redox state.<sup>71,72</sup>

Our present data also demonstrate that CD increases AChE activity in the hippocampus of obese mice. Studies have shown that dietary factors affect cholinesterase activity.<sup>17</sup> The deficiencies in learning and memory are associated with the increase in AChE activity,<sup>21</sup> reinforcing the relationship between this enzyme and cognitive alterations. Alterations in AChE activity may be induced by increased free radical formation in the diabetic state.<sup>73</sup> In this study, we observed a weak negative correlation between AChE activity and FRAP or SOD, but no correlation was verified between AChE and RS. The restoration of AChE activity by teas can contribute to the maintenance of cholinergic signaling and recovery the memory loss in obese mice.

The main goal of this study was to compare the effect of different types of teas in protecting against cognitive deficits in an obesity model induced by CD. Some studies have demonstrated the effect of green tea in similar models. On the other hand, no study compared the effect of other teas from *C. sinensis*. In our study, we verified that green and red teas were effective in restoring cognitive deficit induced by CD using an OR test. We investigated if oxidative stress and AChE activity could be related with this observed effect. In fact, the presence of different compounds such as catechins (types and quantities) could explain the observed results. Yet, the results obtained did not allow to establish a precise mechanism. In fact, we verified that all the teas were able to restore

AChE activity at the control levels. But, only green, white, and black teas were effective in reducing RS levels and no tea modified SOD activity increased by CD. Oxidative status is not static, but it's modified continuously. The antioxidant defenses suffer several adaptations to combat the generated insults along time. We verified the hippocampus antioxidant potential only at the end of study. It does not mean that there was no alteration in this parameter along the study. Certainly, others mechanisms could be involved in the better effect of green and red teas observed in this study on cognition.

Taking into account all the results obtained it is possible to conclude that green tea was better than other teas in reducing effects of the CD model, being able to protect a greater number of parameters. In addition, we verified after HPLC analysis, that green tea presented the highest amount of catechins, which could probably be related to green tea bioactive effects perceived in this paper.<sup>71,72</sup> Human epidemiological and new animal data suggest that this tea and its effective constituents may decrease the incidence of dementia, AD, and Parkinson's disease.<sup>74–76</sup> In particular, its main catechin polyphenol constituent EGCG has been shown to exert neuroprotective activity against oxidative damage and neurodegeneration.<sup>76–78</sup> However, the mechanisms involved in the green tea-induced neuroprotection against different types of brain injury are not completely clear. Thus, additional studies are needed to better understand neuroprotective mechanisms on the beneficial role of *C. sinensis* teas.

#### Disclaimer statements

Contributors None.

Funding CAPES and FAPERGS are acknowledged for financial support (M.Sc. Fellowship) to N.F.P, H.L.S. and A.P.I.

Conflicts of interest None.

Ethics approval All experiments were approved (CEUA 024/2015).

Funding

#### References

- Polk SL. Definitions and demographics of obesity: diagnosis and risk factors. *Anesthesiol Clin North Am* 2005;23(3):397–403. v. Epub 2005/07/12.
- McCullough AJ. Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. *J Dig Dis* 2011;12(5):333–40. Epub 2010/11/26.
- Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011;377(9765):557–67. Epub 2011/02/08.
- Casanova E, Baselga-Escudero L, Ribas-Latre A, Cedo L, Arola-Arnal A, Pinent M, et al. Chronic intake of proanthocyanidins and docosahexaenoic acid improves skeletal muscle oxidative capacity in diet-obese rats. *J Nutr Biochem* 2014;25(10):1003–10. Epub 2014/07/12.
- Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. *Lancet Neurol* 2005;4(8):487–99. Epub 2005/07/22.
- Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, et al. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* 2006;51(2):275–92. Epub 2006/01/18.
- Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 2005;64(2):277–81. Epub 2005/01/26.
- Areosa SA, Grimley EV. Effect of the treatment of Type II diabetes mellitus on the development of cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002(4):CD003804. Epub 2003/01/10.
- Eskelinen MH, Ngandu T, Helkala EL, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, et al. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008;23(7):741–7. Epub 2008/01/12.
- Solfrizzi V, Frisardi V, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Vendemiale G, et al. Dietary fatty acids in dementia and pre-dementia syndromes: epidemiological evidence and possible underlying mechanisms. *Ageing Res Rev* 2010;9(2):184–99. Epub 2009/08/01.
- Erion JR, Wosiski-Kuhn M, Dey A, Hao S, Davis CL, Pollock NK, et al. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 2014;34(7):2618–31. Epub 2014/02/14.
- Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun* 2014;35:33–42. Epub 2013/07/09.
- Sobesky JL, Barrientos RM, De May HS, Thompson BM, Weber MD, Watkins LR, et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1beta, an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain Behav Immun* 2014;42:22–32. Epub 2014/07/08.
- Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 2012;98(1):25–32. Epub 2012/05/01.
- McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 2010;93(4):546–53. Epub 2010/02/24.
- Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG, Parent MB. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol Learn Mem* 2009;92(3):410–6. Epub 2009/06/09.
- Kaizer RR, da Silva AC, Morsch VM, Correa MC, Schetinger MR. Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure. *Neurochem Res* 2004;29(12):2251–5. Epub 2005/01/28.
- Anglister L, Etlin A, Finkel E, Durrant AR, Lev-Tov A. Cholinesterases in development and disease. *Chem-Biol Interact* 2008;175(1–3):92–100. Epub 2008/06/24.
- Morganstern I, Ye Z, Liang S, Fagan S, Leibowitz SF. Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption. *Brain Res* 2012;1470:24–34. Epub 2012/07/07.
- Blokland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev* 1995;21(3):285–300. Epub 1995/11/01.
- Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Correa M, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009;610(1–3):42–8. Epub 2009/03/24.
- Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 2005;191(2):318–25. Epub 2005/01/15.
- Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci* 2007;81(3):198–203. Epub 2007/06/19.
- Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic

- brain injury. *Free Radical Biol Med* 2008;45(4):443–52. Epub 2008/05/27.
- 25 Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K. Antioxidants in central nervous system diseases: pre-clinical promise and translational challenges. *J Alzheimer's Dis: JAD* 2008;15(3):473–93. Epub 2008/11/11.
  - 26 Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):172–88. Epub 2007/12/07.
  - 27 Augustyniak A, Waszkiewicz E, Skrzydlewska E. Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol. *Nutrition* 2005;21(9):925–32. Epub 2005/08/09.
  - 28 Miranda DD, Arcari DP, Pedrazzoli J, Jr., Carvalho Pde O, Cerutti SM, Bastos DH, et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis* 2008;23(4):261–5. Epub 2008/03/01.
  - 29 Flores MF, Martins A, Schimidt HL, Santos FW, Izquierdo I, Mello-Carpes PB, et al. Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging. *Neurochem Int* 2014;78:53–60. Epub 2014/09/10.
  - 30 Virmani A, Pinto L, Binienda Z, Ali S. Food, nutrigenomics, and neurodegeneration—neuroprotection by what you eat! *Mol Neurobiol* 2013;48(2):353–62. Epub 2013/07/03.
  - 31 Almajano MP, Carbó R, Jiménez JAL, Gordon MH. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem* 2008;108(1):55–63.
  - 32 Wang Y, Ho CT. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 2009;57(18):8109–14. Epub 2009/09/02.
  - 33 Satoh E, Tohyama N, Nishimura M. Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas. *Int J Food Sci Nutr* 2005;56(8):551–9. Epub 2006/04/28.
  - 34 Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003;133(10):3275S–84S. Epub 2003/10/02.
  - 35 Ramadan G, El-Beih NM, Abd El-Ghffar EA. Modulatory effects of black v. green tea aqueous extract on hyperglycaemia, hyperlipidaemia and liver dysfunction in diabetic and obese rat models. *Br J Nutr* 2009;102(11):1611–9. Epub 2009/10/15.
  - 36 Vinson JA, Zhang J. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. *J Agric Food Chem* 2005;53(9):3710–3. Epub 2005/04/28.
  - 37 Heber D, Zhang Y, Yang J, Ma JE, Henning SM, Li Z. Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets. *J Nutr* 2014;144(9):1385–93. Epub 2014/07/18.
  - 38 Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr* 2000;130(10):2409–12. Epub 2000/10/04.
  - 39 McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* 2002;21(1):1–13. Epub 2002/02/13.
  - 40 Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 2008;138(9):1677–83. Epub 2008/08/22.
  - 41 Uchiyama S, Taniguchi Y, Saka A, Yoshida A, Yajima H. Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition* 2011;27(3):287–92. Epub 2010/07/16.
  - 42 Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaud GM, Faine LA, et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 2006;44(7):1167–72. Epub 2006/03/07.
  - 43 Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19(6):1109–17. Epub 2011/02/19.
  - 44 Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004;20(2):218–24. Epub 2004/02/14.
  - 45 Bonini JS, Bevilacqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, et al. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Hormones Behav* 2006;50(2):308–13. Epub 2006/05/16.
  - 46 Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14(3):149–67. Epub 1985/08/01.
  - 47 Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-Garcia JM. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(6):2652–7. Epub 2010/02/06.
  - 48 Mello-Carpes PB, Izquierdo I. The nucleus of the solitary tract → nucleus paragigantocellularis → locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2013;100:56–63. Epub 2012/12/19.
  - 49 Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J-P, Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem* 2005;72(2):323–31.
  - 50 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(10):3170–5. Epub 1972/05/25.
  - 51 Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95. Epub 1961/07/01.
  - 52 Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70–6. Epub 1996/07/15.
  - 53 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. Epub 1976/05/07.
  - 54 Hashimoto T, Goto M, Sakakibara H, Oi N, Okamoto M, Kanazawa K. Yellow tea is more potent than other types of tea in suppressing liver toxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Phytotherapy Res* 2007;21(7):668–70. Epub 2007/04/21.
  - 55 Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(2):211–7. Epub 2006/01/13.
  - 56 Yang DJ, Hwang LS. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J Chromatogr A* 2006;1119(1–2):277–84. Epub 2006/01/04.
  - 57 Jeng KC, Chen CS, Fang YP, Hou RC, Chen YS. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh tea. *J Agric Food Chem* 2007;55(21):8787–92. Epub 2007/09/21.
  - 58 Van Der Lee S, Boot LM. Spontaneous pseudopregnancy in mice. II. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 1956;5(2):213–5. Epub 1956/12/01.
  - 59 Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15(6):1473–83. Epub 2007/06/15.
  - 60 Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997;68(3):285–316. Epub 1997/12/17.
  - 61 Baddeley A, Bueno O, Cahill L, Fuster JM, Izquierdo I, McGaugh JL, et al. The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(9):993–1002. Epub 2000/09/06.
  - 62 McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(6):208–10. Epub 2000/06/06.
  - 63 Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav* 2009;96(1):1–5. Epub 2008/08/23.
  - 64 Martins A, Schimidt HL, Garcia A, Colletta Altermann CD, Santos FW, Carpes FP, et al. Supplementation with different teas from *Camellia sinensis* prevents memory deficits and hippocampus oxidative stress in ischemia-reperfusion. *Neurochem Int* 2017;108:287–295. Epub 2017/05/04.
  - 65 Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2001;58(9):1395–402. Epub 2001/09/18.
  - 66 Mungas D, Jagust WJ, Reed BR, Kramer JH, Weiner MW, Schuff N, et al. MRI predictors of cognition in subcortical ischemic vascular disease and Alzheimer's disease. *Neurology* 2001;57(12):2229–35. Epub 2002/01/05.
  - 67 Walsh TJ, Emerich DF. The hippocampus as a common target of neurotoxic agents. *Toxicology* 1988;49(1):137–40. Epub 1988/04/01.
  - 68 Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, (eds.) *Free*

- radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press; 1989. p. 188–276.
- 69 Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radical Biol Med* 2013;65:254–61. Epub 2013/06/25.
  - 70 da Silveira CK, Furini CR, Benetti F, Monteiro Sda C, Izquierdo I. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2013;103:64–71. Epub 2013/04/16.
  - 71 Mandel S, Youdim MB. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biol Med* 2004;37(3):304–17. Epub 2004/06/30.
  - 72 Mandel S, Amit T, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(2):229–34. Epub 2006/02/14.
  - 73 Stefanello N, Schmatz R, Pereira LB, Rubin MA, da Rocha JB, Facco G, et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2014;388(1–2):277–86. Epub 2013/12/29.
  - 74 Kandinov B, Giladi N, Korczyn AD. Smoking and tea consumption delay onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(1):41–6. Epub 2008/04/25.
  - 75 Kim TI, Lee YK, Park SG, Choi IS, Ban JO, Park HK, et al. L-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates beta-amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF-kappaB pathways. *Free Radical Biol Med* 2009;47(11):1601–10. Epub 2009/09/22.
  - 76 Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Reznichenko L, Youdim MB. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurosci Ther* 2008;14(4):352–65. Epub 2008/12/02.
  - 77 Kang KS, Wen Y, Yamabe N, Fukui M, Bishop SC, Zhu BT. Dual beneficial effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on levodopa methylation and hippocampal neurodegeneration: in vitro and in vivo studies. *PLoS ONE* 2010;5(8):e11951. Epub 2010/08/12.
  - 78 Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes Nutr* 2009;4(4):283–96. Epub 2009/09/17.

MANUSCRITO 1

***Camellia sinensis* teas and cafeteria diet association on leptin levels and possible ovarian damage**

Melina Bucco Soares<sup>a</sup>, Cristiano Chiapinotto Spiazzi<sup>a</sup>, Juliana Bernera Ramalho<sup>a</sup>, Daniela Santos Brum<sup>a</sup>, Francielli Weber Santos<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

\*Correspondence should be sent to:

Francielli W Santos

Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

Phone: 55-55-3413-4321

FAX: 55-55-3413-4321

E-mail: [francielliweber@yahoo.com.br](mailto:francielliweber@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

Consumption of a palatable cafeteria diet is linked to overweight and obesity. Obesity, which has developed into a global epidemic, is a risk factor in most chronic diseases and these pathological conditions are associated with elevated markers of oxidative stress. In addition, it is known that obesity can negatively affect fertility and reproductive function in women. Thus, the use of natural compounds is an alternative to reduce the effects of obesity. Teas have already demonstrated several beneficial effects on health. In this study we evaluated the effect of a cafeteria diet (rich in fat and sugar) on histological parameters and oxidative stress in ovaries and leptin serum concentration, comparing the protective effect of different teas (red, white, black and green) (*Camellia sinensis*). We used Swiss mice, which received daily the cafeteria diet concomitant with either water or teas. After 8 weeks, animals were euthanized; blood was collected to determine leptin levels. In addition, ovaries were removed and analyzed for histology and oxidative stress (RS and FRAP). We found that the cafeteria diet led to hyperleptinemia and oxidative stress in ovary, but showed no histological alterations. Teas depicted partial beneficial effects. White, green and black teas restore FRAP while green, red and black teas partially reduced leptin increase. Therefore green and black teas showed better results in this study.

Key-Words: Cafeteria diet; obesity; ovary; leptin; stress oxidative; *Camellia sinensis*

## 1. INTRODUCTION

Currently, consumption of energy-rich foods and sedentarism, more common in Western population lifestyle, are directly linked to the current obesity epidemic (Berthoud, Lenard et al. 2011). Obesity is characterized by excessive accumulation of adipose tissue and has been linked to the development of cardiovascular and metabolic diseases (Fuster, Ouchi et al. 2016)

We recently demonstrated the relation of an obesity model and the induction of memory deficit in an object recognition test in females fed with cafeteria diet (Soares,

Ramalho et al. 2017). The cafeteria diet is palatable and can induce obesity and accelerate the development of ovarian follicles and the rate of follicle loss, leading to premature ovarian failure (Tschop and Heiman 2001; Wang, Luo et al. 2014). Sagae, Menezes et al. (2012) found that the cafeteria diet negatively affects female reproduction by reducing the number of oocytes and the thickness of the follicular layer.

Moreover, obesity is associated with greater risks for adverse health outcomes across the reproductive spectrum (Pelusi and Pasquali 2003; Yogev and Catalano 2009), including menstrual irregularity, endometrial pathology, infertility and early pregnancy loss (Bellver, Rossal et al. 2003; Bellver, Ayllon et al. 2010; Boots, Bernardi et al. 2014), also including hypertensive disorders, gestational diabetes, preterm birth, and rates of cesarean delivery (Knight, Kurinczuk et al. 2010).

Leptin is a peptide secreted and expressed by adipose tissue proportionally to body fat percentage and acts on the hypothalamus, controlling eating behavior. Therefore, leptin has a significant role in maintaining body's metabolism (Wasim, Awan et al. 2016). Dysregulation in leptin levels generates increased food intake and loss of satiety, events that result in obesity.

Peripherally, leptin is implicated in a broad range of physiological processes such as angiogenesis, hematopoiesis, wound healing, lipid and carbohydrate metabolism regulation (Baile, Della-Fera et al. 2000; Tucholski and Otto-Buczowska 2011) and increased generation of reactive oxygen species (RS) (Yamagishi, Edelstein et al. 2001; Beltowski, Wojcicka et al. 2003). Furthermore, a sufficient concentration of leptin is required for normal reproductive function. Leptin is associated with sexual maturation and advances the onset of puberty in rodents, through regulation of the reproductive axis during prepubertal and peripubertal stages (Elias and Purohit 2013). Leptin has been previously shown to be elevated in follicular fluid of obese women (Metwally, Li et al. 2007), indicating that systemic alterations associated with obesity can also affect the ovarian follicular environment (Dag and Dilbaz 2015)

A common issue in the pathogenesis of many obesity-associated diseases is oxidative stress (Matsuda and Shimomura 2014). There are several possible contributors to oxidative stress in obesity, including hyperglycemia, elevated tissue lipid levels, inadequate antioxidant defenses, increased rates of free radical formation, chronic inflammation, and hyperleptinemia (Vincent and Taylor 2006). In context, the antioxidant supplementation could contribute to ameliorate the damage induced by obesity. Natural

dietary components with antioxidant activity have received particular attention because of their role in modulating oxidative stress associated with aging and chronic conditions.

Tea is one of the most widely consumed beverages in the world, second only to water, and its medicinal properties have been widely explored. The tea plant, *Camellia sinensis*, is a member of the *Theaceae* family and can be divided into three types based on the method of processing its leaves, namely the non-fermented green and white teas, partially fermented oolong and red tea and fermented black tea (Horzic 2009).

Major polyphenolic compounds in tea include catechins, which are present in large amounts in green tea (Lee, Maliakal et al. 2002). They are mainly comprised of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), and (-)-epicatechin (EC). EGCG is the most abundant catechin in green tea and is believed to be the most pharmacologically active catechin (Wolfram, Wang et al. 2006). FALAR DIFERENCIAÇÃO CHAS

During the last decade, the effects of tea and tea polyphenols have been extensively investigated and studies have shown that tea is capable of lowering the risk of cardiovascular disease and cancers (Mukamal, MacDermott et al. 2007; Chen and Cheng 2008), reducing body weight and plasma levels of free triglycerides, cholesterol and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) (Lin and Lin-Shiau 2006), as well as exerting antioxidant and anti-aging effects (Duh 2004; Cooper, Morre et al. 2005).

The objective of this work was to evaluate the effect of a cafeteria diet on ovary of mice and leptin levels in plasma. In addition, compare the effect of different *Camellia sinensis* teas.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Chemicals**

2,4,6-Tri (2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ) and dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in this study were of analytical grade and they were obtained from standard commercial suppliers.

## **2.2.Herbal**

Commercial teas (Madrugada Alimentos Ltda, Venâncio Alves, RS, Brazil) were purchased from a local supermarket. Teas were administered in drinking water at a concentration of 1% (Uchiyama, Taniguchi et al., 2011), in which 1g of tea was weighed in 100 ml of water (95-100 ° C). After 10 minutes of infusion, the teas were filtered and administered at room temperature. Teas preparations were performed daily.

In order to evaluate the composition of each tea, we performed total phenolic content and total flavonoids

### **2.2.1.Determination of total polyphenols content**

Total polyphenols content (TP) of teas was measured by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method. The total polyphenol content was expressed as microgram of gallic acid equivalent per milliliter ( $\mu\text{g GAE/mL}$ ) (Singleton 1999)

### **2.2.2.Determination of flavonoids**

The determination of flavonoids followed the methodology proposed by (Woisky 1998). Quercetin at the concentrations of 2.5, 5, 7.5, 10 mg/mL was used as the standard for the construction of the calibration curve, with the flavonoid content expressed as  $\mu\text{g quercetin / mL}$  of tea.

## **2.3.Animals**

We use female Swiss mice (20 – 30 g) obtained from Federal University of Santa Maria vivarium (Santa Maria, Brazil). Animals were kept in an appropriate cabinet with forced air ventilation, in a 12-hour light/dark cycle, at a controlled room temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . This study was approved by Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pampa (Urugaiana, Brazil) (Protocol n° 024/2015).

## **2.4. Experimental procedure**

In order to induce characteristic parameters of obesity, we used a cafeteria diet. Cafeteria diet is highly palatable and highly caloric, rich in carbohydrate and fat (Sampey, Vanhoose et al. 2011). It consisted in the preparation of a feed containing: commercial rodent chow, peanuts, milk chocolate, and sweet biscuit in the proportion of 3:2:2:1, with all components powdered, mixed and pelleted (Estadella, Oyama et al. 2004; Soares, Ramalho et al. 2017).

Animals were divided according to the diet ingested. They received either a standard diet, consisting in a commercial rodent chow (Puro trato ®), or the cafeteria diet (CD), for 8 weeks of treatment (Burneiko, Diniz et al. 2006; Soares, Ramalho et al. 2017). Furthermore, the animals received orally water or tea (White, green, red or black).

Control: standard diet (SD) + Water

Cafeteria Diet: cafeteria diet (CD) + Water

CD + White tea: cafeteria diet (CD) + White tea

CD + Green tea: cafeteria diet (CD) + Green tea

CD + Red tea: cafeteria diet (CD) + Red tea

CD + Black tea: cafeteria diet (CD) + Black tea

At the end of the 8 weeks of treatment, mice were euthanized and blood samples were taken by cardiac puncture, and ovaries were removed. The right ovaries were weighed and homogenized in 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 (1/10, w/v) and centrifuged for 10 min at 3000g. The supernatant (S1) of the ovaries obtained were and used for reactive species (RS) and ferric reducing antioxidant potential (FRAP) analyzes. The left ovary was used for histological evaluation

### **2.4.1. Reactive Species (RS)**

The oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 488 nm excitation) 2h after the addition of DCHF-DA to the medium. The results were expressed as fluorescence units. The levels of the RS were determined by a spectrofluorimetric method, according Loetchutinat et al (2005) (Loetchutinat, Kothan et al. 2005)

### **2.4.2. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP)**

This assay is based on reduction capacity of ferric to ferrous ion at low pH resulting in a color complex ferrous-tripyridyltriazine. Readings of the colored product were then taken at 593 nm. A standard curve of ascorbic acid was used and results are expressed in  $\mu\text{g}$  equivalent of ascorbic acid. FRAP assay was done according to Benzie and Strain (1996).

### **2.4.3. Leptin Dosage**

The blood samples were centrifuged and the plasma obtained was used for determination of leptin by ELISA.

## **2.5. Histological evaluations**

For the evaluation of follicular viability, ovarian fragments were dehydrated in alcohol, cleared with xylene, embedded in paraffin and serially sectioned (5  $\mu\text{m}$ ). Every

section was mounted onto a glass slide and stained with periodic acid-Schiff (PAS)/hematoxylin. All sections were analyzed with an optical microscope (4000×; Binocular, Olympus CX31, Tokyo, Japan) by a single, experienced examiner. Follicles were classified as viable and non-viable, and the follicular quality was evaluated according to the method of Kim and Lee 2000 with respect to the basement membrane integrity, and the oocyte integrity, including the general aspects of the cytoplasm, the presence of granules, and the color.

## **2.5 Statistical analysis**

Data were checked for normality of distribution using the Shapiro-Wilk test.

Regarding oxidative stress tests, independent t-test was used to compare control and CD groups. Differences in treatments were analyzed using a one-way ANOVA followed by the Duncan test when necessary. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. The data are expressed as mean  $\pm$  SD.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Phenolic content and flavonoids**

The content of total phenols as well as total flavonoids are shown in Table 1. We have found that green teas have the highest amount of total phenols, followed by black, white and red tea. Green and black teas are the ones with the highest concentration of total flavonoids.

Table 1 - Content of phenolic compounds and flavonoids present in *Camellia sinensis* tea

	Total Phenols ( $\mu\text{g/mL}$ )	Total Flavonoids ( $\mu\text{g/mL}$ )
White tea	393.37	3.87
Green tea	710.8	5.66
Red tea	242.6	3.23
Black tea	449.7	5.66

### 3.2- Reactive Species

We observed a significant increase on RS levels in ovary of animals that received cafeteria diet (approximately 48%) in relation to animals fed with standard diet. All teas partially reverse this parameter altered by cafeteria diet (Figure 1).

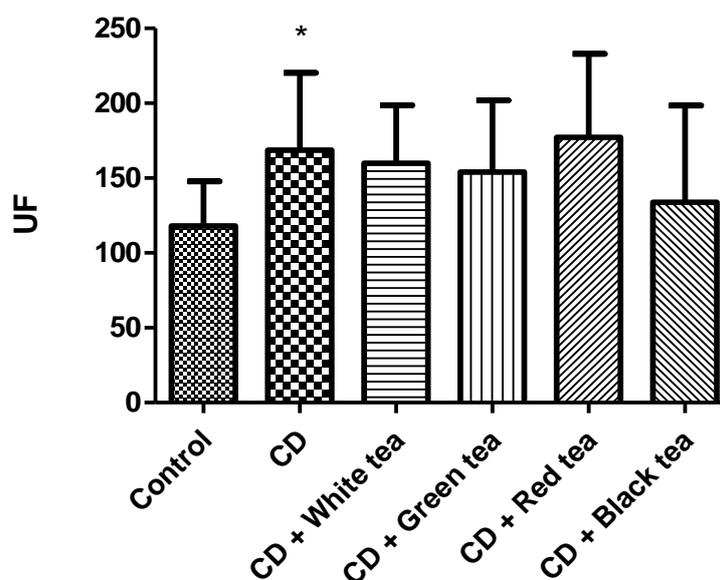


Figure 1. Effect of CD and teas on RS levels in mice ovary ( $n = 6$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.D. and expressed as UF. \* Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ).

### 3.3 FRAP

Animals that received cafeteria diet for 8 weeks showed a decrease in FRAP (20.4%) on ovary compared to the control group. White, green and black teas restored FRAP to control levels (Figure 2).

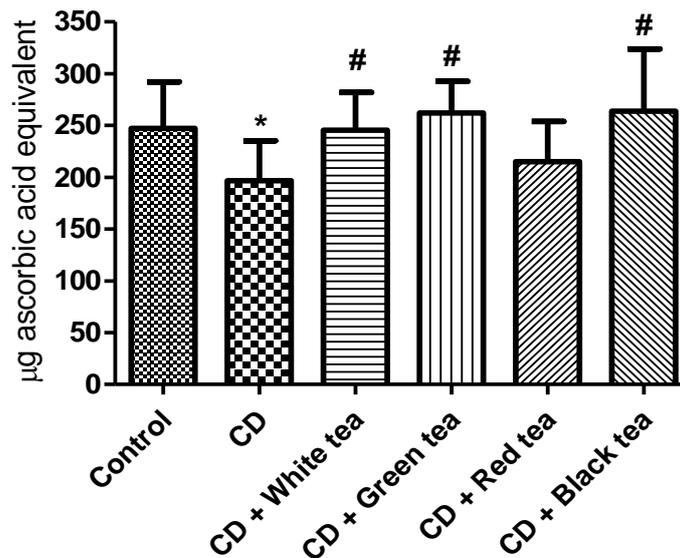


Figure 2. Effects of CD and teas on FRAP in mice ovary (n = 6). Data are reported as mean  $\pm$  S.D and expressed as  $\mu\text{g}$  ascorbic acid equivalent. \* Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), # significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ).

### 3.4 Leptin

The leptin levels were 8-fold higher in the mice that received cafeteria diet in plasm, compared to the control group. Green, red and black teas partially reduces leptin levels (Figure 3).

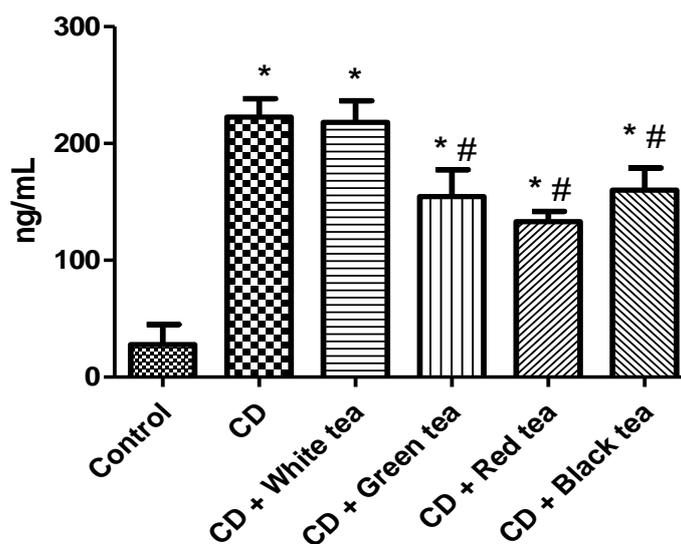


Figure 3 - Effect of CD and tea on plasma leptin levels of mice after 8 weeks of treatment. (n = 4). Data are reported as mean  $\pm$  S.D. and expressed as ng/mL. \* Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), # significantly different from CD group ( $P < 0.05$ ).

### 3.5 Histology

In Figure 4, we observed the cortical region of the ovary, with different stages follicles. Morphologically normal follicles and corpus luteum, with a round oocyte surrounded by well-organized granulosa cells and integral nucleus; the surface of the ovary is covered by a layer of cuboidal cells, the germinal epithelium. There was no histological change in cafeteria diet group compared to control group. These results demonstrate that the cafeteria diet for 8 weeks did not cause damage on ovary histology (Figure 4). Teas did not present effect on ovarian tissue.

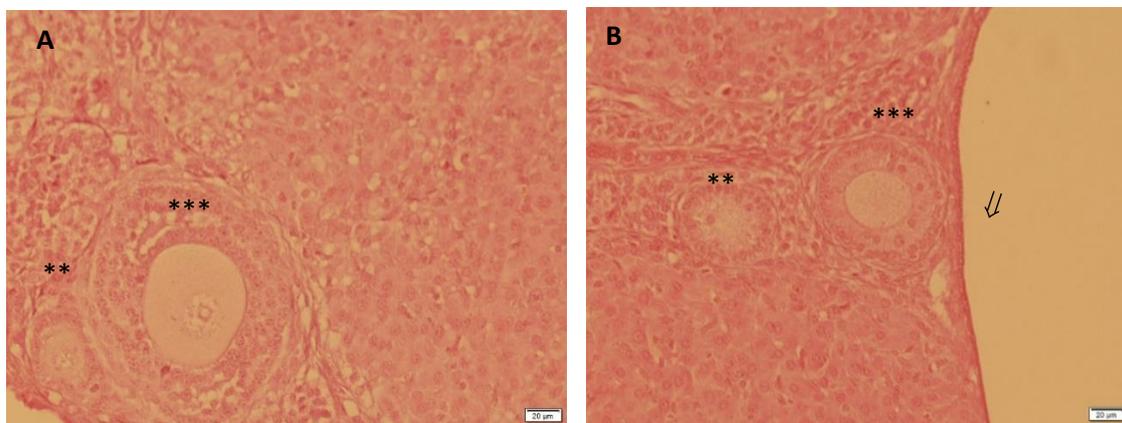


Figure – 4 Histological structure of mouse ovary with different follicles (Primordial follicles\*, primary follicles\*\*, secondary follicles \*\*\*in the cortex. the germinal epithelium (⇓) (4000×). A – Control; B – Cafeteria diet

## 4 DISCUSSION

In a previous study, we demonstrated that the cafeteria diet induces obesity characteristics, such as increased biochemical parameters (glucose, cholesterol and triglycerides), weight gain and fat accumulation (Soares, Ramalho et al. 2017). In the present work, we hypothesize a possible relationship between increased leptin levels and ovarian damage. We found that 8 weeks intake of cafeteria diet increased leptin levels in blood (about 8-fold), in addition to altering oxidative stress in ovary of mice. Green, red and black teas partially decreased hyperleptinemia.

Plasma concentration of leptin tends to be increased in most obese individuals and positively correlated with total body fat (Maffei, Halaas et al. 1995; Considine, Sinha et al. 1996). A large number of studies demonstrated that most individuals with diet induced

obesity manifest leptin resistance characterized by increased leptin levels in blood and decreased leptin sensitivity, which is proportional to the individual's adipose mass and BMI (Considine, Sinha et al. 1996; Morrison 2008; Morris and Rui 2009; Guzman-Ruiz, Stucchi et al. 2012). Our obesity animal model presented an increase in weight, fat accumulation and, consequently, high levels of leptin, corroborating with other studies (Soares, Ramalho et al. 2017).

Fat tissue is an endocrine organ required for energy homeostasis. It secretes adipokines, such as leptin, which induces the production of ROS and increases oxidative stress in obesity (Marseglia, Manti et al. 2014). In our study, we found that, in addition to hyperleptinemia, ROS was increased and there was a reduction of antioxidant potential in ovary. Skaznik-Wikiel, Swindle et al. (2016) observed that a diet-induced obesity resulted in increased immune cell infiltration, and increased oxidative stress marker in ovaries of obese mice, suggesting an important link between obesity, potentially generated due to a high-fat diet exposure, and abnormal inflammatory responses in the ovary.

Obesity is associated with impaired fertility, primarily owing to disorders of the reproductive hormonal profile. Evidence has also emerged indicating a potential direct role of leptin in regulating mammalian ovarian function as well as oocyte and preimplantation embryo development (Kawwass, Summer et al. 2015). Although we verified alterations on oxidative status of ovarian tissue after 8 weeks of cafeteria diet intake, we did not observe significant alterations on ovarian histology. Other authors also did not observe changes in ovarian morphology in high-fat diet group even after 15 weeks of treatment; however an effect was observed after 20 weeks of diet (Wu, Zhang et al. 2015). It is probable that the oxidative status alterations observed in ovarian tissue could be a predictor event before morphological alterations. In fact, we could not discard that, in this stage, there is no impairment of ovarian function.

Moreover, it has been demonstrated that antioxidant supplementation could reduce oxidative stress, decrease the risk of complications related to obesity, and restore expression of adipokines (Furukawa, Fujita et al. 2004). Recently we have shown that teas were effective in improving the cognitive deficit induced by the cafeteria diet, and green tea seems to have been the most effective. In this study, green and black teas were partially effective in restoring damage induced by cafeteria diet. We believe that its main protective effects happens due to its phenolic composition, since these teas presented the highest amount of phenols and total flavonoids. In addition, in our previous study (Soares,

Ramalho et al. 2017) we have analyzed the composition of catechins by HPLC, in which green tea presented the highest amount. Regarding black tea, catechin content is reduced due to a fermentation process as a result of polymerisation into theaflavin and thearubigins (Dufresne and Farnworth 2001).

In this study, we observed important alterations on leptin levels and ovarian RS production after cafeteria diet intake for 8 weeks. In addition, teas, especially green and black, could mitigate the effects induced by this diet. We expected that after 8 weeks of diet, there would be histological alteration in ovaries, as shown by some authors. However there are differences between treatment time and also in diet compositions. Although we did not observe significant follicular changes, we can not rule out the hypothesis of reproductive alterations, since fertility problems can take place even without histological alteration. More studies are needed to investigate possible changes in female reproductive system after cafeteria diet consumption.

## 5 REFERÊNCIAS

Baile, C. A., M. A. Della-Fera, et al. (2000). "Regulation of metabolism and body fat mass by leptin." Annu Rev Nutr **20**: 105-127.

Bellver, J., Y. Ayllon, et al. (2010). "Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality." Fertil Steril **93**(2): 447-454.

Bellver, J., L. P. Rossal, et al. (2003). "Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation." Fertil Steril **79**(5): 1136-1140.

Beltowski, J., G. Wojcicka, et al. (2003). "Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia." Atherosclerosis **170**(1): 21-29.

Benzie, I. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." Anal Biochem **239**(1): 70-76.

Berthoud, H. R., N. R. Lenard, et al. (2011). "Food reward, hyperphagia, and obesity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **300**(6): R1266-1277.

Boots, C. E., L. A. Bernardi, et al. (2014). "Frequency of euploid miscarriage is increased in obese women with recurrent early pregnancy loss." Fertil Steril **102**(2): 455-459.

Burneiko, R. C., Y. S. Diniz, et al. (2006). "Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses." Food Chem Toxicol **44**(7): 1167-1172.

Chen, W. Q. and Y. Y. Cheng (2008). "[Progress in studies of green tea polyphenols on neurodegenerative diseases]." Sheng Li Ke Xue Jin Zhan **39**(4): 355-358.

Considine, R. V., M. K. Sinha, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." N Engl J Med **334**(5): 292-295.

Cooper, R., D. J. Morre, et al. (2005). "Medicinal benefits of green tea: part II. review of anticancer properties." J Altern Complement Med **11**(4): 639-652.

Dag, Z. O. and B. Dilbaz (2015). "Impact of obesity on infertility in women." J Turk Ger Gynecol Assoc **16**(2): 111-117.

Dufresne, C. J. and E. R. Farnworth (2001). "A review of latest research findings on the health promotion properties of tea." J Nutr Biochem **12**(7): 404-421.

Duh, P. D. Y., G.C.; Yen, W.J.; Wang, B.S.; Chang, L.W. (2004). "Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. ." J Agric Food Chem **52**: 8169-8176.

Elias, C. F. and D. Purohit (2013). "Leptin signaling and circuits in puberty and fertility." Cell Mol Life Sci **70**(5): 841-862.

Estadella, D., L. M. Oyama, et al. (2004). "Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats." Nutrition **20**(2): 218-224.

Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.

Fuster, J. J., N. Ouchi, et al. (2016). "Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease." Circ Res **118**(11): 1786-1807.

Guzman-Ruiz, R., P. Stucchi, et al. (2012). "Leptin drives fat distribution during diet-induced obesity in mice." Endocrinol Nutr **59**(6): 354-361.

Horzic, D. K., D.; Belščak, A.; Ganić, K.K.; Iveković, D.; Karlović, D. (2009). "The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions." Food Chem. **115**: 441-448.

Kawwass, J. F., R. Summer, et al. (2015). "Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: a critical review." Mol Hum Reprod **21**(8): 617-632.

Kim, J. K. and C. J. Lee (2000). "Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse." Mutat Res **449**(1-2): 33-39.

Knight, M., J. J. Kurinczuk, et al. (2010). "Extreme obesity in pregnancy in the United Kingdom." Obstet Gynecol **115**(5): 989-997.

Lee, M. J., P. Maliakal, et al. (2002). "Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different

metabolites and individual variability." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(10 Pt 1): 1025-1032.

Lin, J. K. and S. Y. Lin-Shiau (2006). "Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols." Mol Nutr Food Res **50**(2): 211-217.

Loetchutinat, C., S. Kothan, et al. (2005). "Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay." Radiation Physics and Chemistry **72**(2): 323-331.

Maffei, M., J. Halaas, et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." Nat Med **1**(11): 1155-1161.

Marseglia, L., S. Manti, et al. (2014). "Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases." Int J Mol Sci **16**(1): 378-400.

Matsuda, M. and I. Shimomura (2014). "Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases." Rev Endocr Metab Disord **15**(1): 1-10.

Metwally, M., T. C. Li, et al. (2007). "The impact of obesity on female reproductive function." Obes Rev **8**(6): 515-523.

Morris, D. L. and L. Rui (2009). "Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(6): E1247-1259.

Morrison, C. D. (2008). "Leptin resistance and the response to positive energy balance." Physiol Behav **94**(5): 660-663.

Mukamal, K. J., K. MacDermott, et al. (2007). "A 6-month randomized pilot study of black tea and cardiovascular risk factors." Am Heart J **154**(4): 724 e721-726.

Pelusi, C. and R. Pasquali (2003). "Polycystic ovary syndrome in adolescents: pathophysiology and treatment implications." Treat Endocrinol **2**(4): 215-230.

Sagae, S. C., E. F. Menezes, et al. (2012). "Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats." Physiol Behav **105**(5): 1104-1111.

Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." Obesity (Silver Spring) **19**(6): 1109-1117.

Singleton, V. L. O., R.; Lamuela-Raventós, R.M. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent." Methods Enzymology. : 152-178.

Skaznik-Wikiel, M. E., D. C. Swindle, et al. (2016). "High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice." Biol Reprod **94**(5): 108.

Soares, M. B., J. B. Ramalho, et al. (2017). "Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet." Nutr Neurosci: 1-10.

Tschop, M. and M. L. Heiman (2001). "Rodent obesity models: an overview." Exp Clin Endocrinol Diabetes **109**(6): 307-319.

Tucholski, K. and E. Otto-Buczkowska (2011). "The role of leptin in the regulation of carbohydrate metabolism." Endokrynol Pol **62**(3): 258-262.

Vincent, H. K. and A. G. Taylor (2006). "Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans." Int J Obes (Lond) **30**(3): 400-418.

Wang, N., L. L. Luo, et al. (2014). "Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats." Metabolism **63**(1): 94-103.

Wasim, M., F. R. Awan, et al. (2016). "Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity." Biochem Genet **54**(5): 565-572.

Woisky, R. G. S., A. (1998). "Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control." J. Apic. Res. **37**(2): 99-105.

Wolfram, S., Y. Wang, et al. (2006). "Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench." Mol Nutr Food Res **50**(2): 176-187.

Wu, Y., Z. Zhang, et al. (2015). "High fat diet triggers cell cycle arrest and excessive apoptosis of granulosa cells during the follicular development." Biochemical and Biophysical Research Communications **466**(3): 599-605.

Yamagishi, S. I., D. Edelstein, et al. (2001). "Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A." J Biol Chem **276**(27): 25096-25100.

Yogev, Y. and P. M. Catalano (2009). "Pregnancy and obesity." Obstet Gynecol Clin North Am **36**(2): 285-300, viii.

## 5. DISCUSSÃO DOS ARTIGOS

As mudanças no estilo de vida e alimentação ao longo dos anos tem mudado o perfil metabólico da população mundial. A ingestão de dietas hipercalóricas, ricas em gordura e açúcar associado ao sedentarismo resultou em um aumento significativo na incidência de doenças associadas, como o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer (Eckel, Grundy et al. 2005; Galassi, Reynolds et al. 2006). As alterações provocadas pelo consumo de dietas hipercalóricas ainda não estão totalmente elucidadas. Alguns estudos destacam que este tipo de dieta poderia alterar o desempenho normal do metabolismo, afetando o funcionamento adequado do organismo.

Nesse trabalho, nós verificamos o consumo da dieta de uma cafeteria por 8 semanas afim de induzir obesidade em camundongas e analisamos o efeito da mesma sobre hipocampo, ovário e parâmetros bioquímicos. Além disso, analisamos o efeito protetor de diferentes chás provenientes da *Camellia sinensis* (verde, branco, vermelho e preto). A dieta utilizada induziu obesidade nos animais, verificado pelo aumento nos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos, acúmulo de gordura e aumento de peso.

A obesidade está associada com diversas doenças, estando fortemente ligada a alterações comportamentais e de memória. Estudos evidenciaram que animais alimentados com dietas hiperlipídicas apresentaram pior desempenho em testes de aprendizado e memória (Carillon, Romain et al. 2013; Setti, Littlefield et al. 2015). Verificamos que os animais obesos apresentaram déficit de memória, alteração da atividade da acetilcolinesterase e estresse oxidativo. Sabe-se que a obesidade induzida por DC está associada ao aumento do estresse oxidativo (Carillon, Romain et al. 2013), cuja causa permanece obscura, mas pode estar relacionado ao acúmulo de metabólitos tóxicos que levam à produção excessiva de RL ou a redução de defesas antioxidantes celulares. Os danos oxidativos observados no hipocampo, evidenciados por aumento dos níveis de ROS e atividade de SOD, pode contribuir ao comprometimento do aprendizado e da memória (da Silveira, Furini et al. 2013)

O tecido adiposo produz uma série de substâncias denominadas adipocinas, dentre elas a leptina (Bulcao, Ferreira et al. 2006). A leptina está elevada em mulheres obesas estando associada com piora da fecundidade (Brewer and Balen 2010) sendo que observações clínicas têm sugerido que existe uma forte relação entre a adiposidade e a

infertilidade feminina (Bolumar, Olsen et al. 2000; Pasquali, Pelusi et al. 2003). No nosso estudo, apesar de verificarmos um grande aumento na concentração de leptina e estresse oxidativo em ovários, não notamos alterações na viabilidade folicular analisada por histologia. Estudos já demonstraram que a dieta hipercalórica afeta a reprodução, afetando a viabilidade dos folículos, no entanto, esses trabalhos, utilizaram uma composição de dieta diferente da nossa e os animais receberam a dieta por um período superior ao utilizado no nosso estudo. Wu e colaboradores (2015) não observaram alterações histológicas em ovário com 15 semanas de tratamento, sendo que alterações só foram observadas após 20 semanas Wu, Zhang et al. (2015). Apesar disso, não podemos afirmar que a dieta de cafeteria, consumida por 8 semanas não afeta a reprodução, já que não testamos outros parâmetros, como receptividade sexual, taxa de fecundação e número de conceptos.

A busca por compostos ou alimentos funcionais para prevenir os danos ocasionados pela ingestão alimentar inadequada tem ganhado destaque. Os chás acabaram tornando-se a segunda bebida mais consumida no mundo, não só pelo seu sabor e aroma, mas também devido aos efeitos benéficos já demonstrados (Kodama 2010). Neste estudo, verificamos os efeitos de diferentes chás (branco, verde, vermelho e preto) obtidos da planta *Camellia sinensis*, frente a danos causados pela dieta de cafeteria. Os chás contêm muitas substâncias, tais como catequinas e outros polifenóis (Moriyama 2008), que parecem ser eficazes para a prevenção de diversas doenças (Basu and Lucas 2007; Bolling, Chen et al. 2009). Existem três tipos de chás obtidos da planta *Camellia sinensis*: não fermentados (chá branco e verde), parcialmente fermentados (Chá vermelho e oolong) e completamente fermentados (chá preto) (Almajano, Carbó et al. 2008). Considerando-se estas diferenças no processamento, cada chá apresenta diferenças no sabor, aspecto, propriedades antioxidantes. Essas mudanças estão relacionadas às diferentes concentrações de polifenóis (Paganini-Costa 2011).

Em relação aos chás estudados (branco, verde, vermelho e preto), vimos diferentes resultados entre eles. Levando-se em conta o conjunto de resultados obtidos, o chá verde, parece ser o que apresenta efeito benéfico melhor, uma vez que o consumo desse chá acabou revertendo um maior número de parâmetros alterados pela dieta de cafeteria em comparação aos demais chás.

## 6. CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo, podemos concluir, que a utilização da dieta de cafeteria durante 8 semanas, ocasionou alterações de parâmetros bioquímicos, acúmulo de gordura e ganho de peso, sendo um modelo eficaz na indução da obesidade. A obesidade acabou gerando déficit de memória em camundongas, alteração da atividade da acetilcolinesterase e estresse oxidativo, tanto em hipocampo quanto em ovário. Além disso, vimos um exacerbado aumento nos níveis de leptina no plasma.

Nós verificamos diferentes efeitos entre os parâmetros analisados, entre os chás testados. Em alguns aspectos os 4 chás testados foram eficazes em restaurar total (atividade da AchE) ou parcialmente (acúmulo de gordura) os danos causados pela dieta de cafeteria. Os chás verde e vermelho reduziram o déficit de memória. Os chás branco, verde e preto reduzem os níveis ER em hipocampo, além disso, restauram FRAP em ovário, demonstrando efeito antioxidante. Com relação aos níveis de leptina os chás verde, vermelho e preto reduzem parcialmente os níveis aumentados pelo consumo da DC.

De acordo, com os resultados obtidos nessa tese, podemos verificar que o chá verde foi o que apresentou o melhor efeito nos diversos parâmetros analisados. Acreditamos que sua composição rica em fenóis, flavonoides e catequinas, acaba tornando-o o mais eficaz.

## 7. REFERÊNCIAS

Abildgaard, A., L. Solskov, et al. (2011). "A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression." Psychoneuroendocrinology **36**(5): 623-633.

Agarwal, S. K., K. Vogel, et al. (1999). "Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary." J Clin Endocrinol Metab **84**(3): 1072-1076.

Ahima, R. S. (2006). "Adipose tissue as an endocrine organ." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 242S-249S.

Almajano, M. P., R. Carbó, et al. (2008). "Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions." Food Chemistry **108**(1): 55-63.

Alosco, M. L. and J. Gunstad (2014). "The negative effects of obesity and poor glycemic control on cognitive function: a proposed model for possible mechanisms." Curr Diab Rep **14**(6): 495.

Anderson, D. (1996). "Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic other damage." Mutation Research **350**(1): 103-108.

Andres, R. H., A. D. Ducray, et al. (2008). "Functions and effects of creatine in the central nervous system." Brain Res Bull **76**(4): 329-343.

Anghileri, L. J. T., P. (2000). "Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance." Biol Trace Elem Res **73**: 251-258.

Auvichayapat, P., M. Prapochanung, et al. (2008). "Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial." Physiol Behav **93**(3): 486-491.

Bado, A., S. Levasseur, et al. (1998). "The stomach is a source of leptin." Nature **394**(6695): 790-793.

Bailey, C. J., P. R. Flatt, et al. (1986). "Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets." Acta Endocrinol (Copenh) **112**(2): 224-229.

Baker, J. L., L. W. Olsen, et al. (2007). "Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood." N Engl J Med **357**(23): 2329-2337.

Balentine, D. A., S. A. Wiseman, et al. (1997). "The chemistry of tea flavonoids." Crit Rev Food Sci Nutr **37**(8): 693-704.

Banks, W. A., A. B. Coon, et al. (2004). "Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier." Diabetes **53**(5): 1253-1260.

Banks, W. A., S. A. Farr, et al. (2006). "The effects of high fat diets on the blood-brain barrier transport of leptin: failure or adaptation?" Physiol Behav **88**(3): 244-248.

Barnard, R. J., J. H. Gonzalez, et al. (2006). "Effects of a low-fat, high-fiber diet and exercise program on breast cancer risk factors in vivo and tumor cell growth and apoptosis in vitro." Nutr Cancer **55**(1): 28-34.

- Basu, A. and E. A. Lucas (2007). "Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health." Nutr Rev **65**(8 Pt 1): 361-375.
- Bayol, S. A., B. H. Simbi, et al. (2010). "A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring." Endocrinology **151**(4): 1451-1461.
- Becker, E. S., M. Rinck, et al. (2001). "The emotional Stroop effect in anxiety disorders: general emotional or disorder specificity?" J Anxiety Disord **15**(3): 147-159.
- Bellver, J., A. Mifsud, et al. (2013). "Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study." Hum Reprod **28**(3): 794-800.
- Benito-Leon, J., A. J. Mitchell, et al. (2013). "Obesity and impaired cognitive functioning in the elderly: a population-based cross-sectional study (NEDICES)." Eur J Neurol **20**(6): 899-906, e876-897.
- Berthoud, H. R. and C. Morrison (2008). "The brain, appetite, and obesity." Annu Rev Psychol **59**: 55-92.
- Billington, C. J., J. E. Briggs, et al. (1991). "Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism." Am J Physiol **260**(2 Pt 2): R321-327.
- Bjorntorp, P. (1996). "[The fat should be located in body regions on which we sit]." Lakartidningen **93**(1-2): 33-35.
- Bjorntorp, P. (1997). "Hormonal control of regional fat distribution." Hum Reprod **12 Suppl 1**: 21-25.
- Bode, A. M. D., Z. (2009). "Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: united they work, divided they fail." Cancer Prevention Research **6**(2): 514-517.
- Bohler, H., Jr., S. Mokshagundam, et al. (2010). "Adipose tissue and reproduction in women." Fertil Steril **94**(3): 795-825.
- Bolling, B. W., C. Y. Chen, et al. (2009). "Tea and health: preventive and therapeutic usefulness in the elderly?" Curr Opin Clin Nutr Metab Care **12**(1): 42-48.
- Bolumar, F., J. Olsen, et al. (2000). "Body mass index and delayed conception: a European Multicenter Study on Infertility and Subfecundity." Am J Epidemiol **151**(11): 1072-1079.
- Bonini, J. S., L. R. Bevilaqua, et al. (2006). "Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval." Horm Behav **50**(2): 308-313.
- Bonini, J. S., W. C. Da Silva, et al. (2007). "On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory." Neuroscience **147**(1): 37-45.
- Bonnes, T. G., T. I (1992). "Is malonaldehyde a valuable of peroxidation." Biochemical Pharmacology **44**(5): 985-988.
- Brasil, V. B. (2017). Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão.
- Bravo, L. (1998). " Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. ." Nutrition **56**(11): 317-333.

- Brewer, C. J. and A. H. Balen (2010). "The adverse effects of obesity on conception and implantation." Reproduction **140**(3): 347-364.
- Broekmans, F. J., D. de Ziegler, et al. (2010). "The antral follicle count: practical recommendations for better standardization." Fertil Steril **94**(3): 1044-1051.
- Bruce-Keller, A. J., J. N. Keller, et al. (2009). "Obesity and vulnerability of the CNS." Biochim Biophys Acta **1792**(5): 395-400.
- Bulcao, C., S. R. Ferreira, et al. (2006). "The new adipose tissue and adipocytokines." Curr Diabetes Rev **2**(1): 19-28.
- Bullo, M., P. Casas-Agustench, et al. (2007). "Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet." Public Health Nutr **10**(10A): 1164-1172.
- Butzow, T. L., J. M. Moilanen, et al. (1999). "Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response." J Clin Endocrinol Metab **84**(9): 3135-3139.
- Cabrera, C., R. Gimenez, et al. (2003). "Determination of tea components with antioxidant activity." J Agric Food Chem **51**(15): 4427-4435.
- Cai, G., S. A. Cole, et al. (2008). "A genetic contribution to circulating cytokines and obesity in children." Cytokine **44**(2): 242-247.
- Calixto, J. B., C. Scheidt, et al. (2001). "Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs." Expert Opin Emerg Drugs **6**(2): 261-279.
- Cammarota, M., L. R. M. Bevilaqua, et al. (2007). Studies of Short-Term Avoidance Memory. Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging. F. Bermudez-Rattoni. Boca Raton (FL).
- Camouse, M. M. D., D.S.; Swain, F.R.; Conrad, E.P.; Matsui, M.S.; Maes, D.; Declercq, L.; Cooper, K.D.; Stevens, S.R.; Baron, E.D. (2009). "Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin." Exp. Dermatol **18**: 522-526.
- Campion, J., F. I. Milagro, et al. (2006). "Differential gene expression and adiposity reduction induced by ascorbic acid supplementation in a cafeteria model of obesity." J Physiol Biochem **62**(2): 71-80.
- Cardenas-Rodriguez, N., E. Coballase-Urrutia, et al. (2013). "Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models." Oxid Med Cell Longev **2013**: 598493.
- Carillon, J., C. Romain, et al. (2013). "Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase." Free Radic Biol Med **65**: 254-261.
- Castillo-Martinez, L., J. C. Lopez-Alvarenga, et al. (2003). "Menstrual cycle length disorders in 18- to 40-y-old obese women." Nutrition **19**(4): 317-320.
- Cesaretti, M. L. and O. Kohlmann Junior (2006). "[Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned]." Arq Bras Endocrinol Metabol **50**(2): 190-197.

- Chakravarthy, M. V. and F. W. Booth (2004). "Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases." J Appl Physiol (1985) **96**(1): 3-10.
- Chaput, J. P., L. Klingenberg, et al. (2011). "Modern sedentary activities promote overconsumption of food in our current obesogenic environment." Obes Rev **12**(5): e12-20.
- Chen, M., W. Gu, et al. (1999). "[Dynamic effect of the blood glucose and insulin on serum leptin concentration during oral glucose tolerance test]." Zhonghua Nei Ke Za Zhi **38**(11): 740-743.
- Chen, X. K., L.; Su, X.; Fu, H.; Ni, J.; Zhao, R.; Zou, H. (2004). "Separation and identification of compounds in *Rhizoma chuanxiong* by comprehensive twodimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1040**: 169-178.
- Chen, X. L., D. B. Hausman, et al. (1998). "Hormonal regulation of leptin mRNA expression and preadipocyte recruitment and differentiation in porcine primary cultures of S-V cells." Obes Res **6**(2): 164-172.
- Cheung, C. C., J. E. Thornton, et al. (1997). "Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat." Endocrinology **138**(2): 855-858.
- Choi, S. W., I. F. Benzie, et al. (2008). "Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect?" Free Radic Biol Med **44**(7): 1217-1231.
- Choo, J. J. (2003). "Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through beta-adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue." J Nutr Biochem **14**(11): 671-676.
- Chung, F. L., J. Schwartz, et al. (2003). "Tea and cancer prevention: studies in animals and humans." J Nutr **133**(10): 3268S-3274S.
- Clark, A. M., B. Thornley, et al. (1998). "Weight loss in obese infertile women results in improvement in reproductive outcome for all forms of fertility treatment." Hum Reprod **13**(6): 1502-1505.
- Cobayashi, F., F. L. Oliveira, et al. (2010). "Obesity and cardiovascular risk factors in adolescents attending public schools." Arq Bras Cardiol **95**(2): 200-205.
- Considine, R. V. C., E. L.; Williams, C. J.; Hyde, T. M.; Caro, J. F. (1996). "The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations." Diabetes **45**(7): 992-994.
- Cook, N. C. S., S. (1996). "Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources." The Journal of Nutrition Biochemistry **7**(2): 66-76.
- Cooper, R., D. J. Morre, et al. (2005). "Medicinal benefits of green tea: part II. review of anticancer properties." J Altern Complement Med **11**(4): 639-652.
- Costa, R. F., P. Cintra Ide, et al. (2006). "[Prevalence of overweight and obesity in school children of Santos city, Brazil]." Arq Bras Endocrinol Metabol **50**(1): 60-67.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, et al. (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." Nature **411**(6836): 480-484.

- Crowe, S., S. M. Turpin, et al. (2008). "Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity." Endocrinology **149**(5): 2546-2556.
- da Silveira, C. K., C. R. Furini, et al. (2013). "The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory." Neurobiol Learn Mem **103**: 64-71.
- Davidson, T. L., S. L. Hargrave, et al. (2013). "Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function." Neuroscience **253**: 110-122.
- Davidson, T. L., A. Monnot, et al. (2012). "The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats." Physiol Behav **107**(1): 26-33.
- de Farias, J. M., K. F. Bom, et al. (2013). "Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis." Horm Metab Res **45**(3): 190-196.
- de la Monte, S. M., L. Longato, et al. (2009). "Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis." Curr Opin Investig Drugs **10**(10): 1049-1060.
- de Mejia, E. G. R.-M., M.V.; Puangraphants, S. (2009). "Bioactive omponents of tea: Cancer, inflammation and behavior." Brain, Behavior, and Immunity **23**(6): 721-731.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-887.
- Devine, A., J. M. Hodgson, et al. (2007). "Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women." Am J Clin Nutr **86**(4): 1243-1247.
- Dinel, A. L., C. Andre, et al. (2011). "Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome." PLoS One **6**(9): e24325.
- Dokras, A., L. Baredziak, et al. (2006). "Obstetric outcomes after in vitro fertilization in obese and morbidly obese women." Obstet Gynecol **108**(1): 61-69.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Duggal, P. S., K. H. Van Der Hoek, et al. (2000). "The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat." Endocrinology **141**(6): 1971-1976.
- Duh, P. D. Y., G.C.; Yen, W.J.; Wang, B.S.; Chang, L.W. (2004). "Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. ." J Agric Food Chem **52**: 8169-8176.
- Dulloo, A. G., C. Duret, et al. (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**(6): 1040-1045.
- Dulloo, A. G., J. Jacquet, et al. (2010). "Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome." Int J Obes (Lond) **34** Suppl 2: S4-17.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, et al. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet **365**(9468): 1415-1428.
- Eikelis, N., M. Schlaich, et al. (2003). "Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system." Hypertension **41**(5): 1072-1079.

- Elahi, M. M., F. R. Cagampang, et al. (2009). "Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice." Br J Nutr **102**(4): 514-519.
- Elias, C. F. and D. Purohit (2013). "Leptin signaling and circuits in puberty and fertility." Cell Mol Life Sci **70**(5): 841-862.
- Engelhardt, U. H. (2010). Comprehensive Natural Products II.
- Esposito, K. and D. Giugliano (2005). "Obesity, the metabolic syndrome, and sexual dysfunction." Int J Impot Res **17**(5): 391-398.
- Faller, A. L. K. F., E. (2009). "Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil." Revista de Saúde Pública **43**(2): 211-218.
- Fang, Z. B., B. (2010). "Encapsulation of polyphenols – a review." Trends in Food Science & Technology **21**: 510-523.
- Fernández-Cáceres, P. L. M., M.J.; Pablos, F.; González, A.G.D. (2001). "Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(10): 4775-4779.
- Freeman, M. E. (1994). "The ovarian cycle of the rat." The Physiology of Reproduction: 613-657.
- Freitas, H. C. P. N., F. (2007). "O chá verde induz o emagrecimento e auxilia no tratamento da obesidade e suas comorbidades." Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento **1**(2): 16-23.
- Frisch, R. E. and J. W. McArthur (1974). "Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset." Science **185**(4155): 949-951.
- Fu, H. H., J.; Mei, F.; Zhang, Q.; Hara, Y.; Ryota, S.; Lubet, R. A.; Chen, R.; Chen, D. R.; You, M. L. (2007). "Lung cancer inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate is dependent on its presence in a complex mixture (polyphenon E)." Cancer Prevention Research **2**: 531–537.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.
- Galassi, A., K. Reynolds, et al. (2006). "Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis." Am J Med **119**(10): 812-819.
- Galic, S., J. S. Oakhill, et al. (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 129-139.
- Galioto, R. M., M. L. Alosco, et al. (2013). "Cognitive reserve preserves cognitive function in obese individuals." Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn **20**(6): 684-699.
- Girard, J. and M. Lafontan (2008). "Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism." Diabetes Metab **34**(5): 439-445.
- Gletsu-Miller, N., J. M. Hansen, et al. (2009). "Loss of total and visceral adipose tissue mass predicts decreases in oxidative stress after weight-loss surgery." Obesity (Silver Spring) **17**(3): 439-446.

- Glick, Z., S. Yamini, et al. (1990). "Estrous cycle irregularities in overfed rats." Physiol Behav **47**(2): 307-310.
- Godoy, A. F. M. C., I.C.; Costa, R.; Junior, W.S.S. (2014). "Adipocinas: uma visão geral dos seus efeitos metabólicos. ." Rev HUPE. : 54-60.
- Goldbart, A. D., B. W. Row, et al. (2006). "High fat/refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia." Brain Res **1090**(1): 190-196.
- Golden, N. H. and I. R. Shenker (1994). "Amenorrhea in anorexia nervosa. Neuroendocrine control of hypothalamic dysfunction." Int J Eat Disord **16**(1): 53-60.
- Gomes, E. T. (2010). Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa.
- Gonzalez, E. R.-M., M.; Puangoraphant, S. (2009). " Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior." Brain, Behavior, and Immunity **23**: 721-729.
- Goularte, J. F., M. B. Ferreira, et al. (2012). "Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats." Br J Nutr **108**(8): 1511-1518.
- Grove, K. A., S. Sae-tan, et al. (2012). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits pancreatic lipase and reduces body weight gain in high fat-fed obese mice." Obesity (Silver Spring) **20**(11): 2311-2313.
- Gualillo, O., J. R. Gonzalez-Juanatey, et al. (2007). "The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives." Trends Cardiovasc Med **17**(8): 275-283.
- Hajer, G. R., T. W. van Haefen, et al. (2008). "Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases." Eur Heart J **29**(24): 2959-2971.
- Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, et al. (2008). "The adipocyte as an endocrine cell." Endocrinol Metab Clin North Am **37**(3): 753-768, x-xi.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant Physiol **141**(2): 312-322.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1147-1150.
- Halliwell, B. (2012). "Free radicals and antioxidants: updating a personal view." Nutr Rev **70**(5): 257-265.
- Halliwell, B. (2014). "Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls." Biomed J **37**(3): 99-105.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-255.
- Halliwell, B. G., J. M. C. (2007). Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species In: Free Radicals in Biology and Medicine.
- Halliwell, B. G., J.M.C. (2007). Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In: Free Radicals in Biology and Medicine.

- Halyburton, A. K., G. D. Brinkworth, et al. (2007). "Low- and high-carbohydrate weight-loss diets have similar effects on mood but not cognitive performance." Am J Clin Nutr **86**(3): 580-587.
- Hampton, M. G. (1992). Production of Black Tea. Chapman & Hall: London.
- Hara, Y. (2001). Green tea: health benefits and application. New York: CRC.
- Haslam, D. W. and W. P. James (2005). "Obesity." Lancet **366**(9492): 1197-1209.
- Heber, D., Y. Zhang, et al. (2014). "Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets." J Nutr **144**(9): 1385-1393.
- Heilbronn, L. K. and L. V. Campbell (2008). "Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity." Curr Pharm Des **14**(12): 1225-1230.
- Helene, A. F. and G. F. Xavier (2006). "Working memory and acquisition of implicit knowledge by imagery training, without actual task performance." Neuroscience **139**(1): 401-413.
- Higdon, J. V. and B. Frei (2003). "Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(3): 365-367.
- Hilal, Y. E., U. (2007). "Characterisation of white tea – comparison to green and black tea." J. Verbr. Lebensm.: 414-421.
- Hirshfield, A. N. (1991). "Development of follicles in the mammalian ovary." Int Rev Cytol **124**: 43-101.
- Holemans, K., S. Caluwaerts, et al. (2004). "Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus." Am J Obstet Gynecol **190**(3): 858-865.
- Hoops, D., P. Roberts, et al. (2010). "Should routine peripheral blood glucose testing be done for all newborns at birth?" MCN Am J Matern Child Nurs **35**(5): 264-270.
- Huda, S. S., L. E. Brodie, et al. (2010). "Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences." Semin Fetal Neonatal Med **15**(2): 70-76.
- Hursting, S. D. and N. A. Berger (2010). "Energy balance, host-related factors, and cancer progression." J Clin Oncol **28**(26): 4058-4065.
- Imtiaz A.; Siddiqui F.A.; Vaqar M.; Adhami, N. A. H. M. (2004). "Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. ." Antioxidants & Redox Signaling **6**(3): 571-582.
- Iwasa, T., T. Matsuzaki, et al. (2010). "Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and the timing of puberty in female rats." J Physiol **588**(Pt 5): 821-829.
- Iyer, A., D. P. Fairlie, et al. (2010). "Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity." Nat Rev Endocrinol **6**(2): 71-82.
- Jayasekera, S. M., A.L.; Garg, M.; Moughan, P.J. V. (2011). "Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully-fermented Sri Lankan tea." Food Chemistry **125**: 536-541.

- Jiang, H., Engelhardt, U. H., Tharne, C., Maiwald, B., Stark, J. (2015). "Determination of Flavonol Glycosides in Green Tea, Oolong Tea And Black Tea by UHPLC Compared to HPLC." Food Chemistry **183**: 30-35.
- Jin, L., S. Zhang, et al. (2000). "Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells." Endocrinology **141**(1): 333-339.
- Johnson, R., S. Bryant, et al. (2012). "Green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence." Maturitas **73**(4): 280-287.
- Jung, C. H. and M. S. Kim (2013). "Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity." Arch Pharm Res **36**(2): 201-207.
- Kaizer, R. R., A. C. da Silva, et al. (2004). "Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure." Neurochem Res **29**(12): 2251-2255.
- Kaminski, D. A. and T. D. Randall (2010). "Adaptive immunity and adipose tissue biology." Trends Immunol **31**(10): 384-390.
- Kanoski, S. E. and T. L. Davidson (2011). "Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity." Physiol Behav **103**(1): 59-68.
- Karak, T. B., R. M. (2010). "Trace Elements in Tea Leaves, Made Tea and Tea Infusion: A Review." Food Research International **43**(9): 2234-2252.
- Karoki, S. M. W., F. N.; Wanyoko, J. K.; Ngunjiri, R. M. (2007). "Antioxidant capacity of different types of tea products." African Journal of Biotechnology **6**: 2287-2296.
- Kawamura, K., N. Sato, et al. (2002). "Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro." Endocrinology **143**(5): 1922-1931.
- Keller, K. B. and L. Lemberg (2003). "Obesity and the metabolic syndrome." Am J Crit Care **12**(2): 167-170.
- Kennedy, G. C. and J. Mitra (1963). "Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat." J Physiol **166**: 408-418.
- Khan, N. and H. Mukhtar (2007). "Tea polyphenols for health promotion." Life Sci **81**(7): 519-533.
- Kikuchi, N., K. Andoh, et al. (2001). "Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice." Biol Reprod **65**(1): 66-71.
- King, A. and G. Young (1999). "Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals." J Am Diet Assoc **99**(2): 213-218.
- Kisakol, G., E. Guney, et al. (2002). "Effect of surgical weight loss on free radical and antioxidant balance: a preliminary report." Obes Surg **12**(6): 795-800; discussion 800-791.
- Knight, J. A. (2011). "Diseases and disorders associated with excess body weight." Ann Clin Lab Sci **41**(2): 107-121.
- Kodama, D. H. G., E.S.S.; Lajolo, F.M.; Genoves, M.I. (2010). "Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations." Ciênc. Tecnol. Aliment. **30**(4): 1077-1082.

- Koutelidakis, A. E. A., K.; Serafini, M.; Proestos, C.; Komaitis, M.; Pecorari, M.; Kapsokefalou, M. (2009). "Green tea, white tea, and Pelargonium purpureum increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. ." Nutrition **25** 453–458.
- Kretschmer, B. D., P. Schelling, et al. (2005). "Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance." Life Sci **76**(14): 1553-1573.
- Kristensen, P., M. E. Judge, et al. (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." Nature **393**(6680): 72-76.
- Kuo, K. L. W., M.S.; Chiang, C.T.; Tsai, Y.J.; Lin-Shiau, S.Y.; Lin, J.K. (2005). "Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong black, Puerh, and green tea leaves in rats." J Agric Food Chem **53**: 480-489.
- Kuriyama, S., A. Hozawa, et al. (2006). "Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1." Am J Clin Nutr **83**(2): 355-361.
- Laharrague, P., D. Larrouy, et al. (1998). "High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture." FASEB J **12**(9): 747-752.
- Lahlou, M. (2013). "The success of natural products in drug discovery." Pharmacol. Pharm. **4**(3): 17-31.
- Landry, D., F. Cloutier, et al. (2013). "Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction." Reprod Biol **13**(1): 1-14.
- Lebron-Milad, K. and M. R. Milad (2012). "Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders." Biol Mood Anxiety Disord **2**: 3.
- Lee, M. J., Y. Wu, et al. (2010). "Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 371-376.
- Lee, S. C., K. E. Lee, et al. (2005). "The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated Retinol." J Liposome Res **15**(3-4): 157-166.
- Leininger, G. M. (2009). "Location, location, location: the CNS sites of leptin action dictate its regulation of homeostatic and hedonic pathways." Int J Obes (Lond) **33** Suppl 2: S14-17.
- Liao, S. K., Y. H.; Hiipakka, R. A. (2001). "Green tea: biochemical and biological basis for health benefits." Vitamins and Hormones, Advances in Research and Applications **62**(1): 1-94.
- Lima, J. D. M., P.; Moraes, W.S.; Silva, R.B. (2009). "Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas." Ciência Rural **39**(4): 1258-1266.
- Lima, T. A. (1997). "Chá e simpatia: uma estratégia de gênero no Rio de Janeiro oitocentista." An. mus. paul. [online], **5**(1): 93-129.
- Longcope, C., T. Kato, et al. (1969). "Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women." J Clin Invest **48**(12): 2191-2201.
- Lonnqvist, F., A. Thorne, et al. (1997). "Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(7): 1472-1480.
- Lorenzi, H. M., F.J.A. (2002). Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.

- Lowell, B. B. and B. M. Spiegelman (2000). "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis." Nature **404**(6778): 652-660.
- Lyznicki, J. M., D. C. Young, et al. (2001). "Obesity: assessment and management in primary care." Am Fam Physician **63**(11): 2185-2196.
- Maffei, M., J. Halaas, et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." Nat Med **1**(11): 1155-1161.
- Mahmood, T. A., N.; Khan, B.A. (2010). "The morphology, characteristics, and medicinal properties of Camellia sinensis tea." Journal of Medicinal Plants Research **4**(19): 2028-2033.
- Mandel, S. and M. B. Youdim (2004). "Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases." Free Radic Biol Med **37**(3): 304-317.
- Mao, J. T. N., W.X.; Tsu, I.H.; Jin, Y.S.; Rao, J.Y.; Lu, Q.Y.; Zhang, Z.F.; Go, V.L.; Serio, K.J. (2010). "White tea extract induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells: the role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and 15-lipoxygenases. ." Cancer Prev. Res. **3**: 1132-1140.
- Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, et al. (2002). "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." Braz J Biol **62**(4A): 609-614.
- Margetic, S., C. Gazzola, et al. (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(11): 1407-1433.
- Martinelli, C. E. J. A.-O., M.H. (2005). Crescimento normal: avaliação e regulação endócrina Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Mates, J. M. and F. M. Sanchez-Jimenez (2000). "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy." Int J Biochem Cell Biol **32**(2): 157-170.
- Matsubara, S. R.-A., D. B. (2006). "Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. ." Ciência e Tecnologia de Alimentos **26**(2): 401-407.
- Mattes, R. D. (2014). "Eating patterns, diet quality and energy balance: an introduction to an international conference." Physiol Behav **134**: 1-4.
- Matthews, M. K., Jr. and R. Kenyon (1984). "Four- versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy." Physiol Behav **33**(1): 65-67.
- Maury, E. and S. M. Brichard (2010). "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome." Mol Cell Endocrinol **314**(1): 1-16.
- Michailidou, Z., M. D. Jensen, et al. (2007). "Omental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity." Obesity (Silver Spring) **15**(5): 1155-1163.
- Michalakis, K., G. Mintziori, et al. (2013). "The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review." Metabolism **62**(4): 457-478.
- Miean, K. H. and S. Mohamed (2001). "Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants." J Agric Food Chem **49**(6): 3106-3112.
- Miller, A. A. and S. J. Spencer (2014). "Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment." Brain Behav Immun **42**: 10-21.

- Mineharu, Y., A. Koizumi, et al. (2011). "Coffee, green tea, black tea and oolong tea consumption and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese men and women." J Epidemiol Community Health **65**(3): 230-240.
- Mitchell, M., D. T. Armstrong, et al. (2005). "Adipokines: implications for female fertility and obesity." Reproduction **130**(5): 583-597.
- Molina, N., A. P. Bolin, et al. (2015). "Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage." Int Immunopharmacol **28**(2): 985-996.
- Molteni, R., R. J. Barnard, et al. (2002). "A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning." Neuroscience **112**(4): 803-814.
- Morash, B., A. Li, et al. (1999). "Leptin gene expression in the brain and pituitary gland." Endocrinology **140**(12): 5995-5998.
- Moriyama, H. T., N. (2008). "Catechin contents in microbial fermented tea, Goichi tea " Reports of Kochi Prefectural Industrial Technology Center, **39**: 7-9.
- Morrison, C. D. (2008). "Leptin resistance and the response to positive energy balance." Physiol Behav **94**(5): 660-663.
- Mujica, V., E. Leiva, et al. (2008). "Evaluation of metabolic syndrome in adults of Talca city, Chile." Nutr J **7**: 14.
- Mutsaerts, M. A., H. Groen, et al. (2010). "The LIFESTYLE study: costs and effects of a structured lifestyle program in overweight and obese subfertile women to reduce the need for fertility treatment and improve reproductive outcome. A randomised controlled trial." BMC Womens Health **10**: 22.
- Nie, S. P., Xie, A. (2011). "A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. ." Food Hydrocolloids **25**: 144-149.
- Nomura, S., T. Ichinose, et al. (2008). "Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue." J Nutr Biochem **19**(12): 840-847.
- Nummenmaa, L., J. Hirvonen, et al. (2012). "Dorsal striatum and its limbic connectivity mediate abnormal anticipatory reward processing in obesity." PLoS One **7**(2): e31089.
- Ohlson, L. O., B. Larsson, et al. (1985). "The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913." Diabetes **34**(10): 1055-1058.
- Okada, S. T., N.; Ohara, N.; Uchimura, T.; Kozaki, M. (1996). Microorganisms in fermentation of goishi-cha, Japanese fermented tea leaves." Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi **43**: 1019-1027.
- Ouchi, N., J. L. Parker, et al. (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 85-97.
- Paganini-Costa, P. C.-S., D. (2011). "Uma Xícara (chá) de Química." Rev. Virtual Quim. **3**(1): 27-36.

- Pasquali, R. and A. Gambineri (2006). "Insulin-sensitizing agents in polycystic ovary syndrome." Eur J Endocrinol **154**(6): 763-775.
- Pasquali, R., C. Pelusi, et al. (2003). "Obesity and reproductive disorders in women." Hum Reprod Update **9**(4): 359-372.
- Pennathur, S. and J. W. Heinecke (2007). "Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease." Curr Diab Rep **7**(4): 257-264.
- Penzias, A. S. (2012). "Recurrent IVF failure: other factors." Fertil Steril **97**(5): 1033-1038.
- Pereira, L. O. F., R.P.; Lancha Jr., A.H. (2003). "Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina." Arq Bras Endocrinol Metabol **47**(2): 111-127.
- Peron, A. P., Marcos, M. C., Cardoso, S. C., Vicentini, V. E. (2008). "Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* vahl em sistema teste vegetal." Arquivos de Ciências e Saúde Unipar **12**(1): 51-54.
- Peters, A., L. Pellerin, et al. (2007). "Causes of obesity: looking beyond the hypothalamus." Prog Neurobiol **81**(2): 61-88.
- Pettigrew, J. (1999). Chá- VIP. S. Paulo.
- Pi-Sunyer, F. X. (2000). "Obesity: criteria and classification." Proc Nutr Soc **59**(4): 505-509.
- Pinho, C. P., S. Diniz Ada, et al. (2013). "[Prevalence of abdominal obesity and associated factors among individuals 25 to 59 years of age in Pernambuco State, Brazil]." Cad Saude Publica **29**(2): 313-324.
- Polotsky, A. J., A. A. Allshouse, et al. (2015). "Impact of Male and Female Weight, Smoking, and Intercourse Frequency on Live Birth in Women With Polycystic Ovary Syndrome." J Clin Endocrinol Metab **100**(6): 2405-2412.
- Pond, C. M. and C. A. Mattacks (1991). "The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs." Int J Obes **15**(9): 609-618.
- Prada, P. O., H. G. Zecchin, et al. (2005). "Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion." Endocrinology **146**(3): 1576-1587.
- Prado, W. L. L., M.C.; Oyama L.M.; Dâmaso A.R. (2009). "Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício." Rev Bras Med Esporte **15**(5).
- Ramsay, J. E., I. Greer, et al. (2006). "ABC of obesity. Obesity and reproduction." BMJ **333**(7579): 1159-1162.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, et al. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radic Biol Med **20**(7): 933-956.
- Ritov, V. B., E. V. Menshikova, et al. (2005). "Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes." Diabetes **54**(1): 8-14.
- Robards, K. R., D.; Lavee, S. (1999). "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits." Food Chemistry **66**: 401-436.

- Roberts, C. K. and K. K. Sindhu (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sci **84**(21-22): 705-712.
- Robker, R. L. (2008). "Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos." Pathophysiology **15**(2): 115-121.
- Rocha, L. O. S., M. M. S. R.; Corrêa, C. L. (2004). "Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil." Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences **40**(4): 522-523.
- Rolls, B. J., E. A. Rowe, et al. (1980). "Obesity and high energy diets reduce survival and growth rates of rat pups." Proc Nutr Soc **39**(2): 51A.
- Rudich, A., H. Kanety, et al. (2007). "Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction." Trends Endocrinol Metab **18**(8): 291-299.
- Rusak, G., D. Komes, et al. (2008). "Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used." Food Chem **110**(4): 852-858.
- Rusak, G., M. Krajacic, et al. (1997). "Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L." Antiviral Res **36**(2): 125-129.
- Ryan, N. K., C. M. Woodhouse, et al. (2002). "Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation." Biol Reprod **66**(5): 1548-1554.
- Sae-Tan, S., K. A. Grove, et al. (2011). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the expression of genes related to fat oxidation in the skeletal muscle of high fat-fed mice." Food Funct **2**(2): 111-116.
- Sae-Tan, S., C. J. Rogers, et al. (2014). "Voluntary exercise and green tea enhance the expression of genes related to energy utilization and attenuate metabolic syndrome in high fat fed mice." Mol Nutr Food Res **58**(5): 1156-1159.
- Sae-Tan, S., C. J. Rogers, et al. (2015). "Decaffeinated Green Tea and Voluntary Exercise Induce Gene Changes Related to Beige Adipocyte Formation in High Fat-Fed Obese Mice." J Funct Foods **14**: 210-214.
- Sagae, S. C., E. F. Menezes, et al. (2012). "Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats." Physiol Behav **105**(5): 1104-1111.
- Saito, S. T., G. Gosmann, et al. (2007). "Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts." J Agric Food Chem **55**(23): 9409-9414.
- Sampath, C., M. R. Rashid, et al. (2017). "Green tea epigallocatechin 3-gallate alleviates hyperglycemia and reduces advanced glycation end products via nrf2 pathway in mice with high fat diet-induced obesity." Biomed Pharmacother **87**: 73-81.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." Obesity (Silver Spring) **19**(6): 1109-1117.

- Santana-Rios, G., G. A. Orner, et al. (2001). "Inhibition by white tea of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced colonic aberrant crypts in the F344 rat." Nutr Cancer **41**(1-2): 98-103.
- Sarturi, J. B., J. das Neves, et al. (2010). "[Obesity in adults: a population based study in a small town in South of Brazil, 2005]." Cien Saude Colet **15**(1): 105-113.
- Scherer, P. E. (2006). "Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ." Diabetes **55**(6): 1537-1545.
- Scoparo, C. T. d. S., L. M.; Rattmann, Y. D.; Dartora, N.; Paiva, S.M.M.; Sasaki, G.L.; Gorin, P.A.J.; Iacomini, M. (2013). "Polysaccharides from green and black teas and their protective effect against murine sepsis." Food Research International **53**: 780-785.
- Seabra, G., C. Padilha Pde, et al. (2011). "[Pregestational overweight and obesity: prevalence and outcome associated with pregnancy]." Rev Bras Ginecol Obstet **33**(11): 348-353.
- Senanayake, S. P. J. N. (2013). "Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – a review." Journal of Functional Foods **5**: 1529 –1541.
- Senger, A. E. V. S., C.H. A.; Gottlieb, M.G.V. (2010). "Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. ." Scientia Medica. **20**(4): 292-300.
- Setti, S. E., A. M. Littlefield, et al. (2015). "Diet-induced obesity attenuates endotoxin-induced cognitive deficits." Physiol Behav **141**: 1-8.
- Shadid, S., J. A. Kanaley, et al. (2007). "Basal and insulin-regulated free fatty acid and glucose metabolism in humans." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(6): E1770-1774.
- Sharangi, A. B. (2009). "Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) — A review. ." Food Research International **42**: 529-535.
- Sharma, R., K. R. Biedenharn, et al. (2013). "Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility." Reprod Biol Endocrinol **11**: 66.
- Sharma, V. K., H.V.; Bao, L.J.M. (2008). "Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea." Food Research International **41**(1): 124-129.
- Shaw, D. I., W. L. Hall, et al. (2005). "Metabolic syndrome: what is it and what are the implications?" Proc Nutr Soc **64**(3): 349-357.
- Shehzad, A., S. Khan, et al. (2012). "Curcumin molecular targets in obesity and obesity-related cancers." Future Oncol **8**(2): 179-190.
- Sherwood, L. (2011). Fisiologia humana: das células aos sistemas. São Paulo.
- Shutter, J. R., M. Graham, et al. (1997). "Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice." Genes Dev **11**(5): 593-602.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.
- Sies, H. (2007). "Total antioxidant capacity: appraisal of a concept." J Nutr **137**(6): 1493-1495.

- Sies, H. and W. Stahl (1995). "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants." Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1315S-1321S.
- Silva, J. R., R. van den Hurk, et al. (2004). "Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue." Theriogenology **61**(9): 1691-1704.
- Simões, C. M. O. S., E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrivic, P. R. (2003). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS.
- Simões, C. M. O. S., E.P.; Gosman, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2010). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC.
- Simon, G. E., M. Von Korff, et al. (2006). "Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population." Arch Gen Psychiatry **63**(7): 824-830.
- Skalicky, J., V. Muzakova, et al. (2008). "Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome." Clin Chem Lab Med **46**(4): 499-505.
- Skinner, A. C., M. J. Steiner, et al. (2010). "Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood." Pediatrics **125**(4): e801-809.
- Sledzinski, T., E. Goyke, et al. (2009). "Decrease in serum protein carbonyl groups concentration and maintained hyperhomocysteinemia in patients undergoing bariatric surgery." Obes Surg **19**(3): 321-326.
- Smith-Kirwin, S. M., D. M. O'Connor, et al. (1998). "Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1810-1813.
- Smith, C. M., A.D.; Lieberman, M. (2007). Bioquímica médica básica de Mark. Porto Alegre: Artmed.
- Smith, G. D., L. M. Jackson, et al. (2002). "Leptin regulation of reproductive function and fertility." Theriogenology **57**(1): 73-86.
- Smith, M. S., M. E. Freeman, et al. (1975). "The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy." Endocrinology **96**(1): 219-226.
- Sohle, J. K., 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 humans subcutaneous (pre)-adipocytes. ." Nutr.Metab. **6**.
- Sonoda, J. I., R. Ikeda, et al. (2014). "Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, attenuates the cell viability of human non-small-cell lung cancer A549 cells via reducing Bcl-xL expression." Exp Ther Med **8**(1): 59-63.
- Souza, L. M. C., T. R.; Serrato, R. V. ; Costa D. E., Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L. (2008). "Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography– electrospray mass spectrometry. ." Journal of Chromatography A **1207**: 101-109.
- Speretta, G. F. F. L., R.D.; Duarte, A.C.G.O. (2014). " Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TCF-alfa e IL-10." Rev HUPE. **13**(1). 61-69.

- Speroff, L., P. Kenemans, et al. (2005). "Practical guidelines for postmenopausal hormone therapy." Maturitas **51**(1): 4-7.
- Steinbrenner, H. and H. Sies (2009). "Protection against reactive oxygen species by selenoproteins." Biochim Biophys Acta **1790**(11): 1478-1485.
- Stranahan, A. M., E. D. Norman, et al. (2008). "Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats." Hippocampus **18**(11): 1085-1088.
- Surmi, B. K., R. D. Atkinson, et al. (2008). "The role of macrophage leptin receptor in aortic root lesion formation." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(3): E488-495.
- Takeo (1992). Green and semi-fermented teas. Tea. Springer, Dordrecht.
- Tavares, T. N., S. M.; Santos, M. O. (2010). "Obesidade e qualidade de vida: Revisão da literatura." Rev Med Minas Gerais **20**: 359-366.
- Teegarden, S. L. and T. L. Bale (2007). "Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse." Biol Psychiatry **61**(9): 1021-1029.
- Tena-Sempere, M. (2007). "Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function." Neuroendocrinology **86**(3): 229-241.
- Thaler, J. P., C. X. Yi, et al. (2012). "Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans." J Clin Invest **122**(1): 153-162.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-783.
- Toda, N., K. Ayajiki, et al. (2014). "Obesity-induced cerebral hypoperfusion derived from endothelial dysfunction: one of the risk factors for Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **11**(8): 733-744.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." Br J Nutr **92**(3): 347-355.
- Uchiyama, S., Y. Taniguchi, et al. (2011). "Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo." Nutrition **27**(3): 287-292.
- Unger, R. H. and L. Orci (2001). "Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders." FASEB J **15**(2): 312-321.
- Uzun, H., K. Zengin, et al. (2004). "Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding." Obes Surg **14**(5): 659-665.
- Valenzuela, A. B. (2004). "El Consumo te y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria." Revista Chilena de Nutrición, **31**(2): 72-82.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.

- van den Berg, E., R. P. Kloppenborg, et al. (2009). "Type 2 diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia and obesity: A systematic comparison of their impact on cognition." Biochim Biophys Acta **1792**(5): 470-481.
- Van Gaal, L. F., M. A. Wauters, et al. (1997). "The beneficial effects of modest weight loss on cardiovascular risk factors." Int J Obes Relat Metab Disord **21 Suppl 1**: S5-9.
- Vazquez-Vela, M. E., N. Torres, et al. (2008). "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity." Arch Med Res **39**(8): 715-728.
- Vernini, J. M., J. B. Moreli, et al. (2016). "Maternal and fetal outcomes in pregnancies complicated by overweight and obesity." Reprod Health **13**(1): 100.
- Villarreal-Lozoya, J. E., L. Lombardini, et al. (2009). "Electron-beam irradiation effects on phytochemical constituents and antioxidant capacity of pecan kernels [ *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] during storage." J Agric Food Chem **57**(22): 10732-10739.
- Vincent, H. K., K. E. Innes, et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes Obes Metab **9**(6): 813-839.
- Vincent, H. K. and A. G. Taylor (2006). "Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans." Int J Obes (Lond) **30**(3): 400-418.
- Vinson, J. A. Y., A.; Dabbagh, M.A. (1998). "Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins." Nutrition Research **18**(6): 1067-1075.
- Volp, A. C. P. A., R.C.G.; Costa, N.M.B.; Minim, V.P.R.; Stringueta, P.C.; Bressan, J. (2008). "Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica." Arq Bras Endocrinol Metab **52**(3).
- Vuong, Q. V. N., V.; Golding, J.B.; Roach, P.D. (2011). "The content of bioactive constituents as a quality index for Vietnamese Teas. ." International Food Research Journal **18**: 329-336.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." Endocr Rev **21**(6): 697-738.
- Wang, H., G. J. Provan, et al. (2000). "Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis." Trends in Food Science & Technology **11**(4): 152-160.
- Wang, J., R. Liu, et al. (1998). "A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat." Nature **393**(6686): 684-688.
- Wasim, M., F. R. Awan, et al. (2016). "Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity." Biochem Genet **54**(5): 565-572.
- Way, T. D., Lin, H.Y., Kuo, D.H., Tsai, S.J. , Shieh, J.C., Wu, J.C., Lee, M.R., Lin, J.K. (2009). "Puerh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells." J Agric Food Chem **57**: 5257-5264.
- Wehmer, F., M. Bertino, et al. (1979). "The effects of high fat diet on reproduction in female rats." Behav Neural Biol **27**(1): 120-124.

- Weisburger, J. H. (1997). "Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies." J Am Diet Assoc **97**(7 Suppl): S16-23.
- Westwood, F. R. (2008). "The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging." Toxicol Pathol **36**(3): 375-384.
- Whitmer, R. A., S. Sidney, et al. (2005). "Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life." Neurology **64**(2): 277-281.
- WHO, W. H. O. (2012). World Health Estatistics 2012.
- Willians, G. L. A., M.; Garcia, M. R.; Stanko, R. L.; Nizielski, S. E.; Morrison, C. D.; Keisler, D. H. (2002). "Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. ." Domestic Animal Endocrinology **23**: 339-349.
- Winocur, G. G., C.E. (1999). "The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats." Behav Brain Res: 153-161.
- Wisse, B. E. and M. W. Schwartz (2009). "Does hypothalamic inflammation cause obesity?" Cell Metab **10**(4): 241-242.
- Wittermer, C., J. Ohl, et al. (2000). "Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome?" J Assist Reprod Genet **17**(10): 547-552.
- Wu, S. C. G.-C., Y.; Bor-Sen W.; Chih-Kwang, C; Wen-Jye Y.; Leewen C.; Pin-Der, D. (2007). "Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea." Food Science and Technology, **40**(3): 506-512.
- Wu, Y., Z. Zhang, et al. (2015). "High fat diet triggers cell cycle arrest and excessive apoptosis of granulosa cells during the follicular development." Biochemical and Biophysical Research Communications **466**(3): 599-605.
- Yang, C. S. and J. D. Lambert (2011). "Research on tea and health." Pharmacol Res **64**(2): 85-86.
- Yu, C. K., T. G. Teoh, et al. (2006). "Obesity in pregnancy." BJOG **113**(10): 1117-1125.
- Zaveri, N. T. (2006). "Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications." Life Sci **78**(18): 2073-2080.
- Zeeb, D. J., B. C. Nelson, et al. (2000). "Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry." Anal Chem **72**(20): 5020-5026.
- Zhang, Y. and P. J. Scarpace (2006). "The role of leptin in leptin resistance and obesity." Physiol Behav **88**(3): 249-256.
- Zimmerman, G. and H. Soreq (2006). "Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission." Cell Tissue Res **326**(2): 655-669.
- Zuanazzi, J. A. S. (2002). Flavonoides. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC.

## ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO  
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **024/2015**

Título: Efeito dos chás provenientes da *Camellia sinensis* sobre a obesidade em camundongas

Data da aprovação: **23/07/2015**

Período de vigência do projeto: De: **07/2015** Até: **07/2018**

Pesquisador: **Francielli Weber Santos Cibin**

Campus: **Uruguaiana**

Telefone: **(55) 99688269**

E-mail: **franciellcibin@unipampa.edu.br**

  
Marcelo Dal Pozzo  
Médico Veterinário  
Coordenadora Pro Tempore da CEUA/UNIPAMPA