

**Lucilene de Andrade Oliveira Marques**

**Efeitos da ingestão de chás de *Camellia sinensis* em parâmetros ósseos de ratos machos jovens, tratados ou não com sacarose.**

**Araçatuba – SP**

**2011**

**Lucilene de Andrade Oliveira Marques**

**Efeitos da ingestão de chás de *Camellia sinensis* em parâmetros ósseos de ratos machos jovens, tratados ou não com sacarose.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa: Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

**Araçatuba – SP**

**2011**

## DEDICATÓRIA

Aos meus filhos: Ulisses, Izadora e Júlio, por toda compreensão pelas minhas horas de ausência

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, por todas as horas de dedicação, paciência e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A todos os professores do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e em especial aos professores: Mário Jefferson Quirino Louzada, à coordenadora Rita Cássia Menegati Dornelles, Antonio Augusto Ferreira de Carvalho (Depto. de Patologia e Propedêutica Clínica) e Eloi Dezan Junior (Departamento de Odontologia Restauradora) pela atenção que sempre me dispuseram durante o tempo de realização deste trabalho.

Aos meus pais, José claro de Oliveira e Maria de Andrade Oliveira, meus familiares e a instituição que trabalho –FASSP- pelo apoio e compreensão.

A todos os meus colegas do departamento de Ciências Básicas, principalmente aos meus amigos Bruna, Gean, Wilma, Samuel, Wagner, Juliana e Felipe que fizeram parte desta etapa da minha vida, por todos os momentos que passamos juntos, em busca dos mesmos objetivos.

Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Araçatuba pela atenção prestada todas as vezes que necessitei.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista pela oportunidade de realização deste trabalho e à Fundunesp, pelo auxílio financeiro.

OLIVEIRA,L.A. **Efeitos da ingestão de chás de *Camellia sinensis* em parâmetros ósseos de ratos machos jovens, tratados ou não com sacarose**, 2011. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 20011.

## RESUMO

Os chás verde e branco obtidos a partir das folhas de *Camellia sinensis*, possuem elevadas concentrações de polifenóis, principalmente catequinas, aos quais são atribuídos inúmeros efeitos benéficos. Em alguns países a ingestão desses chás por seres humanos é próxima à ingestão de água, e em todo o mundo é cada vez maior a oferta de bebidas e outros preparados a base desses chás, para a população de diversas faixas etárias. Através de diferentes mecanismos os chás reduzem o sobrepeso, os depósitos de lipídeos, além de promoverem melhoras no perfil lipídico plasmático e na glicemia. O consumo de chás de *C. sinensis*, ou dos polifenóis obtidos a partir dos chás, vem sendo associado à melhora na qualidade óssea de animais e humanos em diversas situações. Por mecanismos diretos e indiretos, os chás promovem aumento na formação óssea por estimular a diferenciação em osteoblastos inibindo ainda a apoptose dessas células, além de reduzir a osteoclastogênese e a atividade de osteoclastos. Essas ações resultam em aumento da densidade mineral óssea, melhora da microarquitetura e da resistência óssea às fraturas. Durante a fase de crescimento, porém, os dados da literatura são ainda insuficientes para comprovar a segurança dos chás em relação à qualidade e crescimento ósseo. O consumo excessivo de carboidratos simples, que muitas vezes resulta em sobrepeso e obesidade, modifica de forma negativa parâmetros ósseos, por mecanismos que envolvem adipocinas, vias hipotalâmicas e metabolismo energético. Neste estudo foram analisados os efeitos da ingestão de chás verde e branco na estrutura óssea de animais em fase de crescimento, e a possibilidade dos chás reverterem ou minimizarem alterações na estrutura resultantes do excessivo consumo de carboidratos. Sessenta ratos Wistar machos, com 40 dias de idade foram subdivididos nos grupos controle (C), sacarose (S),

sacarose e chá verde (SCV), sacarose e chá branco (SCB), chá verde (CV) e chá branco (CB). Infusões de chás foram administradas diariamente por 8 semanas, na dose de 1.250mg/kg de massa corpórea, através de sonda orogástrica. Os animais tiveram livre acesso a ração, água e solução de sacarose 30% (p/v). O tratamento com os chás reverteu os aumentos dos depósitos lipídicos, a dislipidemia e o ganho de peso promovido pela sacarose, reduzindo os níveis plasmáticos de leptina. Porcentagem de osso trabecular, espessura, conectividade e espaçamento entre as trabéculas, alterados pela sacarose foram normalizados pelos chás. Nos animais não tratados com sacarose houve aumento da densidade mineral óssea e da rigidez, corroborando achados na histomorfometria. Não houve diferença nos parâmetros avaliados entre os dois chás. Embora os chás nas doses administradas tenham sido efetivos em minimizar as alterações induzidas pelo elevado consumo de sacarose, o consumo por jovens com dietas equilibradas requer investigações em longo prazo, que comprovem sua segurança com relação à qualidade e ao crescimento ósseo.

**Palavras-chave:** *Camellia sinensis*. Osso e Ossos. Sacarose.

OLIVEIRA,L.A. **Effects of ingestion of tea *Camellia sinensis* on bone parameters in young male rats, treated or not with sucrose**, 2011. 69f. Dissertation (Master's) – UNESP School of Dentistry - Paulista State University, (“Universidade Estadual Paulista”), Araçatuba, 2011.

## ABSTRACT

White and green teas obtained from *Camellia sinensis* leaves have high concentrations of polyphenols, mainly catechins, to which innumerable beneficial effects are contributed. In some countries, ingestion of these teas by human beings is close to that of water ingestion, and worldwide, there is an increasing offer of beverages and other preparations based on these teas for different age-ranges of the population. By means of different mechanisms teas reduce overweight, lipid deposits, in addition to promoting improvements in the plasma lipid profile and glycemia. Consumption of *C. sinensis* teas, or the polyphenols obtained from them, has been associated with improvement in bone quality of animals and humans in various situations. By direct and indirect mechanisms, the teas promote increased bone formation by stimulating differentiation into osteoblasts, as well as inhibiting apoptosis of these cells, in addition to reducing osteoclastogenesis and osteoclast activity. These actions result in increased bone mineral density, improve bone microarchitecture and fracture resistance. During the growth phase, however, there are still insufficient data in the literature to prove the safety of teas in relation to bone quality and growth. Excessive simple carbohydrate consumption frequently results in overweight and obesity, negatively modifies bone parameters by mechanisms that involve adipokines, hypothalamic pathways and energy metabolism. In this study the effects of green and white tea ingestion on the bone structure of animals in the growth stage were analyzed, as well as the possibility of the teas reverting or minimizing alterations in structure resulting from excessive carbohydrate consumption. Sixty male Wistar rats, 40 days of age were subdivided into the following groups: Control (C), Sucrose (S), Sucrose and green tea (SCV), Sucrose



and white tea (SCB), green tea (CV) and white tea (CB). Tea infusions were administered daily for 8 weeks, at a dose of 1.250mg/kg body mass, by orogastric tube. The animals had free access to rations, water and 30% sucrose solution (p/v). Treatment with the teas reverted the increases in lipid deposits, dyslipidemia and weight gain promoted by sucrose, reducing the plasma levels of leptin. Percentage of trabecular bone, thickness, connectivity and spacing between trabeculae, altered by sucrose were normalized by the teas. In the animals not treated with sucrose there was an increase in bone mineral density and rigidity, corroborating histomorphometric findings. There was no difference between the two teas in the parameters evaluated. Although the teas at the doses administered was effective in minimizing alterations induced by high sucrose consumption, their consumption by youngsters with balanced diets requires long term investigations that prove their safety with regard to bone quality and growth.

**Key Words:** *Camellia sinensis*. Bone and Bones. Sucrose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1A e B: Esquema dos testes biomecânico: (A) ensaio de compressão; (B) ensaio de flexão em três pontos.....

Figura 2 – Esquema da curva força x deslocamento obtida no ensaio mecânico.....

figura 3 – mensuração (cm) de partes do fêmur: (a) comprimento longitudinal; (b), largura da diáfise e (c) comprimento do colo transversal.....

Figuras 4A e B – Cortes histológicos longitudinais da cabeça do fêmur, abaixo da cartilagem de crescimento (A) marcação em áreas para mensurações; (B) mensuração da área trabecular.....

Figuras 5A e B: Marcação em cortes longitudinais do terço médio da diáfise do fêmur para mensuração da espessura cortical  $E_c$  ( $\mu\text{m}$ ): (A) espessura total E; (B) espessura endostal.....

Figura 6A- Concentração plasmática de TAG (mg/dL); 6B concentração plasmática de colesterol total (mg/dL); 6C concentração plasmática de HDL (mg/dL).....

Figura 7A e B. Concentrações plasmáticas de frutossamina (mg/dL) (A), concentração plasmática de leptina (mg/dL) (B), concentração plasmática de insulina ( $\mu\text{U/mL}$ ) (C).

Figura 8A - Medida transversal da diáfise; 8B do colo transversal; e 8C comprimento longitudinal.

Figura 19A - Densidade radiográfica cabeça (34x34Pi); 9B densidade radiográfica trocânter (30x30Pi); 9C densidade radiográfica fossa trocantérica (20x30Pi); 9D densidade radiográfica diáfise média (100Pi).

Figura 10A - Osso trabecular (%); 10B espessura trabecular ( $\mu\text{m}$ ); 10C espaçamento trabecular ( $\mu\text{m}$ ); 10D número de trabéculas ( $\mu\text{m}$ ); 10E espessura cortical ( $\mu\text{m}$ ).

Figura 11. Secções longitudinais de osso trabecular na cabeça femoral, mostrando disposição das trabéculas ósseas, espessura e espaçamento, dos diferentes grupos estudados: grupo C; grupo S; grupo SCV; grupo SCB; grupo CV e grupo CB.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo de ração, de solução de sacarose, de líquido total e energético em animais que receberam diferentes tratamentos.....

Tabela 2 – Circunferência abdominal e torácica de animais que receberam diferentes tratamentos.....

Tabela 3 – Ganho de massa corpórea e massa do tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal de animais que receberam diferentes tratamentos

Tabela 4 – DXA dos fêmures de animais que receberam diferentes tratamentos.....

Tabela 5 – Força máxima (N) e rigidez (N/mm), durante a flexão e a compressão.....

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC .....	Acetil CoA carboxilase
ACO.....	Acetil CoA oxidase
ATF4.....	Fator ativador de transcrição 4
CART.....	Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
CE.....	Epicatequina
CEBP- $\alpha$ .....	Proteína Ligadora à Sequência Amplificadora CCAAT
COMT.....	Catecol-O-metiltransferase
CMO .....	Conteúdo mineral ósseo
CPT-1.....	Carnitina Palmitonil Transferase-1
Ctx.....	Telipeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I
DMO .....	Densidade mineral óssea
ECG .....	Epicatequina galato
EGC.....	Epigalocatequina
EGCG.....	Epigalocatequina galato
EPI.....	Epididimal
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético
FAL.....	Fosfatase alcalina
FAS.....	Ácido graxo sintase
Glu.....	Ácido glutâmico
GPX .....	Glutathione peroxidase
GTP .....	Polifenóis de chá verde
HDL .....	Lipoproteína de alta densidade
HSL.....	Lipase hormônio sensível
ICV.....	Infusão intracerebroventricular
IMC .....	Índice de massa corpórea
LDL .....	Lipoproteína lipase
LPL.....	Lipoproteína de baixa densidade
MCD.....	Malonil-CoA descarboxilase
NFKB-RANK .....	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
NIH-3T3.....	“ Mouse Embryogenic Fibroblast Cell Line”

OT .....	Osso trabecular
PDE.....	Fosfodiesterase
PPAR $\gamma$ .....	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma $\gamma$
PTH.....	Paratormônio
PTP1B.....	Proteína Tirosina Fosfatase tipo 1B
RANKL.....	Ligante do Receptor ativador do fator-kappa B nuclear
RETRO.....	Retroperitoneal
Runx2.....	Fator de transcrição relacionado a Runt2
SAOS2.....	“Sarcoma Osteogenic”
SREBP-1.....	Elemento Regulado por Esterol 1c
SGLT1.....	Transportador de glicose sódio-dependente
TAGs .....	Triacilgliceróis
TNF $\alpha$ .....	Fator de Necrose Tumoral
TWIST2.....	“Twis-related protein 2”
TRAP.....	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
VLDL.....	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
	2.1 Tratamentos dos animais.....	23
	2.2 Coleta das amostras.....	25
	2.3 Análises dos componentes plasmáticos.....	26
	2.3.1 <i>Colesterol total</i> .....	26
	2.3.2 <i>HDL colesterol</i> .....	26
	2.3.3 <i>Triacilgliceróis</i> .....	26
	2.3.4 <i>Frutosamina</i> .....	27
	2.3.5 <i>Leptina</i> .....	27
	2.3.6 <i>Insulina</i> .....	27
	2.4 Análises das estruturas ósseas.....	28
	2.4.1 <i>Densitometria óssea</i> .....	28
	2.4.2 <i>Ensaio mecânico</i> .....	28
	2.4.3 <i>Análises radiográficas</i> .....	30
	2.4.4 <i>Histomorfometria</i> .....	31
	2.5 Determinação das concentrações de polifenóis nos chás.....	33
	2.6 Análise estatística dos dados .....	33
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	34
	3.1 Ingestão de ração, de solução de sacarose (30%) e consumo energético total.....	34
	3.2 Circunferência abdominal e torácica.....	35
	3.3 Ganho de massa corpórea e massa de tecido adiposo branco RETRO e EPI.....	35
	3.4 Análise dos componentes plasmáticos.....	37
	3.5 Análise dos parâmetros ósseos.....	40
	3.6 Resultados das análises das concentrações de polifenóis nos chás....	47

<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
----------	-----------------------	-----------

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
----------	-----------------------	-----------

## **REFERÊNCIAS**

**ANEXO:** Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de chá surgiu na China e no Sudeste da Ásia há milhares de anos e foi introduzido progressivamente em todo o mundo sendo que, em alguns países a ingestão desta bebida está bem próxima à de água (RIETVELD; WISEMAN, 2003; KUO et al., 2005).

A partir das folhas de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae) podem ser obtidas diferentes formas comerciais de chás, como verde, branco, *oolong*, preto, ou *puerh* chá, que diferem na forma de processamento das folhas (HILAL; ENGELHARDT, 2007). Para a obtenção de chás verde e branco as enzimas polifenóis oxidases são desativadas por um aquecimento inicial, através de vapor ou calor seco (SANTANA-RIOS et al., 2001; HILAL; ENGELHARDT, 2007; MAZZANTI et al., 2009). Após essa etapa as folhas são submetidas ao processo de rotação, para eliminar o restante da umidade e são secas rapidamente (MAZZANTI et al., 2009). Para o preparo do chá branco as primeiras folhas e brotos são colhidos somente durante a primavera (SANTANA-RIOS et al., 2001).

As folhas frescas de *C. sinensis* possuem uma alta quantidade de polifenóis, principalmente flavonóides, conhecidos como catequinas. As principais catequinas presentes no chá são epigalocatequina galato (EGCG), epigalocatequina (EGC), epicatequina (CE) e epicatequina galato (ECG), sendo a EGCG a mais abundante nos chás branco e verde (SANTANA-RIOS et al., 2001) e aparentemente a de maior atividade farmacológica (WOLFRAN et al., 2006).

Hilal e Engelhardt (2007) se preocuparam em analisar as concentrações dos componentes de diferentes chás de *C. sinensis*, e segundo os resultados apresentados não existem diferenças em relação à quantidade de catequinas entre os chás verde e branco, porém maior concentração de cafeína foi encontrada no chá branco. Uma análise química mais profunda foi realizada por Unachukwu e colaboradores (2010). Nesse estudo foram analisados vários subtipos de chás, verde e branco, comerciais e os resultados mostraram grande variação na concentração das diferentes catequinas encontradas nas bebidas, impossibilitando a diferenciação dos dois tipos de chá com base nesse parâmetro.



Diversos trabalhos da literatura indicam efeito benéfico do chá verde sobre o diabetes e o controle da glicemia (SONG et al., 2003; WOLFRAM et al., 2006), sobre o peso corporal, quantidades de gordura visceral e plasmática (KAO et al., 2000; MURASE et al., 2002; IKEDA et al., 2005; NAGAO et al., 2007) e outros fatores associados à obesidade.

A melhora promovida pelo chá em parâmetros associados à síndrome metabólica e à obesidade resulta da diminuição da absorção de lipídeos pelo intestino (KOO; NOH, 2007), do aumento da termogênese (WESTERTERP-PLANTENGA et al., 2005; DIEPVENS et al., 2007), e de maior oxidação de gorduras e gasto energético, promovida pelo sistema nervoso simpático (DIEPVENS et al., 2007). Alguns dos efeitos do chá sobre o metabolismo lipídico são determinados por maior expressão tecidual de genes que codificam enzimas e fatores de transcrição envolvidos na síntese e oxidação de lipídeos (CHEN et al., 2009). Além dessas ações, o consumo de chá ou polifenóis interfere também na emulsificação e absorção de lipídeos da dieta (KOO; NOH, 2007), na mobilização dos estoques de lipídeos (MOCHIZUKI et al., 2004) e na passagem de ácidos graxos para células do tecido adiposo, a partir da VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) (CHEN et al., 2009).

Não existem muitos relatos na literatura sobre os efeitos do chá verde em indivíduos em fase de crescimento. Um estudo conduzido com crianças obesas, com idades entre 6 e 16 anos, demonstrou que o uso do extrato de chá verde por 24 semanas foi capaz de promover melhora nos parâmetros bioquímicos e antropométricos, embora de menor magnitude que a observada em adultos obesos, sem afetar parâmetros do crescimento (MATSUYAMA et al., 2008).

A obesidade resulta em elevação do índice de massa corpórea (IMC) e a relação entre IMC, densidade mineral óssea (DMO) e desenvolvimento ósseo vem sendo investigada nos últimos tempos. Alguns trabalhos atribuem um efeito positivo direto do IMC na DMO em homens, mulheres e em menor grau em crianças e adolescentes (FELSON et al., 1993; ILICH et al., 1998; REID, 2002). Porém, surgem continuamente dados que comprovam que o excesso de massa gorda não protege contra as reduções de massa óssea (HUANG et al., 2001; JANICKA et al., 2007) e ainda que, quando a carga mecânica exercida pela massa corpórea é removida, a massa gorda relaciona-se de forma negativa com a massa óssea (ZHAO et al., 2007). Em adolescentes obesos a perda de peso contribui para aumentar a DMO,

ênfatizando ainda mais a ausência de uma correlação positiva entre a obesidade e o esqueleto, durante a fase de crescimento (STETTLER et al., 2008).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a complexa relação entre tecido adiposo e massa óssea, e sabe-se que diversas moléculas biologicamente ativas, tais como adiponectina, resistina, leptina, estrógeno e citocinas inflamatórias, estão envolvidas no processo (AKUNE et al., 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a adiponectina promove aumento da massa óssea, ativando a formação de osteoblastos e suprimindo a de osteoclastos (OSHIMA et al., 2005). No plasma de obesos e diabéticos a concentração desse hormônio é reduzida, sofrendo aumento após a perda de massa corpórea, o que resulta em um efeito benéfico sobre a DMO (WEINER et al., 2001).

A resistina também desempenha importante papel na remodelação óssea, aumentando a liberação de citocinas e influenciando a diferenciação de osteoclastos (THOMMESEN et al., 2006). Em obesos as concentrações plasmáticas de resistina variam de forma positiva com o grau de obesidade (VENDRELL et al., 2004) e existe uma relação inversa entre os níveis séricos dessa substância e DMO em homens adultos (OH et al., 2005).

A ação da leptina sobre a massa óssea vem sendo estudada há muito tempo, e diferentes trabalhos têm contribuído para elucidar os mecanismos através dos quais esse peptídeo promove ações diversas sobre o metabolismo ósseo. Essas ações podem resultar da ativação direta de receptores nas células ósseas, como também da ação em receptores hipotalâmicos, que resulta na produção de mediadores capazes de promover repostas nas células ósseas.

A regulação central da massa óssea pela leptina, assim como o controle do apetite, são dependentes da integridade de receptores nos núcleos hipotalâmicos ventromedial (Htr2c) e arqueado (Htr1a e Htr2b), respectivamente, porém os efeitos não resultam de ação direta do peptídeo nos receptores (KARSENTY; OURY 2010).

A leptina atua em receptores localizados no núcleo da rafe (ObRb), inibindo a síntese e a liberação de serotonina. A redução de serotonina, por sua vez, resulta em não ativação dos receptores Htr2c, o que impede o aumento de massa óssea. A diminuição da serotonina promove ainda redução do apetite, em função da ausência de ação nos receptores Htr1a e Htr2b (YADAV et al., 2009). O mediador periférico da serotonina produzida no cérebro, no processo de controle da massa óssea é o sistema nervoso simpático, via receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, expressos nos

osteoblastos (YADAV et al., 2009). Essas ações da leptina elucidam achados de Ducy e colaboradores (2000) sobre a ação da leptina na reabsorção óssea, através de via hipotalâmica. Em experimento conduzido com camundongos obesos deficientes em leptina (ob/ob) a elevação de massa óssea é corrigida pela infusão intracerebroventricular (ICV) da leptina (DUCY et al., 2000).

A Leptina modula através de vias centrais formação e reabsorção ósseas. Sua ação nos osteoblastos, via sistema nervoso simpático, resulta em aumento da reabsorção óssea, por favorecer a diferenciação de células progenitoras em osteoclastos, através da indução da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear KappaB, denominado RANKL (TEITELBAUM; ROSS, 2003). Um segundo mecanismo de ação envolve a modulação positiva do Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina (CART), no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), que resulta na inibição da expressão de RANKL (ELEFTERIOU et al., 2005).

Receptores de leptina também são expressos em osteoblastos e condrócitos. A ação direta da leptina nessas células resulta em aumento da proliferação de osteoblastos e menor formação de osteoclastos, efeitos opostos ao observados na ação central da leptina (CORNISH et al., 2002).

A ação da leptina sobre o metabolismo ósseo parece ser dependente da dose. Baixas concentrações de leptina estimulam a formação óssea e são capazes de prevenir perdas, enquanto concentrações elevadas suprimem a formação óssea e estimulam a reabsorção (MARTIN et al., 2007).

Através de mecanismos complexos, tecido adiposo, tecido ósseo, SNC e pâncreas interagem no controle da remodelação óssea e do metabolismo energético. A insulina, hormônio protéico produzido pelas células  $\beta$ -pancreáticas que atua no metabolismo energético, também está envolvido no controle da remodelação óssea. Esse hormônio controla o desenvolvimento dos osteoblastos por inibição de Twist2 (Twist-related protein 2), um fator de transcrição que inibe a maturação de osteoblastos (BIALEK et al., 2004). A inibição de Twist 2 favorece assim a expressão do fator de transcrição relacionado a Runt2 (Runx2), essencial para a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, e que paralelamente inibe a diferenciação em adipócitos e condrócitos (KOMORI, 2006). Estudos (FULZELE et al., 2010) realizados com camundongos sem receptores de insulina em osteoblastos (Ob- $\Delta$ IR) indicam menor formação óssea, atribuída a ausência de expressão de Runx2, e redução da concentração plasmática de osteocalcina descarboxilada.

Nesses animais a menor formação óssea foi evidenciada pela diminuição do volume trabecular e do número de osteoblastos. Foi também evidenciada menor atividade osteoclástica, através da redução na profundidade da erosão das lacunas de reabsorção e da diminuição de telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTx), um marcador de reabsorção óssea.

A osteocalcina é uma proteína molécula de baixo peso molecular (5,700 Da) é primariamente depositada na matriz óssea em grandes quantidades (osteocalcina carboxilada), porém uma pequena fração entra na circulação (osteocalcina não carboxilada), após sofrer carboxilação dependente de vitamina K, reação onde ocorre conversão resíduos de ácido glutâmico (Glu) em ácido gama-carboxiglutâmico ela se torna ligante ao cálcio. No entanto, nem todos os resíduos de ácido glutâmico são carboxilados e tem-se então a osteocalcina em sua forma descarboxilada (LEE et al., 2007). Quando descarboxilada a osteocalcina reduz sua afinidade pela hidroxapatita sendo então liberada para a circulação. Existem atualmente crescentes estudos enfatizando a relação entre osteocalcina e metabolismo energético (HWANG et al., 2009; PITTAS et al., 2009), nestes estudos é enfatizado o papel do sistema esquelético como um órgão endócrino. Estudo com animais locaute osteocalcina apresentaram aumento da gordura visceral, alta concentração de glicose no sangue e menores taxas de insulina (LEE et al., 2007).

A sinalização da leptina em osteoblastos promove uma inibição na sinalização insulínica (YOSHIZAWA et al., 2009), em processo que envolve a desfosforilação do receptor de insulina. A ativação dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos decorrente da ação da leptina no hipotálamo resulta em ativação de uma proteína quinase A, que fosforila o fator de transcrição 4 (ATF4), fator de transcrição presente predominantemente em osteoblastos (ELEFTERIOU et al., 2005). ATF4 modula positivamente a expressão do gene *Esp*, que codifica uma proteína tirosina fosfatase intracelular denominada OST-PTP (HINOI et al., 2008; HINOI et al., 2009). A desfosforilação de resíduos de tirosina do receptor pela OST-PTP inibe a sinalização insulínica (SCHLESSINGER, 2000), com conseqüente inibição da formação e da reabsorção óssea.

O gene *Esp* ocorre em células de sertoli dos testículos e em osteoblastos de animais (LEE et al., 2007). Em humanos embora esse gene não tenha sido encontrado também existe a expressão de proteínas tirosina fosfatase tipo 1B (PTP1B), que atua como OST-PTP (COUSIN et al., 2004).

A ingestão de carboidratos por crianças e adolescentes tem aumentado muito nos últimos anos, resultando em contribuição cada vez maior desses compostos no total de calorias da dieta (FORSCHEE; STOREY, 2003). O consumo de dietas ricas em carboidratos simples, como a sacarose, resulta em maior propensão à obesidade, às doenças cardiovasculares e ao diabetes (MORRIS; ZEMEL, 1999).

Alguns estudos conduzidos com animais avaliaram o efeito do consumo de sacarose no metabolismo lipídico e suas relações com a estrutura óssea. No que diz respeito ao metabolismo lipídico, foi verificada correlação positiva no estudo de Chepulis e Starkey (2008), com aumento da massa corpórea e dos depósitos de tecido adiposo, porém o mesmo não pôde ser visto em outro estudo, no qual a sacarose não promoveu aumento da massa corporal em animais jovens, mesmo com maior ingestão calórica, comparado ao grupo controle (TSANZI et al., 2008).

Algumas divergências foram evidenciadas em relação ao consumo de sacarose e a qualidade da estrutura óssea. Em relação à DMO e ao conteúdo mineral ósseo (CMO), trabalhos relatam ausência de alterações nesses parâmetros em resposta ao tratamento com sacarose (CHEPULIS; STARKEY, 2008; TSANZI et al., 2008; LORINCZ et al., 2009), embora estudos anteriores tenham relatado redução da DMO em resposta ao tratamento com elevadas concentrações desse carboidrato (69%) por 5 semanas (TJADERHANE; LARMAS, 1998).

Quando comparadas as estruturas ósseas de animais tratados com dieta rica em gordura saturada (39,5%) e sacarose (39,5%) às estruturas de animais que receberam dieta com baixa taxa de gordura e amido de milho (68%), foram relatados, nos ratos que receberam sacarose, redução da espessura cortical e da força máxima de flexão durante teste biomecânico. Além disso, aumento significativo da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador de atividade osteoclástica associado ao aumento da reabsorção óssea também foi constatado (LORINCZ et al., 2009). Estudos anteriores já haviam evidenciado menor resistência à quebra durante testes biomecânicos de força máxima (LI et al. 1990; ZERNICK et al., 1995; TJADERHANE; LARMAS, 1998) em resposta ao tratamento com sacarose.

Embora os efeitos benéficos do consumo do chá e/ou suas catequinas em relação à obesidade estejam elucidados e existam relatos sobre melhora da estrutura óssea de animais adultos que receberam chá, a sua utilização em animais

durante as fases de crescimento precisa ser mais investigada, principalmente no relacionado ao metabolismo ósseo.

Estudos *in vitro* fornecem evidências de que os componentes ativos do chá verde favorecem a formação óssea, através do aumento da atividade e da expressão de fosfatase alcalina (FAL) em diversas linhagens de células (CHOI et al., 2003; MOUNT et al., 2006; VALI et al., 2007), e diminuem a formação de osteoclastos, bloqueando a interação entre o receptor ativador do fator nuclear kappa B (NFkB-RANK) e o seu ligante RANK-L, processo essencial para o desenvolvimento dos osteoclastos (LIN et al., 2009). As catequinas do chá causam significativa elevação da sobrevivência e redução da apoptose de osteoblastos (CHOI et al., 2003), enquanto reduzem de forma significativa a sobrevivência (YUN et al., 2004) e aumentam a apoptose de osteoclastos (NAKAGAWA et al., 2002; HAFEEZ et al., 2006; NAKAGAWA et al., 2007).

Em seres humanos adultos, os estudos mostram resultados conflitantes em relação ao consumo de chá verde e o metabolismo ósseo. Enquanto alguns relatam correlação positiva da ingestão do chá verde e DMO (HEGARTY et al., 2000; WU et al., 2002; MURAKI et al., 2007; HAMDY KARA et al., 2007; SHEN et al., 2008; SHEN et al., 2010b), outros evidenciam pequena correlação negativa (HERNÁNDEZ-AVILA et al., 1993) ou ausência de correlação (KYRIAZOPOULOS et al., 2006; SAITOGLU et al., 2007).

Em animais, perda de massa óssea e deterioração da micro-arquitetura resultantes do envelhecimento (associado ou não à deficiência estrogênica) mostraram-se reduzidas em ratas suplementadas com GTP (polifenóis do chá verde) (0,1% a 0,5% p/v) na água de beber (SHEN et al., 2008; SHEN et al., 2009b). Em machos com osteoporose senil, associada ou não a orquiectomia, as catequinas do chá verde foram efetivas em prevenir a perda óssea, sendo o efeito protetor atribuído em partes à capacidade antioxidante desses compostos (SHEN et al., 2011a).

Os efeitos benéficos do chá verde e de seus polifenóis na estrutura óssea têm sido amplamente descritos em animais adultos ou senis, porém chama a atenção estudo realizado com camundongos jovens normais e geneticamente obesos (IWANIEC et al., 2009), no qual foi verificada redução do comprimento, do volume e conteúdo mineral ósseos, além de redução do volume cortical e da espessura das trabéculas, após 6 semanas de tratamento com extrato de chá verde



em concentrações de 0,1 ou 2%. Os resultados sugerem que o consumo excessivo de chá verde por animais jovens poderia levar a redução no ganho de massa óssea durante a fase de crescimento.

O consumo de chá verde, anteriormente limitado aos países asiáticos, vem aumentando em todo o mundo, em função da grande divulgação de seus efeitos no controle e prevenção da síndrome metabólica, da obesidade e outras patologias. Além da disseminação do consumo de chá, a diversidade de bebidas prontas acrescidas de chá verde, que podem ser consumidas por diferentes faixas etárias é cada vez maior.

Embora os chás de *C. sinensis* sejam amplamente consumidos visando o controle de peso, uma melhora nos parâmetros associados à obesidade ou uma redução da perda de qualidade óssea, associada à idade, não se pode ainda afirmar que o consumo desses chás na fase de crescimento, por crianças obesas ou não, seja totalmente seguro no que se refere à estrutura e qualidade ósseas.

Além disso, em vista do crescente entendimento do envolvimento do tecido ósseo na regulação do metabolismo energético e das inter-relações osso/tecido adiposo/pâncreas/sistema nervoso, os efeitos de bebidas que, como os chás de *C. sinensis*, atuem de formas diversas nesses tecidos precisam ser cada vez mais elucidados e visto de forma integrada e sistêmica.

### **Objetivos:**

Este trabalho teve por objetivos avaliar a estrutura e a qualidade óssea de animais machos tratados com chá verde ou branco durante a fase de crescimento, e ainda verificar se os chás são capazes de prevenir, ou ao menos minimizar, as alterações ósseas resultantes do consumo excessivo de sacarose durante o crescimento.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Tratamentos dos animais**

Foram utilizados sessenta ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com 40 dias de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – FOA/UNESP. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Básicas, em número de cinco por gaiola, em temperatura de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas, por oito semanas. O protocolo experimental (3286-2009) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA/UNESP.

Após um período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais: Grupo C – livre acesso à ração comercial e água deionizada; S – livre acesso à ração comercial, água e solução de sacarose 30% (p/v) em água deionizada; SCV – livre acesso à ração comercial, água e solução de sacarose 30% (p/v), e tratamento com infusão de chá verde através de sonda orogástrica, uma vez ao dia; SCB – livre acesso à ração comercial, água e solução de sacarose 30%, e infusão de chá branco através de sonda orogástrica, uma vez ao dia; CV – livre acesso à ração comercial, água, e chá verde através de sonda orogástrica uma vez ao dia e CB – livre acesso à ração comercial, água e tratamento e infusão de chá branco através de sonda orogástrica uma vez ao dia.

As infusões dos chás (saches da Marca Leão®) foram preparadas diariamente, em água deionizada previamente aquecida em temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$ . A infusão permaneceu abafada por 10 minutos, seguindo o protocolo da American Dietetic Association. Volume máximo de 1,0 mL de infusão fria foi administrado aos animais uma vez ao dia, na dose de 1.250mg/Kg de massa corpórea (m.c.), durante as oito semanas de tratamento.

Para padronização, foram utilizados durante o tratamento saches de um único lote de cada tipo de chá. A concentração total de polifenóis foi avaliada através do método de *Folin Ciocalteu* (ARABBI et al., 2004), utilizando ácido gálico como padrão.

Os consumos da água e solução de sacarose foram verificados diariamente por meio de proveta, sendo assumidos como a diferença de valores da solução colocada inicialmente e das sobras. O consumo de ração também foi controlado diariamente, através da diferença do peso inicial da ração e do peso após 24 horas. As mensurações dos consumos de líquido e ração foram realizadas sempre no mesmo horário. Após as oito semanas todos os valores de consumo



foram analisados e obedecendo ao equivalente em Kcal, obteve-se o consumo energético total por animal.

A massa corpórea dos animais foi estimada semanalmente com balança digital. A primeira determinação ocorreu no início do experimento, quando foram estabelecidos de forma aleatória os grupos e a última, na data da eutanásia dos animais.

A biometria foi realizada no dia do sacrifício, por meio de fita para biometria, sendo medidas as circunferências do tórax (cm), do abdômen (cm) e o comprimento naso-anal (cm).

## **2.2 Coletas das amostras**

Após o período de tratamento, os animais em jejum de 12 horas foram anestesiados com xilazina na dose de 10 mg/Kg de m.c. mais quetamina, na dose de 100 mg/Kg de m.c., por via intramuscular, para a realização da punção da aorta abdominal, que resultou na morte por essanguinação. Foram obtidas amostras de soro e plasma (heparina) sanguíneos, após a centrifugação do sangue a 3.500 rpm por 15 minutos, em temperatura de 5°C. O plasma e o soro sanguíneos foram fracionados e armazenados a -70°C até o momento das determinações laboratoriais.

Além do sangue foram coletados os fêmures, após a remoção dos membros pélvicos. O fêmur direito foi preparado imediatamente através de fixação em formalina tamponada a 10% (p/v), para as análises histomorfométricas. O fêmur esquerdo após dissecação foi identificado, envolvido em gaze umedecida em soro fisiológico e armazenado em “freezer” -20°C, para as análises da densidade mineral, resistência, rigidez e tenacidade (análises biomecânicas).

Os depósitos de tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal direito e esquerdo foram retirados e pesados em balança analítica. Os cálculos foram feitos de acordo com a variação da massa do animal, utilizando como regra o equivalente a 100g de m.c., a fim de observar possíveis alterações nos depósitos de lipídeos entre os grupos que receberam diferentes tratamentos.

## **2.3 Análises dos componentes plasmáticos**

### **2.3.1 Colesterol total**

A concentração plasmática do colesterol foi mensurada através de método enzimático colorimétrico (Kit Katal®). Os ésteres de colesterol das amostras sofreram hidrólise pela colesterol esterase. Na presença de oxigênio, por ação da colesterol oxidase houve a produção de peróxido de hidrogênio. A reação entre peróxido de hidrogênio, fenol e 4-aminoantipirina, catalisada pela peroxidase resultou na formação de quinonimina, que foi determinada em 500 nm.

### **2.3.2 HDL colesterol**

Para a determinação de HDL-colesterol foi realizada a precipitação dos quilomicra, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e VLDL do plasma sanguíneo, utilizando-se uma mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio (Kit Katal®). Após a precipitação, o sobrenadante contendo a fração da lipoproteína de alta densidade (HDL) foi utilizado para a mensuração do colesterol, como descrito no item anterior.

### **2.3.3 Triacilgliceróis**

A determinação da concentração de triacilgliceróis (TAGs) foi realizada através de método enzimático colorimétrico (Kit Katal®). A reação é baseada na

hidrólise dos triacilgliceróis pela lipoproteína lipase (LPL), acarretando na produção de glicerol, que foi fosforilado pela glicerol quinase. O produto de reação sofreu a ação da glicerol-P-oxidase e o peróxido de hidrogênio produzido, sob a ação da peroxidase em presença de *p*-clorofenol e 4-aminoantipirina, dando origem a quinonimina. Os valores de absorbância serão verificados em 500 nm.

### **2.3.4 Frutosamina**

Denomina-se frutosamina a cetoamina formada por proteínas com glicose ligada aos grupamentos amino. A formação da cetoamina é proporcional à glicemia, e pode ser utilizada para avaliar os valores glicêmicos num período de até três semanas anteriores à obtenção da amostra.

Os valores foram estimados através de kit comercial (Labtest), baseado na capacidade da frutosamina, quando em pH alcalino, reduzir o azul de nitrotetrazólio, com a formação de um composto de cor púrpura, que pôde ser determinado espectrofotometricamente em 530 nm.

### **2.3.5 Leptina**

A leptina foi determinada através ELISA, utilizando-se kit da empresa Millipore, *Rat Leptin* (Cat EZRL-83K), segundo as instruções do fabricante.

### **2.3.6 Insulina**

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico – RIE (Coat-

A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA), segundo as orientações do fabricante.

As determinações de colesterol total e HDL-colesterol, triacilgliceróis, frutossamina e leptina foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Básicas FOA/UNESP. As leituras de absorvância foram feitas em leitora Power Wave 340-Biotek. A dosagem da insulina foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Apoio, Saúde e Produção Animal, Cursos de Medicina Veterinária, FOA-UNESP.

## **2.4 Análises das estruturas ósseas**

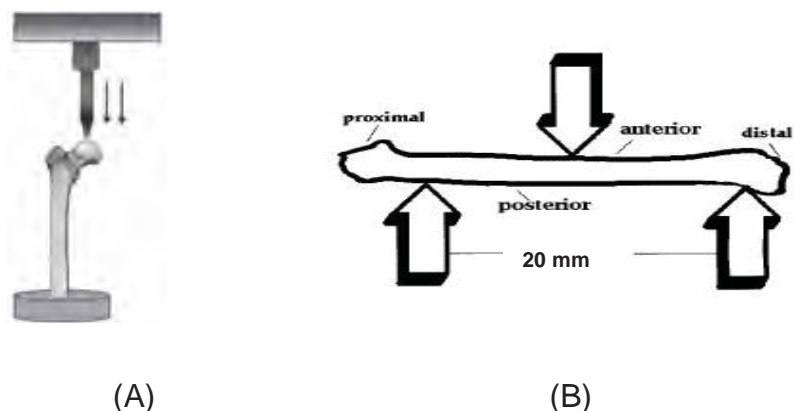
### **2.4.1 Densitometria óssea**

A densidade mineral óssea – DMO - (em  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) dos fêmures dos animais foi avaliada utilizando densitômetro modelo DPX-ALPHA-LUNAR, com software especial para pequenos animais, pertencente ao Laboratório de Biofísica do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP.

### **2.4.2 Ensaios mecânicos**

Para os ensaios mecânicos de flexão em três pontos (Figura 1) e de compressão foi utilizada a máquina universal de ensaio EMIC® Mod DL3000 do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOA/UNESP. A carga foi aplicada a uma velocidade de 5 mm/min e registrada automaticamente pelo sistema computacional pertencente à máquina. Todos os ensaios foram realizados em condições semelhantes, com as estruturas ósseas à temperatura ambiente.

Na análise biomecânica, foi avaliada por meio da curva de força X deslocamento, a resistência óssea, analisando a força máxima admitida pelo tecido ósseo, força na ruptura e a deflexão na força máxima. A distância do vão de apoio no ensaio de flexão foi de 20 mm e a célula de carga utilizada de 2000N.



**Figura 1A e B:** Esquema dos testes biomecânicos. (A) ensaio de compressão; (B) ensaio de flexão em três pontos.

Com os valores obtidos foi traçada através do programa EXCEL<sup>®</sup> a curva carga (força) versus deslocamento (Fig. 2), que forneceu os parâmetros de força máxima e rigidez óssea. Os parâmetros obtidos pela avaliação da curva de força X deslocamento foram: 1) a resistência óssea, analisando a força máxima admitida pelo tecido ósseo; 2) a força na ruptura; 3) a deflexão na força máxima.

A rigidez foi obtida através da tangente do ângulo  $\alpha$  que indica a inclinação da curva carga X deslocamento na fase elástica (até o limite de proporcionalidade).

As forças máximas de flexão e compressão ( $F_{max}$ ) foram utilizadas como critério de avaliação da resistência, sendo o maior valor de carga admitida em cada ensaio.

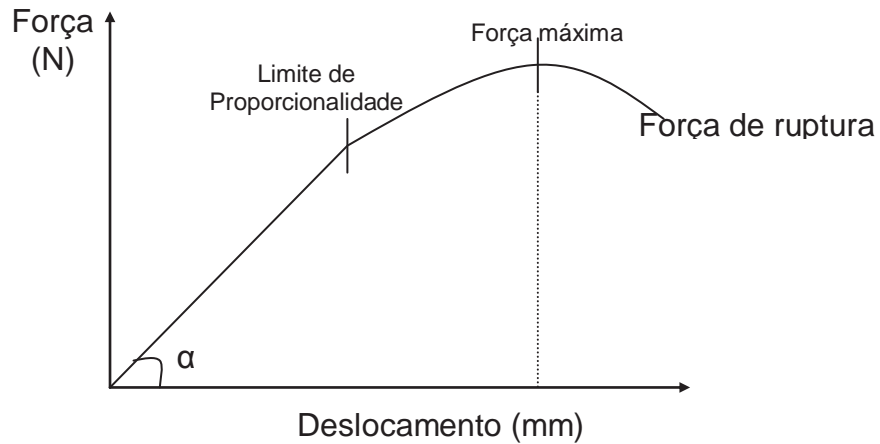
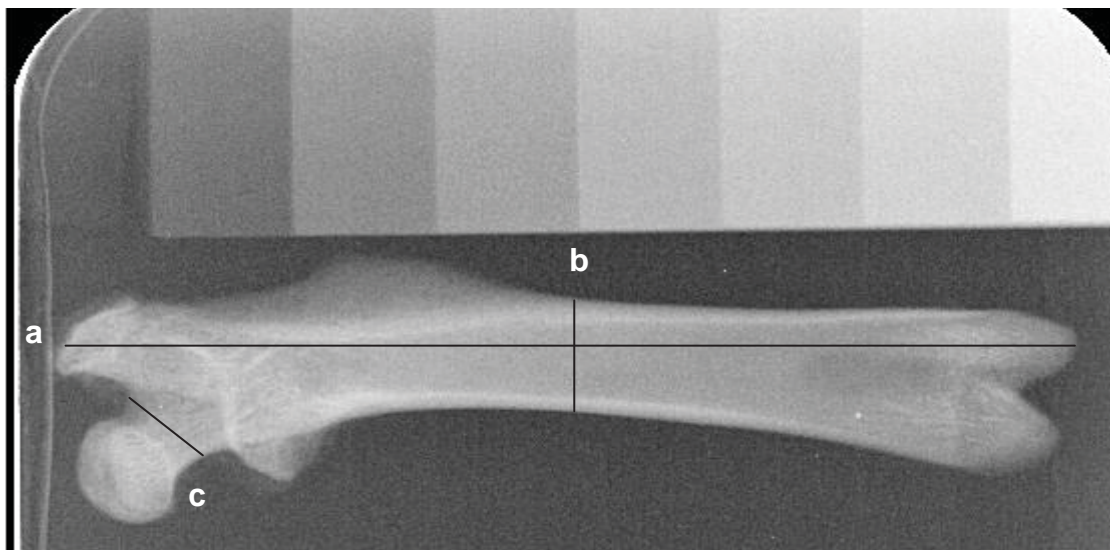


Figura 2. Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico

### 2.4.3 Análises radiográficas

Os fêmures conservados em solução salina foram radiografados segundo os parâmetros: 50 kV, 10 mA, 40 cm distância filme-foco, 0,2 segundos de exposição (GE Mobile 100 X ray - Milwaukee, WI, USA). As imagens radiográficas foram escaneadas através de DIGORA (Soredex, Finland). O programa computacional Image J® 1.44 p foi usado para realizar medidas dos ossos, considerando comprimento longitudinal e transversal da diáfise e colo do fêmur (Figura 3). Todo o procedimento foi realizado no Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da FOA/UNESP.



**Figura 3.** Mensuração (cm) de partes do fêmur: (a) comprimento longitudinal; (b), largura da diáfise e (c) comprimento do colo transversal.

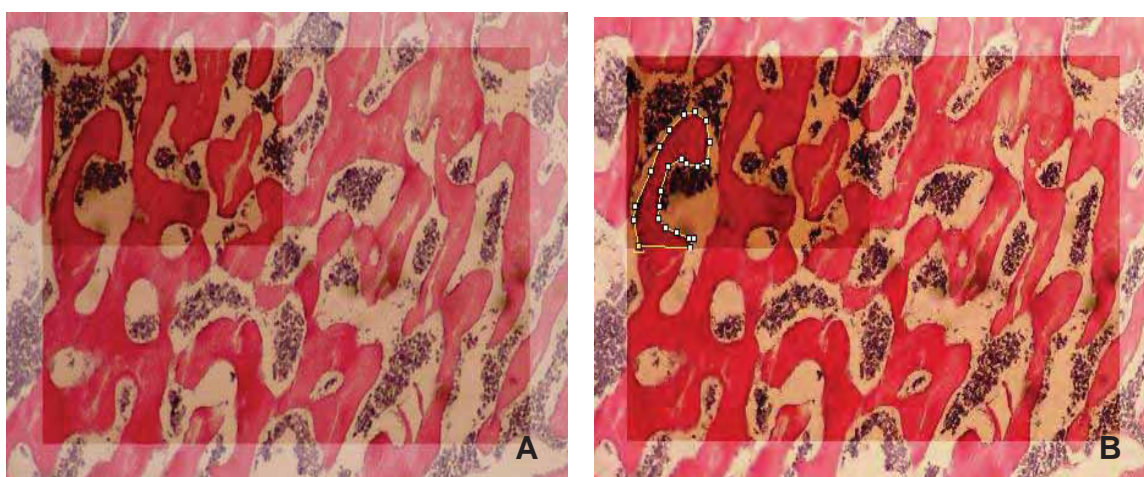
A densidade radiográfica ( $P_i$ ) de cada imagem obtida no monitor do computador foi calculada, utilizando-se como referência áreas pré-determinadas dos fêmures (CARVALHO et al., 2007).

#### 2.4.4 Histomorfometria

Após a fixação em formalina neutra (10% p/v) durante 24 horas em temperatura ambiente, as peças (fêmures direitos) foram lavadas em água corrente por 12 horas e descalcificadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (5% p/v). Após a descalcificação permaneceram em água corrente por 24 horas, foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Nos blocos obtidos foram efetuados cortes longitudinais semi-seriados das epífises proximais e terço médio dos fêmures para análises, com 6 micrômetros de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina. Para a captação das imagens utilizou-se o microscópio óptico com objetiva de aumento 20x Olympus CX31 acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens obtidas (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) foram analisadas por software analisador de imagens (Image J). Os cortes histológicos e montagem das lâminas foram realizados no Laboratório de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da FOA-UNESP.



Para a obtenção da porcentagem do osso trabecular (OT), foram marcados quatro campos (A, B, C e D) imediatamente abaixo da cartilagem de crescimento das cabeças dos fêmures (Fig. 4A). Em cada campo foi obtido um valor de área total =  $452.488\mu\text{m}^2$  ( $\Delta$  total). Através de uma ferramenta auxiliar presente no software Image J<sup>®</sup> utilizado neste estudo, seguiu-se a delimitação e a mensuração do tecido ósseo trabecular, com auxílio de uma caneta cursor digital (Fig. 4B). A área de tecido ósseo obtida foi convertida em proporção de tecido ósseo através da fórmula % de tecido ósseo:  $OT = \Delta$  obtida na mensuração  $\times 100/452.488$  ( $\Delta$  total). Após serem estabelecidas as proporções de tecido ósseo das quatro regiões, foi feita a média da proporção de A, B, C e D correspondentes à cabeça do fêmur. Essa média foi posteriormente utilizada para o processamento estatístico.

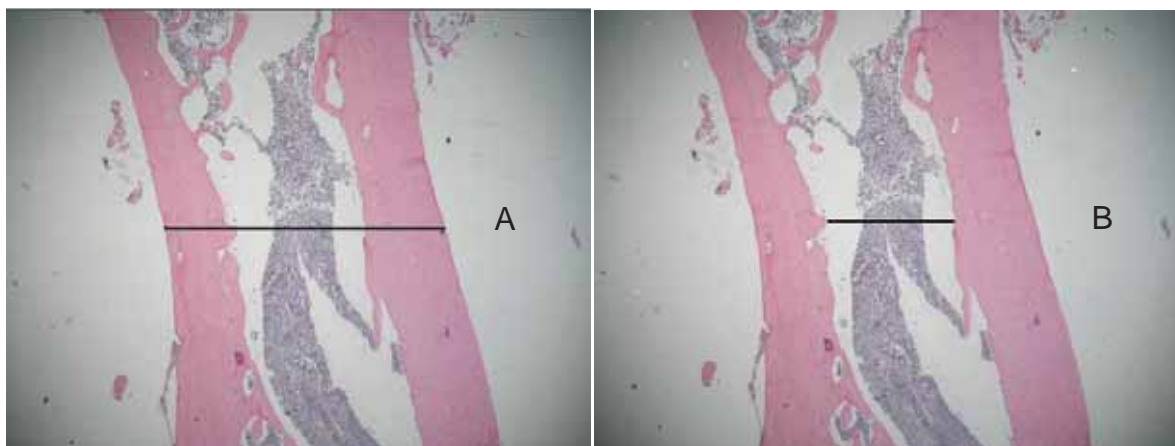


**Figuras 4A e B:** Cortes histológicos longitudinais da cabeça do fêmur, abaixo da cartilagem de crescimento (A) marcação em áreas para mensurações; (B) mensuração da área trabecular.

As mesmas áreas acima indicadas (Fig. 4 A e B) foram utilizadas como modelo padrão para o cálculo da espessura ( $\mu\text{m}$ ), do espaçamento ( $\mu\text{m}$ ) e do número de trabéculas, por meio do mesmo programa computacional.

A espessura do osso cortical ( $E_c$ ) foi analisado através da medição da espessura total  $\mu\text{m}$  ( $E$ ) subtraída da espessura endostal  $\mu\text{m}$  ( $e$ )/2, realizada no terço médio da diáfise femoral dos animais estudados (Figs. 5A e B). A partir dos dados obtidos foram calculadas as médias das espessuras corticais encontradas por grupo.





**Figuras 5A e B:** Marcação em cortes longitudinais do terço médio da diáfise do fêmur para mensuração da espessura cortical  $E_c$  ( $\mu\text{m}$ ): (A) espessura total E; (B) espessura endostal e.

## 2.5 Determinação da concentração de polifenóis nos chás

O total de polifenóis foi estimado pelo método de Folin modificado ((ARABBI et al., 2004). Para o preparo das infusões foram utilizados sachês comerciais Leão® com 1,6g cada, em 100mL de água à 80°C. A infusão permaneceu abafada por 10 minutos e após o resfriamento foi feita a tomada de ensaio (20  $\mu\text{L}$ ). Foram adicionados às amostras 1,58 mL de água deionizada e 100  $\mu\text{L}$  do reativo de *Folin Ciocalteu*. Após um período de incubação de 1-8 minutos foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  solução de carbonato de sódio. A reação foi mantida 2 horas e temperatura ambiente e a absorbância lida em 765 nm (Hitashi U1100). Ácido gálico foi utilizado como padrão.

## 2.6 Análise estatística dos dados

Os dados foram expressos como Média  $\pm$  erro padrão da média e apresentaram distribuição normal, sendo submetidos à análise de variância

(ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando-se o programa Graph-Pad Prisma. Foi estabelecido como nível de significância 5%.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Ingestões de ração, de solução de sacarose (30% p/v) e consumo energético total

Na tabela 1 observa-se que o consumo de ração (g/animal/dia) foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) nos grupos S, SCV e SCB, em relação aos grupos que não tiveram livre acesso à solução de sacarose. Quando comparados o consumo diário de ração e de sacarose (mL/animal/dia) nos grupos S, SCV e SCB, não foram observadas diferenças significativas. Apesar do reduzido consumo de ração pelos grupos tratados com sacarose, quanto ao consumo total de líquidos, os grupos não diferiram. Um maior consumo energético (Kcal/animal/dia) foi observado nos grupos que ingeriram sacarose ( $p < 0,001$ ).

Tabela 1. Consumo de ração, solução de sacarose, total de líquido e energético em animais que receberam diferentes tratamentos.

	C	S	SCV	SCB	CV	CB
<b>Ração</b> (g/an./dia)	25,90 ± 0,78 <sup>a</sup>	16,47 ± 0,65 <sup>b</sup>	17,13 ± 0,43 <sup>b</sup>	16,70 ± 0,41 <sup>b</sup>	23,94 ± 0,56 <sup>a</sup>	24,19 ± 0,40 <sup>a</sup>
<b>Sacarose</b> (mL/an./dia)	—	43,22 ± 2,59	44,41 ± 2,79	43,25 ± 2,93	—	—
<b>Total de líq.</b> (mL/an./dia)	47,04 ± 0,86	55,97 ± 2,71	55,62 ± 3,12	55,34 ± 2,66	46,91 ± 2,66	46,86 ± 0,96
<b>Energético</b> (Kcal/an./dia)	90,63 ± 2,74 <sup>a</sup>	109,50 ± 2,31 <sup>b</sup>	113,25 ± 2,78 <sup>b</sup>	110,33 ± 2,35 <sup>b</sup>	83,80 ± 1,96 <sup>a</sup>	84,66 ± 1,42 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média ± EPM (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. Grupos: C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

### 3.2 Circunferências abdominal e torácica

Não foram observadas diferenças significativas quando comparados os valores de circunferência torácica (cm) dos animais. Com relação à circunferência abdominal, os animais tratados com sacarose tiveram aumento de 7,69% nesse parâmetro em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Os animais tratados com chá verde e sacarose (SCV) mostraram uma redução de 11,09% quando comparado ao grupo S ( $p < 0,001$ ) e o grupo que recebeu apenas chá verde (CV) obteve redução de 11,09% em relação ao grupo S ( $p < 0,001$ ). Já nos animais tratados com chá branco e sacarose (SCB) a redução foi de 6,64% em relação a S ( $p < 0,01$ ), enquanto que o grupo que recebeu apenas o chá branco (CB) teve os valores reduzidos em 12,04% em relação a S ( $p < 0,001$ ). Não foram observadas diferenças significativas nos valores de circunferência abdominal quando comparado o grupo C com CV, CB, SCV e SCB. (Tabela 2).

Tabela 2. Circunferência abdominal e torácica de animais que receberam diferentes tratamentos:

	C	S	SCV	SCB	CV	CB
<b>Torácica</b> (cm)	15,87 ± 0,30	16,42 ± 0,38	15,34 ± 0,26	16,08 ± 0,41	15,32 ± 0,23	15,20 ± 0,29
<b>Abdominal</b> (cm)	17,63 ± 0,23 <sup>a</sup>	19,16 ± 0,24 <sup>b</sup>	16,98 ± 0,15 <sup>a</sup>	17,83 ± 0,29 <sup>a</sup>	16,98 ± 0,22 <sup>a</sup>	16,80 ± 0,30 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média ± EPM (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

### 3.3 Ganho de massa corpórea e massa do tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal

Em relação ao ganho de massa ao dia por animal (gramas), verifica-se (tabela 3) que no grupo SCV houve uma redução ( $p < 0,001$ ) de 25,81% em relação a C e 27,68% em relação ao grupo S. Já os animais do grupo SCB apresentaram

reduções ( $p < 0,001$ ) de 24,29% e 26,19% em relação a C e S, respectivamente. Os grupos que receberam apenas o tratamento com os chás também obtiveram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do ganho de massa corpórea, quando comparados aos grupos C e S. As reduções foram de 25,75% (CV versus C) e 27,62% (CV versus S) 27,95% (CB versus C) e 29,76% (CB versus S). Não houve diferença entre os resultados dos grupos SCV, SCB, CV e CB.

Quanto à massa do tecido adiposo branco retroperitoneal (RETRO), expressa em gramas/100g de m.c., no grupo tratado com sacarose foi verificado aumento de 50,47% em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), como pode ser observado na tabela 3. A administração dos chás promoveu redução no RETRO dos grupos tratados com sacarose, quando comparados ao grupo que só recebeu sacarose, o que fez com que os valores ficassem próximos ao grupo C. O grupo SCV obteve redução de 48,25% e o grupo SCB 49,12 % em relação ao grupo S ( $p < 0,001$ ). Os animais que receberam como tratamento apenas chá verde ou branco mostraram diminuição do RETRO de 56,35% e 58,09% respectivamente em relação ao grupo S. Quando comparados os grupos CV e CB com C, os chás promoveram reduções de 11,86% e 15,37% respectivamente, porém sem significância estatística.

O consumo de sacarose resultou em aumento de 35,38% na massa do tecido adiposo branco epididimal (EPI), em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). A administração de chá verde e sacarose reduziu em 28,09% os valores em relação a S ( $p < 0,001$ ) e o uso do chá branco e sacarose em 27,14% ( $p < 0,001$ ). Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos C, SCV e SCB. O consumo dos chás mostrou uma redução do EPI em relação ao grupo C, sendo a diferença de 25,77% no grupo CV ( $p < 0,05$ ) e de 31,10% no grupo CB ( $p < 0,001$ ). As diferenças foram mais pronunciadas quando confrontados S e CV (52,04%,  $p < 0,001$ ) e S com CB (55,48%,  $p < 0,001$ ), como mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Ganho de massa corpórea e massa do tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal de animais que receberam diferentes tratamentos:

	C	S	SCV	SCB	CV	CB
<b>Ganho de m.c.</b> (g/animal/dia)	3,14 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,37 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,33 ± 0,10 <sup>b</sup>	2,26 ± 0,71 <sup>b</sup>
<b>Retroperitoneal</b> (g/100g m.c.)	1,13 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,18 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,8 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>Epididimal</b> (g/100g m.c.)	1,10 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>c</sup>

Resultados expressos como média ± EPM (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

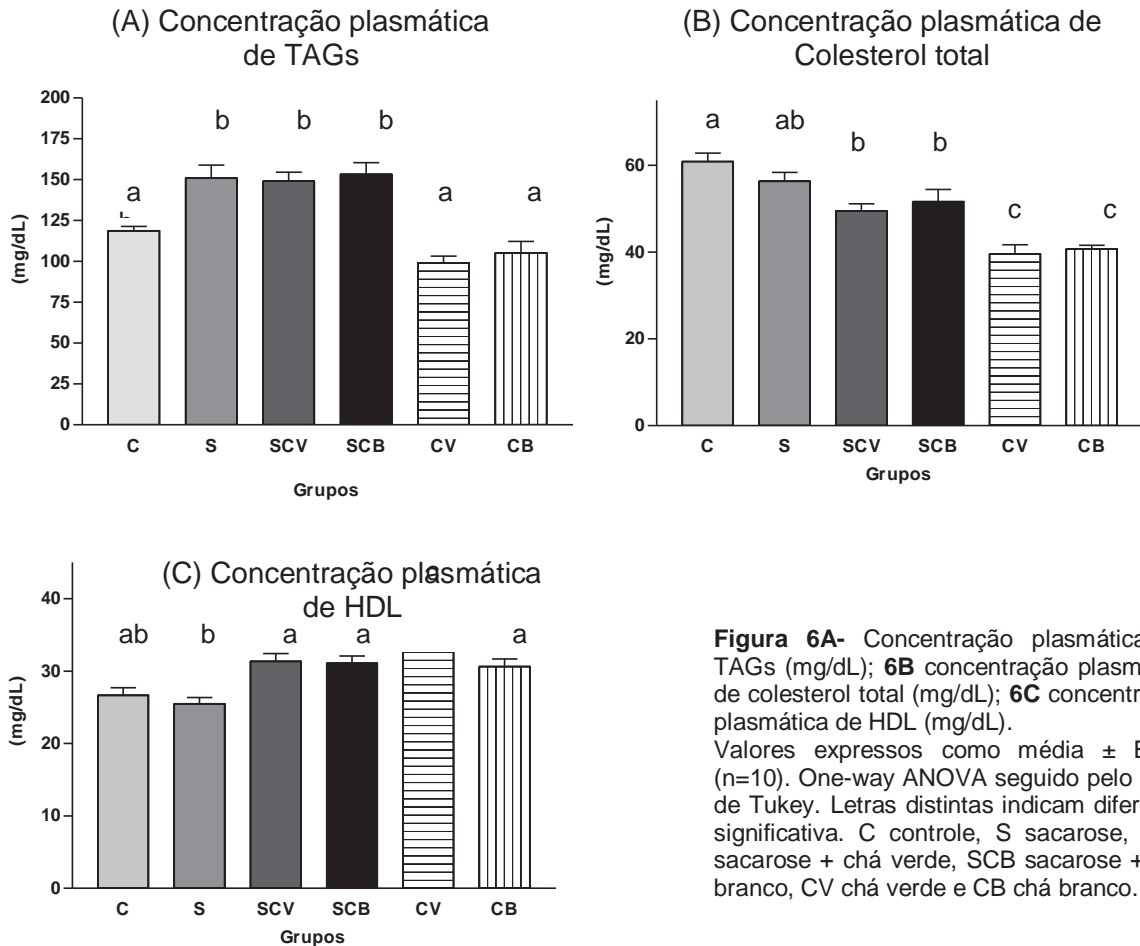
### 3.4 Análises dos componentes plasmáticos

A análise do plasma dos animais pertencentes aos grupos S, SCV e SCB mostrou um aumento na concentração de triacilgliceróis (TAGs), em relação ao grupo C ( $p < 0,01$ ). O tratamento com o chá verde (grupo CV) resultou em uma diminuição dos TAGs ( $p < 0,001$ ) quando comparado com os grupos S (34,29%), SCV (33,45%) e SCB (35,28%) respectivamente. O grupo CB, também obteve redução dos TAGs ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos S (30,21%), SCV (29,32%) e SCB (31,26%). Os grupos CV e CB, não diferiram em relação ao grupo C (Fig. 6A).

Em relação às concentrações plasmáticas do colesterol total, o grupo CV mostrou diminuição quando comparado aos grupos C (34,96%;  $p < 0,001$ ), S (29,74%;  $p < 0,001$ ), SCV (20,04%;  $p < 0,01$ ) e SCB (23,34%;  $p < 0,01$ ). O tratamento com o chá branco levou à redução do colesterol quando comparado aos grupos C, S, SCV e SCB, em 33,01% ( $p < 0,001$ ), 27,63% ( $p < 0,001$ ), 17,64% ( $p < 0,01$ ) e 21,04% ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Fig. 6B). O grupo SCV mostrou diminuição em 18,65% em relação ao grupo C ( $p < 0,01$ ) e o grupo SCB apresentou diminuição em relação à C em 15,15% ( $p < 0,05$ ).

Nas análises do plasma foram encontradas variações entre os grupos quanto à concentração do HDL. Os valores no grupo CV foram maiores quando comparados aos grupos: C - 28,21% ( $p < 0,001$ ); S - 31,31% ( $p < 0,001$ ); SCV -

15,52% ( $p < 0,01$ ); SCB - 19,40% ( $p < 0,01$ ) e CB - 17,46% ( $p < 0,01$ ). Os grupos SCV e SCB mostraram maiores concentrações de HDL ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo S (18,69 e 17,98% respectivamente). Os valores dos grupos C e S não diferiram significativamente (Fig. 6C).

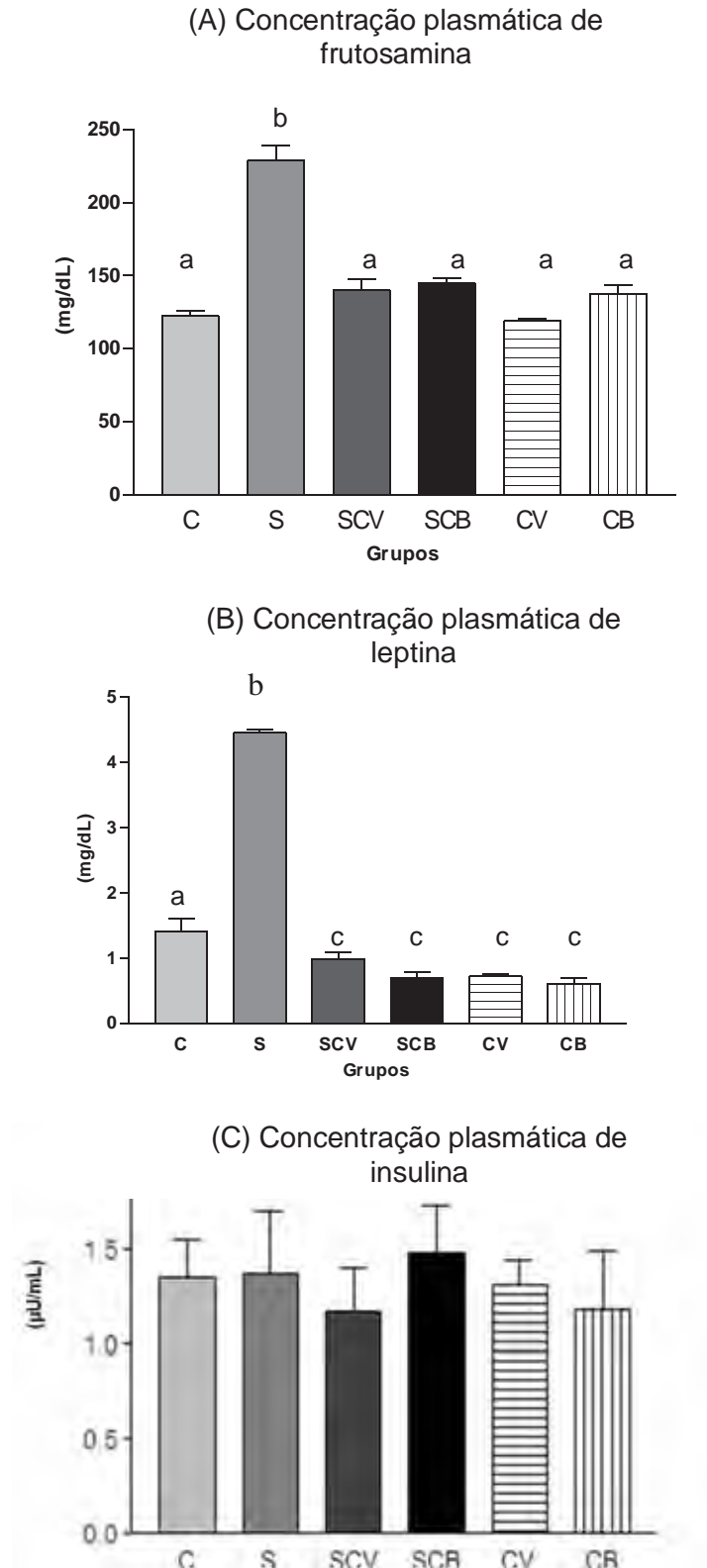


**Figura 6A-** Concentração plasmática de TAGs (mg/dL); **6B** concentração plasmática de colesterol total (mg/dL); **6C** concentração plasmática de HDL (mg/dL). Valores expressos como média  $\pm$  EPM, (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

Os valores da frutossamina encontrados no plasma dos animais do grupo S foram maiores ( $p < 0,001$ ) quando comparados aos grupos C, SCV, SCB, CV e CB, em 46,50%, 38,81%, 36,80%, 47,98% e 39,81% respectivamente (Fig. 7A).

A figura 7B mostra os resultados obtidos em relação às concentrações de leptina no plasma dos animais. Observa-se aumento significativo ( $p < 0,001$ ) no grupo S em relação a C (68,9%), SCV (77,77%), SCB (84,21%), CV (83,74%) e CB (86,21%). Quando comparados ao grupo C, os grupos tratados com chá apresentaram reduções de 30,33% (SCV,  $p < 0,05$ ); 50,52% (SCB,  $p < 0,001$ ); 49,04% (CV,  $p < 0,001$ ) e 56,79% (CB,  $p < 0,001$ ). Em relação aos resultados das análises

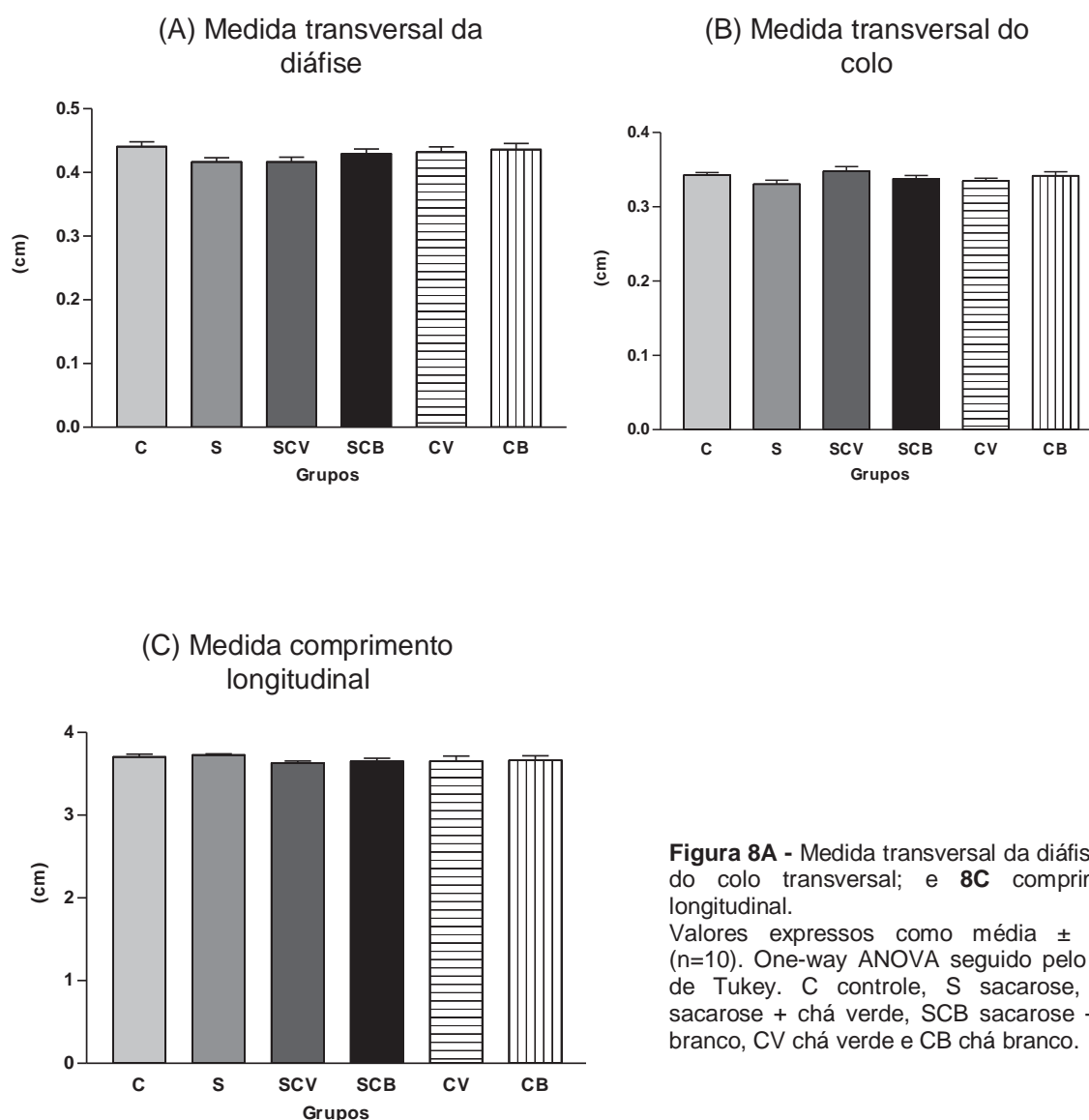
das concentrações plasmáticas de insulina (Fig. 7C) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 7A, B e C** Concentrações plasmáticas de frutossamina (mg/dL) (A), concentração plasmática de leptina (mg/dL) (B), concentração plasmática de insulina ( $\mu$ U/mL) (C) de animais que receberam diferentes tratamentos. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco

### 3.5 Análises dos parâmetros ósseos

Através das imagens radiográficas foram realizadas mensurações (cm) das regiões transversais da diáfise e do colo dos fêmures bem como do comprimento longitudinal. Como observado nas figuras 8A, B e C os parâmetros não foram diferentes nos tratamentos utilizados



As análises de densitometria por DXA mostraram que não foram encontradas diferenças significativas na DMO, CMO e área total dos fêmures dos



animais estudados. Ausência de diferenças também foi observada quanto analisada a DMO e a CMO em regiões específicas das estruturas (Tabela 4).

Tabela 4. DXA dos fêmures de animais que receberam diferentes tratamentos:

	C	S	SCV	SCB	CV	CB
<b>DMO Total</b> (mg/cm <sup>2</sup> )	0,19 ± 0,006	0,20 ± 0,004	0,18 ± 0,006	0,19 ± 0,005	0,19 ± 0,005	0,19 ± 0,003
<b>CMO Total</b> (mg)	0,34 ± 0,015	0,37 ± 0,011	0,32 ± 0,012	0,32 ± 0,013	0,31 ± 0,009	0,32 ± 0,015
<b>ÁREA Total</b> (cm <sup>2</sup> )	1,68 ± 0,053	1,84 ± 0,036	1,72 ± 0,056	1,66 ± 0,046	1,67 ± 0,036	1,68 ± 0,068
<b>DMO Ep. prox.</b> (mg/cm <sup>2</sup> )	0,21 ± 0,009	0,21 ± 0,005	0,20 ± 0,007	0,21 ± 0,006	0,19 ± 0,007	0,20 ± 0,005
<b>CMO Ep. prox.</b> (mg)	0,09 ± 0,003	0,10 ± 0,004	0,09 ± 0,003	0,09 ± 0,002	0,09 ± 0,003	0,10 ± 0,002
<b>DMO Diáfise</b> (mg/cm <sup>2</sup> )	0,19 ± 0,004	0,18 ± 0,003	0,18 ± 0,006	0,18 ± 0,005	0,19 ± 0,006	0,18 ± 0,003
<b>CMO Diáfise</b> (mg)	0,11 ± 0,002	0,11 ± 0,005	0,10 ± 0,005	0,10 ± 0,005	0,11 ± 0,005	0,10 ± 0,005
<b>DMO Ep. dist.</b> (mg/cm <sup>2</sup> )	0,22 ± 0,004	0,22 ± 0,006	0,21 ± 0,005	0,21 ± 0,005	0,19 ± 0,007	0,20 ± 0,005
<b>CMO Ep. dist.</b> (mg)	0,09 ± 0,003	0,10 ± 0,002	0,10 ± 0,003	0,09 ± 0,002	0,10 ± 0,003	0,10 ± 0,002

Ep. – epífise; dist. - distal.

Resultados expressos como média ± EPM, (n=10). One-way ANOV seguido pelo teste de Tukey. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

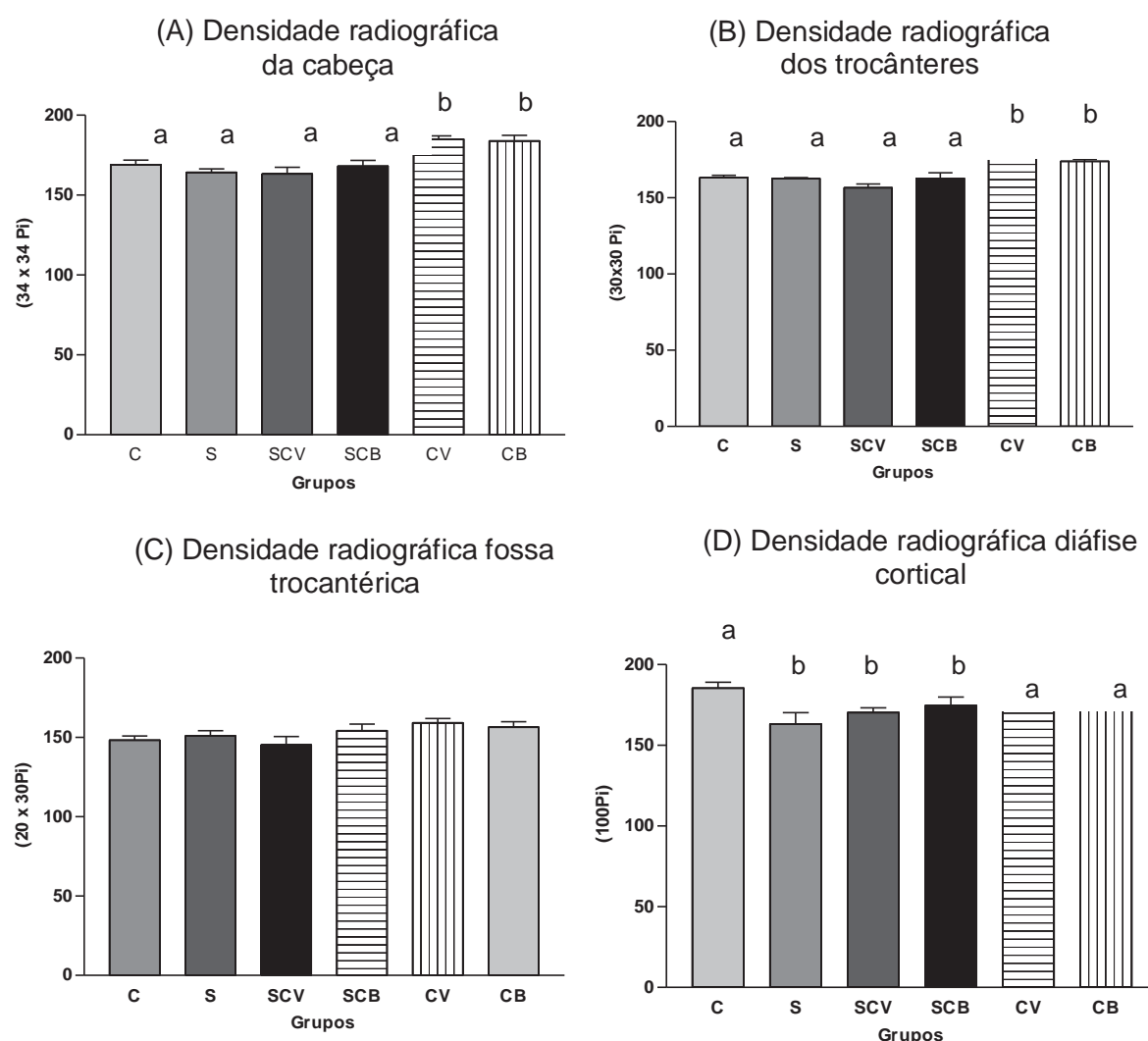
Quando observados os resultados da densidade radiográfica em áreas diferentes dos fêmures, os grupos CV e CB mostraram maior DMO nas regiões com grande porcentagem de tecido ósseo trabecular, como cabeça e trocânter (Figs.9A e B), quando comparados aos demais grupos. Na região da cabeça as diferenças encontradas em relação ao grupo CV foram de: 8,49% - grupo C (p<0,05); 11,19%- grupo S (p<0,001); 11,73% - grupo SCV (p<0,001) e 9,08% grupo SCB (p<0,01). Quando comparados os valores de densidade radiográfica do grupo CB com os outros tratamentos, as diferenças foram de: 8,04% - grupo C (p<0,05); 10,65% - grupo S (p<0,001); 11,30% - grupo SCV (p<0,001) e 8,64% - grupo SCB (p<0,05).

Os aumentos da DMO nos trocânteres dos fêmures dos animais do grupo CV em relação aos grupos C, S, SCV e SCB, foram de 7,79%; 8,07%; 6,49% e 8,07% respectivamente, considerando-se p<0,001. Os animais do grupo CB

apresentaram aumento da DMO em relação aos grupos C - 6,15% ( $p < 0,01$ ); S - 6,44% ( $p < 0,001$ ); SCV - 4,83% ( $p < 0,001$ ) e SCV- 6,44% ( $p < 0,01$ ).

Os resultados de DMO na densidade radiográfica da fossa trocântérica não diferiram entre os grupos (Fig.9C).

A figura 9D apresenta a análise dos resultados da DMO do osso cortical na diáfise média dos fêmures dos animais estudados. Foi encontrada uma diminuição significativa no grupo que recebeu sacarose (S) em relação aos grupos: C - 12,02% ( $p < 0,05$ ); CV - 16,26% ( $p < 0,001$ ) e CB - 18,07% ( $p < 0,001$ ). Os grupos SCV e SCB também diferiram em relação aos grupos que foram tratados apenas com os chás. No grupo SCV as reduções foram de 12,67% e 14,55% quando comparado à CV e CB, respectivamente ( $p < 0,01$ ). No grupo SCB foi verificada diminuição de 10,41% ( $p < 0,01$ ) em relação à CV e de 12,34% em comparação a CB ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9A** - Densidade radiográfica cabeça (34x34Pi); **9B** densidade radiográfica trocânter (30x30Pi); **9C** densidade radiográfica fossa trocântérica (20x30Pi); **9D** densidade radiográfica diáfise média (100Pi). Valores expressos como média  $\pm$  EPM, (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas

A tabela 4 mostra os resultados obtidos durante os ensaios mecânicos. Os valores de força máxima durante os testes de flexão e de compressão não diferiram entre os grupos, assim como os valores obtidos de rigidez durante o teste de flexão (Tabela 5).

A rigidez de compressão foi significativamente maior nos grupos CV e CB em relação aos demais grupos. Os valores de CV foram 26,17% ( $p < 0,05$ ) mais elevados em relação a C; 49,56% ( $p < 0,001$ ) em relação a S; 35,73% ( $p < 0,01$ ) em comparação a SCV e 35,31% ( $p < 0,01$ ) em relação a SCB. Quando comparado aos demais grupos, o valor de rigidez de compressão de CB foi 25,41; 49,09; 35,07 e 34,64% maior ( $p < 0,01$ ) do que os valores de S, SCV e SCB respectivamente. O grupo S foi significativamente menor em relação ao grupo C em 31,68% ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos SCV, SCB, C e S ( $p > 0,05$ ).

Tabela 5. Força máxima (N) e rigidez (N/mm), durante a flexão e a compressão dos fêmures de animais que receberam diferentes tratamentos:

	C	S	SCV	SCB	CV	CB
<b>F.M. flexão (N)</b>	120,04 ± 5,56	123,27 ± 6,49	118,76 ± 2,66	116,96 ± 2,63	113,73 ± 5,90	118,10 ± 5,47
<b>F.M. comp. (N)</b>	141,58 ± 9,98	142,23 ± 7,75	139,40 ± 10,78	146,50 ± 5,36	136,50 ± 8,58	130,16 ± 9,19
<b>Rig. flexão (N/mm)</b>	262,85 ± 7,17	256,74 ± 9,70	271,54 ± 9,65	274,40 ± 7,39	245,88 ± 9,78	238,44 ± 10,05
<b>Rig. comp. (N/mm)</b>	143,64 ± 6,39 <sup>a</sup>	98,13 ± 2,73 <sup>b</sup>	125,04 ± 8,73 <sup>ab</sup>	125,86 ± 2,52 <sup>ab</sup>	194,57 ± 8,56 <sup>c</sup>	192,59 ± 19,72 <sup>c</sup>

F.M. força máxima; Rig. – rigidez; comp. – compressão. Resultados expressos como média ± EPM, (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

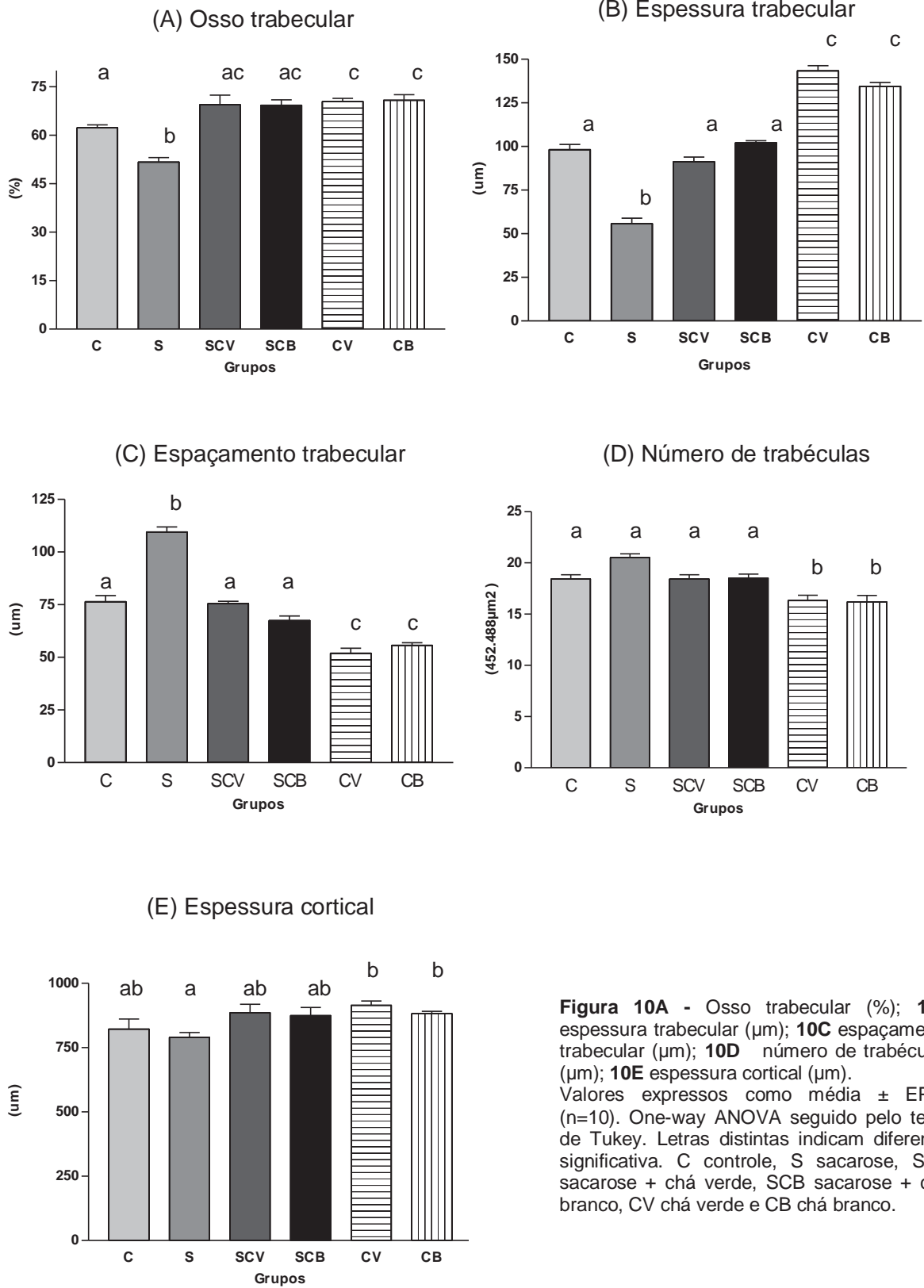
Na análise histomorfométrica o grupo S apresentou redução significativa do percentual de osso trabecular do fêmur, em relação aos grupos C (17,07%,  $p < 0,01$ ); SCV (25,57%,  $p < 0,001$ ); SCB (25,41%,  $p < 0,001$ ); CV (26,63%,  $p < 0,001$ ) e CB (27,06%,  $p < 0,001$ ). Os grupos que receberam os chás (CV e CB) apresentaram aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) de 11,52 e 12,04% respectivamente, do parâmetro estudado, quando comparados ao grupo C. Os grupos que receberam os chás mais sacarose não diferiram dos grupos C, CV e CB ( $P > 0,05$ ), como mostra a figura 10A.

Quanto à espessura trabecular o grupo S mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) em relação aos demais: grupo C 43,20%; grupo SCV 38,84%; grupo SCB 45,36%; grupo CV 61,13% e grupo CB 58,53%. Os grupos que receberam os chás, CV e CB, mostraram um aumento na espessura de suas trabéculas em relação aos demais com  $p < 0,001$ : grupo C 31,52%; grupo SCV 35,98% e grupo SCB 28,82%, quando observado o grupo CV. Quando relacionado grupo CB com os demais os resultados ficaram mais elevados em: 26,98% (grupo C); 32,19 (grupo SCV) e 24,10% (grupo SCB). Os grupos SCV e SCB não diferiram ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo C (Fig.10B).

Na figura 10C pode-se observar que o grupo S apresentou maior espaçamento intertrabecular ( $p < 0,001$ ) quando comparado a C (30,26%), SCV (31,14%), SCB (38,36%), CV (52,62%) e CB (49,15%). Quando observados os grupos que receberam apenas os chás como tratamento, as diferenças em relação ao grupo CV foram de 32,05% (C,  $p < 0,001$ ), 31,19% (SCV,  $p < 0,001$ ) e SCB (23,12%,  $p < 0,001$ ). Quando relacionados os valores ao grupo CB as diferenças encontradas foram de 27,09% (C;  $p < 0,001$ ), 26,16% (SCV,  $p < 0,001$ ) e 17,51% (SCB,  $p < 0,01$ ). Os valores dos grupos SCV e SCB não diferiram em relação ao grupo C ( $p > 0,05$ ).

A figura 10D mostra que o número de trabéculas por  $452.488\mu\text{m}^2$  foi menor nos grupos que receberam os chás em relação aos demais. As reduções em CV foram de 11,5% ( $p < 0,05$ ) em relação a C, 20,43% ( $p < 0,001$ ) em relação a S, 11,50% ( $p < 0,05$ ) comparado a SCV e 11,83% ( $p < 0,05$ ) comparado a SCB. Já no grupo CB houve reduções de 12,15% ( $p < 0,05$ ); 21,08% ( $p < 0,001$ ), 12,15% ( $p < 0,05$ ) e 12,48% ( $p < 0,05$ ), em relação aos grupos C, S, SV e SCB respectivamente.

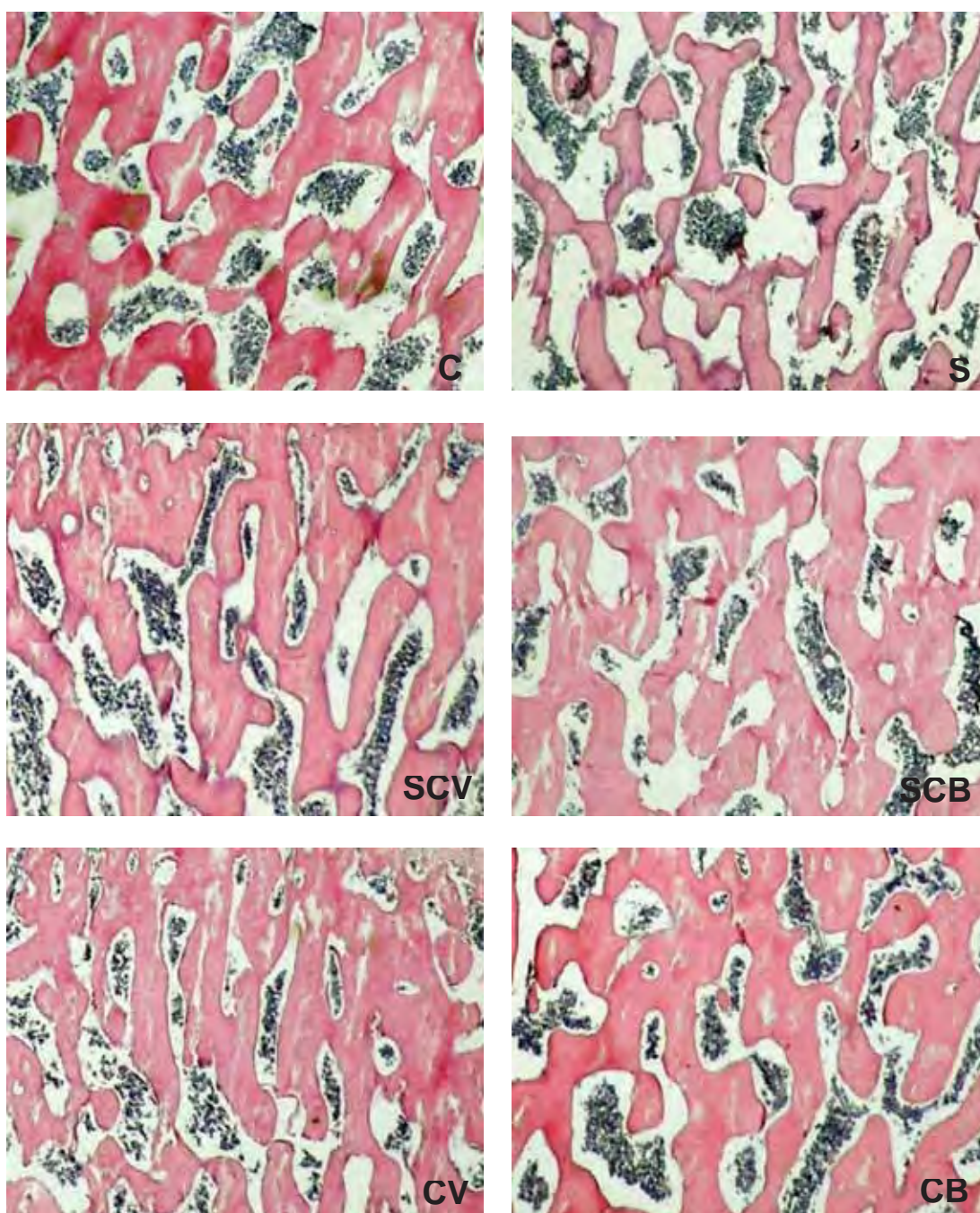
Em relação à mensuração da espessura cortical ( $\mu\text{m}$ ), a figura 10E mostra que houve no grupo S diminuição de 13,69% ( $p < 0,01$ ) em relação a CV e de 10,46% ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CB.



**Figura 10A** - Osso trabecular (%); **10B** espessura trabecular (µm); **10C** espaçamento trabecular (µm); **10D** número de trabéculas (µm); **10E** espessura cortical (µm). Valores expressos como média ± EPM, (n=10). One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.



A figura 11 mostra visivelmente que os diferentes tratamentos promoveram diferenças na microarquitetura óssea femoral dos animais estudados. Trabéculas mais espessas e intercomunicantes com diminuição do espaço intertrabecular foram mais evidentes nos grupos que receberam os chás acrescidos ou não de sacarose (SCV, SCB, CV E CB). No grupo que recebeu sacarose (S) pôde-se observar que houve uma redução das espessuras trabeculares e aumento dos espaços intertrabeculares.



**Figura 11.** Secções longitudinais de osso trabecular na cabeça femoral, mostrando disposição das trabéculas ósseas, espessura e espaçamento, dos diferentes grupos estudados: grupo C ; grupo S; grupo SCV ; grupo SCB ; grupo CV e grupo CB. C controle, S sacarose, SCV sacarose + chá verde, SCB sacarose + chá branco, CV chá verde e CB chá branco.

### **3.6 Resultados das análises das concentrações de polifenóis nos chás**

De acordo com as análises laboratoriais os resultados obtidos foram: 10,29g/100g de chá verde e 8,45g/ 110g de chá branco, após a conversão respeitando a dose administrada dos chás 1250mg/Kg m.c. ,os animais que consumiram chá verde receberam 128mg/Kg de m.c. de polifenóis e os animais dos grupos que receberam chá branco ingeriram 105mg/Kg de m.c. de polifenóis.

## **4 DISCUSSÃO**

Este estudo teve como objetivos verificar os efeitos de chás de *C. sinensis* no metabolismo ósseo de animais em fase de crescimento e ainda avaliar se os danos causados ao tecido ósseo pelo consumo excessivo de carboidratos, poderiam ser minimizados ou inibidos pelos chás.

Optou-se com base em trabalhos da literatura (HASEGAWA et al., 2003; CHEN et al., 2009), por utilizar nos tratamentos dos animais infusões de chás nas formas comerciais, por serem preparações de maior disponibilidade e mais consumidas pela população em geral.

As doses utilizadas de chás, assim como as formas de administração, nos estudos disponíveis na literatura são variáveis. A dose adotada para este estudo foi baseada em experimento piloto, no qual as infusões eram disponibilizadas em bebedouros, aos quais os animais tiveram livre acesso. Após o cálculo da dose diária média ingerida por animal, o preparo da infusão foi adequado para que em uma única administração diária os animais pudessem receber a mesma dose da ingestão espontânea. O uso de sonda orogástrica foi adotado por possibilitar maior controle sobre a dose diária consumida por cada animal, que foi de 1.250 mg/Kg de massa corpórea.

A produção de *C. sinensis* em solo brasileiro é pequena devido às condições climáticas e a empresa escolhida obtém as folhas de fornecedores de diversos países. Por não se tratar de preparações com fins terapêuticos, as análises exigidas em nosso país para a comercialização dos chás na forma de sachês não envolvem as dosagens dos seus componentes bioativos. Sendo assim, para padronização foram utilizados durante o tratamento de todos os animais do experimento sachês de um único lote de cada tipo de chá.

Os componentes bioativos dos chás que atuam no metabolismo ósseo já são conhecidos. Sabe-se que a presença de polifenóis, principalmente catequinas estão relacionadas às ações metabólicas (MATSUYAMA et al., 2008). No presente trabalho optou-se por determinar apenas a concentração total de polifenóis nos chás. As análises foram realizadas pelo método de *Folin Ciocalteu* (ARABBI et al., 2004), sendo os dados expressos em relação a 100g de chá. De acordo com as doses administradas, foi verificado que os animais que consumiram o chá verde e o chá branco ingeriram diariamente 10,29 mg/100g m.c. e 8,45mg/100g m.c. de polifenóis respectivamente.

A administração dos polifenóis obtidos do chá verde (GTP) foi adotada como forma de tratamento em diversos estudos, como pode ser constatado em ampla revisão de literatura (SHEN et al., 2009a). Nesses estudos as doses administradas variaram de 80-400mg/Kg de massa corpórea. Em todos eles foi evidenciado efeito positivo em relação à formação e à microestrutura óssea, com aumento da DMO, da espessura e volume trabecular, da espessura cortical e área dos fêmures.

Embora muitos trabalhos relacionem de forma positiva o consumo de *C. sinensis* ao metabolismo ósseo, em animais jovens e em doses elevadas os efeitos benéficos podem não ocorrer, como mostrou estudo de Iwaniec e colaboradores (2009), colocando em dúvida a segurança do uso dos chás em animais em fase de crescimento.

Devido as controvérsias em relação à segurança do consumo dos chás por animais jovens, optou-se por utilizar neste estudo animais com 40 dias e um tratamento com 8 semanas de duração, período no qual estavam em fase de amadurecimento esquelético, que perdura até os 6 meses de idade (KALU, 1991).

Inúmeros são os relatos na literatura que associam o consumo de sacarose à obesidade e ao metabolismo ósseo, e é cada vez maior a compreensão



a cerca da inter-relação dieta/metabolismo energético/metabolismo ósseo. Sendo assim tomou-se neste trabalho o cuidado de verificar se a forma escolhida de tratamento com a sacarose promoveria as alterações no metabolismo lipídico e energético já esperadas, antes de avaliar os efeitos na estrutura óssea.

Os animais tiveram livre acesso à solução de sacarose 30% (p/v). A escolha da concentração da solução e o tempo de administração foram baseados em trabalho da literatura que evidenciaram os efeitos de dietas com elevadas taxas de carboidratos na inibição da diferenciação osteogênica em células mesenquimais progenitoras, com aumento da adipogênese (STOLZING et al., 2006; CHUANG et al., 2007; AGUIARI et al., 2008). Efeitos semelhantes já haviam sido demonstrados quando utilizadas dietas ricas em carboidratos e lipídeos (PARHAMI et al., 1999).

Pôde-se constatar que a ingestão de sacarose inibiu o consumo de ração e aumentou o consumo energético, fato que pode estar relacionado à preferência dos animais pela solução de sacarose, devido a sua alta palatabilidade (NOVELLI et al 2007). Em função do elevado valor energético da sacarose, em torno de 4 Kcal/g (SCHAEFER et al., 2009), a redução da ingestão de ração não influenciou a massa corporal dos animais. Os resultados corroboram estudo de Tszani e colaboradores (2008), no qual ratas *Sprague-Dawley* com 28 dias de idade foram tratadas com diferentes soluções de carboidratos, dentre as quais sacarose 13%(p/v), por um período de 8 semanas.

Contrariamente, outros trabalhos mostraram que dietas acrescidas de sacarose promoveram aumento da massa corporal dos animais (CHEPULIS; STARKEY, 2008; LORINCZ et al., 2009) porém, nesses estudos as concentrações de carboidratos e de outros constituintes das dietas, o tempo de tratamentos e a idade dos animais foram diferentes dos utilizados no presente trabalho, o que justificaria as divergências de resultados. No estudo de Lorincz e colaboradores (2009) a dieta além da elevada concentração de sacarose (39,5%) também apresentava elevada porcentagem de lipídeos (39,5%). Nos relatos de Chepulis e Starkey (2008) a sacarose foi acrescida à dieta em pó, na concentração de 7,9%, porém o tempo de tratamento dos animais foi longo, 52 semanas, já tendo os animais passado pela fase de amadurecimento das estruturas ósseas (KALU, 1991).

Embora não tenham sido verificadas diferenças no porcentual de ganho de peso dos animais tratados com sacarose em relação ao grupo controle, quando realizadas as medidas da circunferência abdominal, observou-se um aumento em

resposta ao tratamento. Esses dados são complementados pela elevação nos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e no tecido epididimal. Resultados semelhantes foram encontrados por Boqué e colaboradores (2009), em ratos Wistar tratados com solução de sacarose 42% (p/v), por 35 dias. No estudo citado foi verificado aumento da gordura corporal total, hipertrofia do tecido adiposo mesentérico e hiperplasia dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal.

O consumo de *C. sinensis* promoveu diminuição da massa corporal dos animais, mesmo quando consumido concomitantemente com sacarose 30%. Quando observado o comportamento alimentar, os grupos que receberam apenas chás não apresentaram modificações em relação ao controle. Foi evidenciada ainda a capacidade dos chás em reduzir os depósitos de lipídeos, nos animais em tratamento com sacarose. Além da redução da circunferência abdominal a valores semelhantes aos dos animais controle, houve também redução dos depósitos de tecido retroperitoneal e epididimal. Estes resultados estão em concordância com os descritos por Ikeda e colaboradores (2005), que utilizaram como modelo experimental ratos machos *Sprague-Dawley* (6 semanas de idade) e administraram extrato de chá verde (10g/Kg/dieta) adicionado a uma dieta composta por amido de milho durante 23 dias. Após o período de tratamento foram verificadas reduções nos depósitos dos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e mesentérico, bem como redução do ganho de massa final em relação ao grupo controle.

Os efeitos dos chás de *C. sinensis* sobre o ganho de peso e a deposição tecidual de lipídeos estão associados aos polifenóis, mais especificamente as catequinas presentes nas folhas (HARA, 2001; HUNG et al., 2005; IKEDA et al., 2005). Diversos trabalhos utilizam para o tratamento dos animais catequinas purificadas, que são administradas em concentrações e por períodos de tempo variados, através de injeção intraperitoneal, suplementando a ração, ou ainda na forma de cápsulas, em estudos realizados com seres humanos. Outros protocolos utilizam diferentes infusões de chás comerciais (CHEN et al., 2009; HASEGAWA et al., 2003).

Chen e colaboradores (2009) ao analisarem os resultados do seu estudo com animais que receberam durante um período de 6 meses dieta hipercalórica e infusão de chá verde (20g/L) *ad libitum* encontraram após a 15<sup>a</sup> semana uma diminuição na massa de gordura corpórea quando comparados ao grupo controle. Os autores atribuíram os efeitos do chá a diversos fatores, dentre eles a supressão

da diferenciação de pré-apócitos em adipócitos, devido à inibição dos fatores de transcrição PPAR- $\gamma$  (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma  $\gamma$ ) e C/EBP- $\beta$  ( Proteína Ligadora ao Amplificador CCAAT).

Como já relatado o tratamento com sacarose modifica o metabolismo lipídico, resultando em elevação de triacilgliceróis plasmáticos (GRANT et al., 1994) e redução de HDL (FERNANDEZ et al., 1995). Embora neste trabalho a exposição aos chás não tenha impedido a elevação dos triacilgliceróis, foi eficaz em reduzir o colesterol total e aumentar a fração HDL. Deve-se enfatizar a capacidade do chá verde em elevar os níveis de HDL acima dos observados nos animais controle, nos animais que não receberam sacarose. A melhora no perfil lipídico pode ser creditada em partes a redução da absorção de lipídeos pelo intestino, promovida pelo consumo de chá verde ou de suas catequinas (IKEDA et al., 2005).

O consumo de sacarose pelos animais elevou as concentrações de leptina em relação ao grupo controle, uma elevação diretamente relacionada ao aumento dos depósitos de lipídeos. A ingestão dos chás concomitantemente com a sacarose foi capaz de reverter mudanças ocorridas na concentração plasmática de leptina, diminuindo os seus valores a níveis mais baixos que os apresentados pelo grupo controle. Os animais que não tiveram acesso à sacarose, mas que receberam os chás, também apresentaram redução na leptina plasmática. Shen e colaboradores (2011b) em estudo realizados com ratos (3 meses de idade) obesos que receberam GTP (0,1% e 0,5% p/v) na água de beber também evidenciaram a redução da leptina plasmática e alterações no metabolismo lipídico.

Os dados expostos no presente trabalho estão em concordância com a literatura em aspectos relacionados às modificações no metabolismo lipídico, induzidas pela exposição à sacarose, e aos efeitos benéficos da ingestão dos chás em parâmetros do metabolismo lipídico.

A ingestão da sacarose aumentou os picos de glicemia pós-prandial, evidenciados pela análise da frutossamina. Porém não foram observadas variações na insulinemia de jejum em resposta aos tratamentos. O tratamento com chá verde ou branco mostrou-se eficaz no controle da glicemia. A ação dos chás pode ser atribuída à inibição do principal transportador de glicose no epitélio intestinal, denominado transportador de glicose sódio-dependente (SGLT1) pela EGCG (KOBAYASHI et al., 2000).

Neste estudo buscou-se analisar os efeitos da ingestão de chás *C. sinensis* na estrutura óssea de animais em fase de crescimento, bem como a possibilidade dos chás reverterem ou ao menos minimizarem alterações na estrutura óssea resultantes do excessivo consumo de carboidratos. Sendo assim, diversos parâmetros que refletem a qualidade e o metabolismo ósseo foram estudados, nos diferentes grupos experimentais.

Quando comparados os resultados das análises morfométricas dos fêmures estudados, não foram encontradas alterações significativas em relação ao comprimento longitudinal e medidas transversais da diáfise e colo femoral. Resultados semelhantes já haviam sido descritos por Tsanzi e colaboradores (2008). Porém, em animais mais velhos (9 meses) o consumo de sacarose (39,5%) e gorduras (39,5%) por 10 semanas promoveu diminuição do comprimento ósseo (LORINCZ et al., 2009). As discrepâncias nos resultados podem ser explicadas pelas diferenças nas idades dos animais e nos períodos de tratamento.

Em relação ao consumo de *C. sinensis* e crescimento ósseo, o estudo de Iwaniec e colaboradores (2009) mostrou resultados pouco favoráveis, dentre eles a redução dos comprimentos dos fêmures. Os autores concluíram que elevadas doses de GTE durante a fase de crescimento inibiram condrogênese e osteogênese de camundongos, normais ou geneticamente obesos, por mecanismos ainda não completamente elucidados. O tratamento adotado no presente trabalho não reforçou os achados anteriores (IWANIEC et al., 2009), em ratos obesos ou normais, indicando que as ações deletérias na estrutura óssea possam estar associadas às doses de chás. A quantidade de chá administrada pelo autor citado foi equivalente ao consumo de 14 xícaras ao dia, enquanto neste trabalho o consumo foi próximo a uma xícara/dia.

As análises de DMO e CMO pelo DXA não evidenciaram diferenças entre os tratamentos, porém a análise radiográfica (DIGORA) evidenciou redução da DMO no osso cortical dos animais tratados com sacarose, mesmo quando associado ao chá. TJADERHANE E LARMAS (1998) observaram diminuição do DMO dos fêmures e das tíbias de ratos machos e fêmeas com 3 meses de idade, após dieta com alta concentração de sacarose (69%), atribuindo as alterações ao aumento de excreção de  $\text{Ca}^{2+}$  na urina. Estudos anteriores associaram dietas com alta ingestão de açúcares à perda de minerais, por possível redução da reabsorção tubular (LEMANN et al., 1970, ERICSSON et al., 1990). Esperava-se com a administração

dos chás evitar ou reverter a redução da DMO no osso cortical, atribuída ao consumo excessivo de sacarose, o que não ocorreu.

Um efeito positivo do GTP sobre a estrutura óssea de ratos obesos jovens (3 meses) foi descrito recentemente (SHEN et al., 2011b). No trabalho em questão a obesidade foi induzida nos animais por elevado consumo de lipídeos, e a administração do GTP (0,5%) na água ofertada nos bebedouros ocorreu por 16 semanas. A melhora na DMO dos fêmures dos animais foi atribuída, pelos autores, à redução na concentração plasmática de leptina, em resposta ao tratamento com o GTP. Como citado anteriormente a ação da leptina na estrutura óssea é dependente da concentração (MARTIN et al., 2007).

Em animais obesos a elevação da massa de tecido adiposo resulta em elevação da leptina plasmática, o que foi observado também nos animais deste trabalho tratados com sacarose. A leptina através de via hipotalâmica modula positivamente o sistema nervoso simpático, o que resulta na ativação de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos nos osteoblastos (TAKEDA et al., 2002; FLIER, 2002). Dessa forma, via Proteína Quinase A, ocorre ativação de ATF4, um fator de transcrição presente predominantemente em osteoblastos, e conseqüentemente uma maior expressão de RANKL (ELEFTERIOU et al., 2005). A maior expressão de RANKL favorece a osteoclastogênese (ANDO et al., 2008; MATSUO; IRIE, 2008).

Além de favorecer a expressão de RANKL, AFT4 modula a sinalização da insulina nos osteoblastos, via *Esp* gene. O conseqüente aumento da expressão da OST-PTP (HINOI et al., 2008; HINOI et al., 2009) implicará em modulação da sinalização insulínica, com conseqüente redução da formação e da reabsorção óssea (SCHLESSINGER, 2000). Em cultura de células NIH-3T3 ("Mouse Embryogenic Fibroblast Cell Line") as catequinas do chá verde parecem inibir a atividade da PTP-1B (MA et al., 2011), que também modula negativamente a sinalização da leptina, via JAK2 (ZABOLOTNY; BENCE-HANULEC, 2002).

Outro fator que pode ter contribuído para as alterações negativas encontradas nos fêmures dos animais que receberam sacarose, pode ter sido um estado hiperglicêmico desses animais, sugerido pelo aumento da frutossamina. A hiperglicemia inibe a diferenciação osteoblástica e altera a resposta do paratormônio (PTH) que regula o metabolismo do fósforo e do cálcio (SANTANA et al., 2003). A hiperfunção das paratireóides resulta em desmineralização óssea, com conseqüente aumento da porosidade, com menor resistência às fraturas. Além disso, ocorre efeito

deletério na matriz orgânica óssea, afetando a aderência, o crescimento e acúmulo de matriz extracelular (WENZEL , 1989).

Embora neste trabalho os tratamentos com os chás não tenham sido capazes de prevenir a redução da DMO ocasionada pela sacarose, houve aumento da DMO no osso trabecular dos animais que receberam apenas os chás. Mudanças também foram evidenciadas pela histomorfometria nos animais que receberam chás com ou sem sacarose. Nos animais tratados com chás, pôde-se constatar aumento da porcentagem de osso trabecular, além de maior espessura das trabéculas, menor espaçamento e menor número de trabéculas, como também demonstrado em alguns estudos (SHEN et al., 2009b; SHEN et al., 2010a; SHEN et al., 2011a).

Como demonstrado por outro autor, animais que apresentam aumento da massa adiposa em decorrência de modificações na dieta apresentam redução da porcentagem de osso trabecular, da espessura das trabéculas e aumento do espaçamento trabecular (CAO et al., 2009). O tratamento concomitante com os chás, embora não tenha resultado em aumento aparente da DMO, nos ensaios realizados, foi capaz de impedir as alterações impostas pela sacarose, como pode ser observado pela histomorfometria.

Esses efeitos podem ser resultantes da menor concentração plasmática de leptina nesses animais, em relação inclusive ao grupo controle. Além das já discutidas ações dos chás no metabolismo lipídico relacionadas a leptina, outros mecanismos podem estar implicados na modificação da estrutura óssea nesses animais.

Os efeitos dos chás de *C. sinensis* e seus bioativos na formação óssea envolvem também mecanismos diretos. Estudos *in vitro*, mostram que os GTP do chá verde promovem elevação dos níveis Runx2, em cultura de células mesenquimais, estimulando a diferenciação osteoblástica em estágios iniciais (CHEN et al., 2005). Em relação à ação dos polifenóis em linhagem de células osteoblásticas humanas maduras SAOS-2 ("Sarcoma Osteogenic") observa-se que a inibição de Runx2 nos estágios finais da formação óssea (VALI et al., 2007), favorece a mineralização da matriz óssea (SCHROEDER, et al., 2005).

Outro mecanismo de ação dos chás em células ósseas envolve a inibição da osteoclastogênese, vista por Lin e colaboradores (2009) em estudo com células pré-osteoclasticas. Os autores concluíram que a ação da EGCG está relacionada a inibição da via Rank-RankL.



Além das ações já citadas, a ação antioxidante dos polifenóis encontrados no chá verde, principalmente das catequinas, é altamente benéfica para a saúde óssea, como comprovado em estudo realizado com ratas intactas e ovariectomizadas (SHEN et al., 2008), através do aumento da atividade da enzima glutathione peroxidase. O estresse oxidativo promove apoptose de osteoblastos e osteócitos, reduzindo a formação óssea, por inibição da via  $Wnt\beta$ /catequina (MANOLAGAS, 2008).

Outro estudo (SHEN et al., 2010a) demonstrou ainda que a melhora na qualidade óssea após a administração de GTP também está relacionada a redução de mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ), que aumenta a reabsorção óssea por ativação da diferenciação e atividade osteoclástica, inibindo a atividade e a apoptose osteoblástica (BALGA et al., 2006).

Mudanças na microarquitetura óssea podem resultar em variações na resistência às fraturas (SEEMAN, 2008). Os ensaios biomecânicos não evidenciaram alterações na força máxima em resposta ao tratamento com a sacarose neste trabalho, como evidenciado anteriormente (TSANZI et al., 2008). Porém outros autores relataram efeitos negativos do tratamento com carboidratos na força (ZERNICK et al., 1995; LIE et al., 1990; LORINCZ et al., 2009). A diferença nos resultados pode estar relacionada ao tempo de tratamento, idade dos animais, concentração e tipos de carboidratos e ainda à associação de elevados níveis lipídicos na dieta. Neste trabalho foi verificada ainda redução da rigidez nos animais tratados com sacarose, corroborando achados de Lorincz e colaboradores (2009), em estudo utilizando elevadas concentrações de carboidratos e lipídeos no tratamento dos animais, e de Tsanzil e colaboradores (2008) com animais jovens tratados com diversos tipos de carboidratos.

Não se pode deixar de ressaltar o aumento de massa óssea verificado nos animais normais tratados com os chás verde e branco, que pode ser resultante da interação dos diferentes mecanismos através dos quais os bioativos dessas bebidas modificam o metabolismo ósseo. Nesses animais foi ainda verificado aumento da rigidez, embora outros parâmetros dos ensaios biomecânicos não tenham sido modificados. As análises histomorfométricas indicam que a maior rigidez possa estar associada ao aumento da porcentagem de osso trabecular, e ainda ao aumento da espessura das trabéculas e conectividade. Esses achados evidenciam a necessidade de estudos a longo prazo com animais jovens e chás de

*C. sinensis*, uma vez que as alterações foram observadas em relação ao osso na sua condição de normalidade (grupo controle).



## 5 CONCLUSÃO

O tratamento com sacarose 30% (p/v) por 8 semanas reduziu a qualidade óssea e promoveu alterações no metabolismo lipídico e energético. Não houve diferença entre os chás nos parâmetros investigados. A administração do chá verde ou branco nas concentrações escolhidas, foi efetiva em controlar as concentrações lipídicas no plasma, bem como minimizar as ações indesejáveis do consumo excessivo de carboidratos na estrutura óssea. O consumo de chás de *C. sinensis* por animais jovens não obesos deve ser visto com cautela, sendo necessário um estudo a longo prazo que comprove a segurança em relação à qualidade e ao crescimento ósseo.

## REFERÊNCIAS

AGUIARI, P.; LEO, S.; ZAVAN, B. VINDIGNI, V.; RIMESSI, A.; BIANCHI, K.; FRANZIN, C.; CORTIVO, R.; ROSSATO, M.; VETTOR, R.; ABATANGELO, G.; POZZAN, T.; PINTON, P.; RIZZUTO, R. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.105, p. 1226–1231, 2008.

AKUNE, T.; OHBA, S.; KAMEKURA, S.; YAMAGUCHI, M.; CHUNG, U.I.; KUBOTA, N.; TERUCHI, Y.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; NAKAMURA, K.; KADOWAKI, T.; KAWAGUCHI, H. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **J. Clin. Invest.** v.113, n. 6, p. 846–855, 2004.

ANDO, K.; MORI, K.; RÉDINI, F.; HEYMANN, D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. **Curr Drug Discov Technol.** v.5, n.3,p. 263–8, 2008.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food. Chem.** v. 10, n. 5, p.1124–1131, 2004.

BALGA, R.; WESTTERWALD, A.; PORTENIER, J.; DOLDER, S.; MUELLER, C.; HOFSTETTER, W. tumor necrosis factor-alpha: alternative role as an inhibitor of osteoclast formation in vitro. **Bone**. V.39, n.2, p.325-335, 2006.

BIALEK, P.; KERN, B.; YANG, X.; SCHROCK, M.; SOSIC, D.; HONG, N.; WU, H.; YU, K.; ORNITZ, D.M.; OLSON, E.N.; JUSTICE, M.J.; KARSENTY, G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. **Dev Cell.** v.6, n.3, p.423–35, 2004.

BOQUÉT, N.; CAMPIÓN, J.; PATERNAIN, L.; GARCIA-DIAZ, D.F.; GALARRAGA, M. P.; MILAGRO, F. I.; ORTIZ DE SOLÓRZANO, C.; MARTINEZ, J.A. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. **J. Physiol . Biochem.** v. 65, n.4, p.387–395, 2009.

BORCHARDT, R.; HUBER, J. A. Catechol Omethyltransferase. Structure-activity relationships for inhibition by flavonoids. **J Med Chem.** v.18, p. 120–122, 1975.

CARVALHO, A.A.F.; LOUZADA, M.J.Q.; RISO, N.D.M. Hindlimb unloading producing effects on bone biomechanical properties in mature male rats .**Braz. J. Morphol. Sci.**v.24,n.3,p.175–179, 2007.

CAO, J.J.; GREGOIRE, B.R.; GAO, H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. **Bone**. v.44, n.6, p.1097-104, 2009.

CHEN, C.H.; HO, M.L.; CHANG, J.K.; HUNG, S.H.; WANG, G.J. Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line. **Osteoporos Int**. v.16, n.12, p. 2039–2045, 2005.

CHEN, N., BEZZINA, R., LEWANDOWSKI, P. A., CANERON, S., MATHAI, M.L.; JOIS, M.; SINCLAIR, A.J.; BEGG, D.P.; WARK, J.D.; WEISINGER, H.S.; WEISINGER, R.S. Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. **Nutr. Res**. v.29, n.11, p.784–793, 2009.

CHEPULIS, L.; STARKEY, N. The long-term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and DEXA measurements in rats. **J. Food Sci**. v.73, n.1, p.1-7, 2008.

CHOI, E.; HWANG, J. Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. **Biol Pharm Bull**. v.26, n.4, p.523–526, 2003.

CHUANG, C.; YANG, R.; TSAI, K.; HO, F.; LIU, S. Hyperglycemia enhances adipogenic induction of lipid accumulation: involvement of extracellular signal-regulated protein kinase  $\frac{1}{2}$ , phosphoinositide 3—kinase/akt, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling. **Endocrinology**. v.148, p.4267–4275, 2007.

CORNISH, J.; CALLON, K.E.; BAVA, U.; LIN, C.; NAOT, D.; HILL, B.L.; GREY, A.B.; BROOM, N.; MYERS, D.E.; NICHOLSON, G.C.; REID, I.R. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. **J. Endocrinol**. v. 175, p.405–415, 2002.

COUSIN, W.; COURSEAU, A.; LADOUX, A.; DANI, C.; PERALDI, P. Cloning of OST-PTP: the only example of a protein-tyrosine-phosphatase the function of which has been lost between rodent and human. **Biochem Biophys Res Commun** v.321, p.259-265, 2004.

DIEPVENS, K.; WESTERTERP, K.R.; WESTERTERP-PLATENGA, M.S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. v. 292, n.1, p.77–85, 2007.

DUCY, P., AMLING, M., TAKEDA, S., PRIEMEL, M., SCHILLING, A. F., BEIL, F. T., SHEN, J., VINSON, C., RUEGER, J. M.; KARSENTY, G. Leptin inhibits bone

formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**. v.100, p.197–207, 2000.

ELEFTERIOU, F.; AHN, J.D.; TAKEDA, S.; STARBUCK, M.; YANG, X.; LIU, X.; KONDO, H.; RICHARDS, W.G.; BANNON, T.W.; NODA, M.; CLEMENT, K.; VAISSE, C.; KARSENTY, G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**. v.434, p.514–520, 2005.

ERICSSON, Y.; ANGMAR-MÅNSSON, B.; FLORES, M. Urinary mineral ion loss after sugar ingestion. **Bone Miner**. v.9, n.3, p.233-237, 1990.

FELSON, D.T.; ZHANG, Y.; HANNAN, M.T.; ANDRESON, J.J. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: The Framingham study. **J. Bone Miner Res**. v.8, p.567–573, 1993.

FERNANDEZ, M.L.; ABDEL-FATTAH, G.; MCNAMARA, D.J. Differential effects of simple vs. complex carbohydrates on VLDL secretion rates and HDL metabolism in the guinea pig. **Biochim Biophys Acta**. v.1256, n.1, p.31-38, 1995.

FLIER, J. S. Is brain sympathetic to bone? **Nature**, v. 420, p. 619–622, 2002.

FORSHEE, R.A.; STOREY, M. L. Total beverage consumption and beverage choices among children and adolescents. **Int. J. Food Sci. Nutr**. v.54, p. 297–307, 2003.

FULZELE, K., RIDDLE, R.C., DIGIROLAMO, D.J., CAO, X., WAN, C., CHEN, D., FAUGERE, M.C., AJA, S., HUSSAIN, M.A., BRUNING, J.C. & CLEMENS, T.L. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. **Cell** v.142, p.309-319, 2010.

GRANT, K.I.; MARAIS, M.P.; DHANSAY, M.A. Sucrose in a lipid-rich meal amplifies the postprandial excursion of serum and lipoprotein triglyceride and cholesterol concentrations by decreasing triglyceride clearance. **Am J Clin Nutr**. v.59, n.4, p.853-60, 1994.

HAFEEZ, B. B., AHMED, S., WANG, N., GUPTA, S., ZHANG, A., HAQQI, T.M. Green tea polyphenols-induced apoptosis in human osteosarcoma SAOS-2 cells involves a caspase-dependent mechanism with downregulation of nuclear factor-kappaB. **Toxicol Appl Pharmacol**. v.216, n.1, p.11–19, 2006.

HARA, Y. Green tea: health benefits and applications. **ArcelDekker**, New York, 2001.

HASEGAWA, N.; YAMDA, N.; MORI, M. Powdered **green tea** has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high-fat diet. **Phytother Res**. v.17, n.5, p.477-480, 2003.

HAMDİ KARA, I.; AYDIN, S.; GEMAMAZ, A.; AKUTURK, Z.; YAMAN, H.; BOZDEMİR, N. Habitual tea drinking and bone mineral density in postmenopausal Turkish women: Investigation of Prevalence of Postmenopausal Osteoporosis in Turkey (IPPOT Study). **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** v.77, n.6, p. 389–397, 2007.

HEGARTY, V. M., MAT, H. M., KHAW, K.T. Tea drinking and bone mineral density in older women. **Am. J. Clin. Nutr.** v.71, n.4, p. 1003–1007, 2007.

HERNÁNDEZ-ÁVILA, M.; STAPFER, M.J.; RAVNIKAR, V.A.; WILLET, W.C.; SCHIFF, I.; FRANCIS, M., LONGCOPE, C., McLINLAY, S.M., LONGSCOPE, C. Caffeine and other predictors of bone density among pre- and perimenopausal women. **Epidemiology.** v.4, n.2, p. 128–134, 1993.

HILAL, H.; ENGELHARDT, U. Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. **J. Verbr. Lebensm.** v.2, p. 414 – 421, 2007.

HINOI, E.; GAO, N.; JUNG, D.Y.; YADAV, V.; YOSHIZAWA, T.; KAJIMURA, D.; MYERS, M.G., Jr.; CHUA, S.C., Jr.; WANG, Q.; KIM, J.K.; KAESTNER, K.H.; KARSENTY, G. An Osteoblast-dependent mechanism contributes to the leptin regulation of insulin secretion. **Ann N Y Acad Sci** . v.1173, n. 1,p. 20–30, 2009.

HINOI, E.; GAO, N.; JUNG, D.Y.; YADAV, V.; YOSHIZAWA, T.; MYERS, M.G.; Jr., CHUA, S.C.; KIM, J.K.; KAESTNER, K.H.; KARSENTY, G. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. **J Cell Biol** **183**, 1235–1242, 2008.

HUANG, J.S., RIETSCHER, P., HADIGAN, C.M., ROSENTHAL, D.I., GRINSPOON, S. Increased abdominal visceral fat is associated with reduced bone density in HIV-infected men with lipodystrophy. **AIDS.** v.15, p.384–389, 2001.

HUNG, P.F., WU, B.T., CHEN, H.C.; CHEN, Y.H.; CHEN, C.L.; WU, M.H.; LIU, H.C.; LEE, M.J.; KAO, Y.H. Antimitogenic effect of green tea (–)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v. 288, p.1094–1108, 2005.

HWANG, Y. C., JEONG, I. K., AHN, K. J. AND CHUNG, H. Y. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v.25, p.768-772, 2009.

IKEDA, I.; HAMAMOTO, R.; UZU, K.; IMAIZUMI, K.; NAGAO, K.; YANAGITA, T.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, M.; KAKUDA, T. Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.69, p.1049–1053, 2005.

ILICH, J.Z.; SKUGOR, M.; HANGARTNER, T.; BAOSHE, A.; MATKOVIC, V. Relation of nutrition, body composition and physical activity to skeletal development: A cross-sectional study in preadolescent females. **J. Am. Coll. Nutr.** v.17, p.136–147, 1998.

IWANIEC, U.T., TURNER, R.T., KOO, S.I. KAUR, R., HO, E., WONG, C.P. BRUNOS, R.S. Consumption of Green Tea Extract Results in Osteopenia in Growing Male Mice. **J. Nutr.** v.139, p.1914–1919, 2009.

JANICKA, A.; WREN, T.A.; SANCHEZ, M.M.; DOREY, F.; KIM, P.S. MITTELMAN, S.D.; GILSANZ, V. Fat mass is not beneficial to bone in adolescents and young adults. **J Clin. Endocrinol. Metab.** v.92, n.1, p.143–147, 2007.

KALU, D.N.; LIU, C.C.; HARDIN, R.R.; HOLLIS, B.W. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **J Endocrinol** v.124, p.7–16, 1989.

KAO, Y.H.; HIPAKKA, R.A.; LIAO, S.E. Modulation of obesity by green tea catechin. **Am. J. Clin. Nutri.** v.72, n.5, p.1232–1234, 2000.

KARSENTY, G.; OURY, F. The Central Regulation of Bone Mass, The First Link between Bone Remodeling and Energy Metabolism. **J Clin Endocrinol Metab.** v.95, p.4795–4801, 2010.

KLAUS, S.; PÜLTZ, S.; THÖNE-REINEKE, C.; WOLFRAM, S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. **Int J. Obes.** v.29, n.6, p.615–623, 2005.

KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, M.; SATSU, H.; ARAI, S.; HARA, Y.; SUZUKI, K.; MIYAMOTO, Y.; SHIMIZU, M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **J Agric Food Chem.** v.48, n.11, p. 5618–23, 2000.

KOMORI, T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. **Journal of Cellular Biochemistry.** v. 99, p. 1233–1239, 2006.

KOO, S.I.; NOH, S.K.; Green Tea a Inhibitor of the Intestinal Absorption of Lipids: Potential Mechanisms for its Lipid-lowering Effect. **J. Nutr Biochem.** v.18, p.179–183, 2007.

KUO, K.L.; WENG, M.S.; CHIANG, C.T.; TSAI, Y.J. Comparative Studies on the Hypolipidemic and Growth Suppressive Effects of Oolong, Black, Pu-erh, and Green Tea Leaves in Rats. **J. Agric. Food Chem.** v.53, p.480–489, 2005.

KYRIAZOPOULOS, P., TROVAS, G., CHAROPOULOS, J., ANTONOGIANNAKIS, E., GALANOS A., LYRITIS, G. Lifestyle factors and forearm bone density in young Greek men. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**. v.65, n.2, p.234–238, 2006.

LEE, N.K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J.D.; CONFAVREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P.J.; MCKEE, M.D.; JUNG, D.Y.; ZHANG, Z.; KIM, J.K.; MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell** v.130, p.456-469, 2007.

LEMANN, J, JR.; LENNON, E.J.; PIERING, W.R.; PRIEN, E.L. JR.; RICANATI, E.S. Evidence that glucose ingestion inhibits net renal tubular reabsorption of calcium and magnesium in man. **J Lab Clin Med**. 1970 Apr;75(4):578-85. No abstract available

LIE, K.C.; ZERNICKE, R.F.; BARNARD, R.J.; LI, A.F. Effects of a high fat-sucrose diet on cortical bone morphology and biomechanics. **Calcif Tissue Int**. v.47, p.308–313, 1990.

LIN, R,W.; CHEN, C.H.; WANG, Y.H.; HO, M.L.; HUNG, S.H.; CHEN, I.S.; WANG, G.J. (-)-Epigallocatechin gallate inhibition of osteoclastic differentiation via NF-kappaB. **Biochem Biophys Res Commun**. v.379, n.4, p.1033–1037, 2009.

LORINCZ, C., REIMER, C., BOYD, S., ZERNICKE, R. High-fat, sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice. **British Journal of Nutrition**. v.103, p.1302–1308, 2009.

MANOLAGAS, S.C. De-fense! De-fense! De-fense: scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> while making cholesterol. **Endocrinology** . v. 149, n.7, p.3264–3266, 2008.

MARTIN, A., DAVID, V., MALAVAL, L., LAFAGE-PROUST, M.H. Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway. **Endocrinology**. v.148, n.7, p.3419–3425, 2007.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch Biochem Biophys**. v.473, n.2, p. 201–209 ,2008.

MATSUYAMA, T.; TANAKA, W.; KAMIMAKI, I.; NAGAO, T., TOKIMITSU, I. Catechin Safely Improved Higher Levels of Fatness, Blood Pressure, and Cholesterol in Children. **Obesity**. v.16, n.6, p.1338–1348, 2008.

MAZZANTI, G.; MENNITI, IPPOLITO-F.; MORO , P.A.; CASSETTI, F.; RASCHETTI, R.; SANTUCCIO, C.; MASTRANGELO, S. Hepatotoxicity of green tea: a literature review and two new cases. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 65, n.4, p.331–341, 2009.



- MOCHIZUKI, M.; HASEGAWA, N. Effects of green tea catechin-induced lipolysis on cytosol glycerol content in differentiated 3T3-L1 cells. **Phytother Res.** v.18, n.11, p. 945-946, 2004.
- MORRIS, K.L.; ZEMEL, M.B. Glycemic index, cardiovascular disease, and obesity. **Nutr Rev.** v. 57, n9, p.273– 276, 1999.
- MOUNT, J.G.; MUZYLA, M.; ALLEN, S.; ALTHNAIAN, T.; MCGONNELL, I.M.; PRICE, J.S. Evidence that the canonical Wnt signalling pathway regulates deer antler regeneration. **Dev. Dyn.** v.235, n.5, p.1390–1399, 2006.
- MURAKI, S.; YAMAMAMOTO, S.; ISHIBASHI, H.; OKA, H.; YOSHIMURA, N.; KAWAGUCHI, H. Diet and lifestyle associated with increased bone mineral density: cross-sectional study of Japanese elderly women at an osteoporosis outpatient clinic. **J. Orthop. Sci.** v.12, n.4, p. 317–320, 2007.
- MURASE. T.; NAGASAWA, A.; SUZUKI, J; HASE, T.; TOKIMITSU, I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. **Int. J. of obesity.** V.26, p.1459–1464, 2002.
- NAGAO, T.; HASE, T., TOKIMITSU, I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. **Obesity (Silver Spring).** v. 15, n.6, p.1473–83, 2007.
- NAKAGAWA, H.; WACHI, M.; WOO, J.T.; KATO, M.; KASAI, S.; TAKAHASHI, F.; LEE, I.S.; NAGAI, K. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. **Biochem Biophys Res Commun.** n .101, p.292–294, 2002.
- NAKAGAWA, H.; HASUMI, K.; TAKAMI, M.; AIDA-HYUGAJI S., WOO J.T., NAGAI K., ISHIKAWA, T.; WACHI, M. Identification of two biologically crucial hydroxyl groups of (-)-epigallocatechin gallate in osteoclast culture. **Biochem. Pharmacol.** v.73, n.1, p.34–43, 2007.
- NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.X.; RODRIGUES, H.G.; MANI, F.; FERNANDES, A.A.H.; CICOONA, A.C.; NOVELLI FILHO, J.L.V.B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim.**, v.41, p.111–119, 2007.
- OH, K. W.; LEE, W. Y.; RHEE, E. J.; BAEK, K. H.; YOON, K. H.; KANG, M. I, et al. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. **Clin. Endocrinol. (Oxf).** v.63, n.2, p.131–138, 2005.
- OSHIMA, K.; NAMPEI, A.; MATSUDA, M.; IWAKI, M.; FUKUHARA, A.; HASHIMOTO, J.; YOSHIKAWA, H.; SHIMOMURA, I. Adiponectin increases bone



mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.331, n.2, p.520–256, 2005.

PARHAMI, F.; JACKSON, S.M.; TINTUT, Y.; LE, V.; BALUCAN, J.P.; TERRITO, M.; DEMER, L.L. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stroma cells. **J Bone Miner Res.** v.14, n.12, p.2067-2078, 1999.

PITTAS, A. G., HARRIS, S. S., ELIADES, M., STARK, P.; DAWSON-HUGHES, B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.94, p. 827-832, 2009.

REID, I.R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v.31, p.547–555, 2002.

RICHARD, D.; Weight and plasma lipid control by decaffeinated green tea. **Pharmacological research**, v.59, p.351–354, 2009.

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials., **J. Nutr.** v.133, p.3285–3292, 2003.

SAITOGLU, M.; ARDICOGLU O., OZGOCMEN S.; KAMANLI, A.; KAYA, A. Osteoporosis risk factors and association with somatotypes in males. **Arch. Med. Res.** v.38, n.7, p.746–751, 2007.

SANTANA, R.B.; XU, L.; CHASE, H.B.; AMAR, S.; GRAVES, D.T.; TRACKMAN, P.C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 52, p.1502–1510, 2003.

SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G.A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.Y.; DASHWOOD, R.H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. **Mutat. Res.** v.495, p.61–74, 2001.

SCHAEFER, E.J.; GLEASON, J.A.; DANSINGER, M.L. Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis. **J Nutr.** v.139, n.6, p.1257–1262, 2009.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell.** v. 103, p.211–225, 2000.

SCHROEDER, T.M.; JENSEN, E.D.; WESTENDORF, J.J. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. **Birth Defects Res C Embryo Today.** v.75, n.3, p.213–25, 2005.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **J Bone Miner Metab.** v.26, n.1, p.1-8. 2008.

SHEN, C.L.; CHANJAPLAMMOOTIL, S.; YEH, J.K.; CAO, J.J.; CHYU, M.C.; DAGDA, R.Y. Anti- obesity and osteo-protective effect of green tea polyphenols on long-term high- fat-diet-induced obesity in rats. **Faseb J.** v.5, p.776–782, 2011b.

SHEN, C.L.; YEH, J.K.; CAO, J.; WANG, J.S. Green Tea and Bone metabolism. **Nutr Res.** v.29, n.7, p. 437–456, 2009a

SHEN, C.L.; YEH, J.K.; SAMATHANAM, C.; CAO, J.J.; STOECKER, B.J.; DAGDA, R.Y. CHYU, M.C.; DUNN, C.M.; WANG, J.S. Green tea polyphenols attenuate deterioration of bone microarchitecture in female rats with systemic chronic inflammation. **Osteoporos Int.** v.22, n.1, p.327–337, 2010a.

SHEN, C.L.; YEH, J.K.; STOECKER, B.J.; CHYU, M.C.; WANG, J.S. Green tea polyphenols mitigate deterioration of bone microarchitecture in middle-aged female rats. **Bone.** v.44, n.4, p.684–690, 2009b.

SHEN, C.L.; YEH, J.K.; CAO, J.J.; TATUMOL; DAGDA, R.Y.; WANG, J. S. Green tea polyphenols mitigate bone loss of female rats in a chronic inflammation-induced bone loss model. **J Nutr Biochem.** v.21, p.968–974, 2010b

SHEN, C.L.; WANG, P.; GUERRIERI, J.; YEH, J.K.; WANG, J.S. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. **Osteoporos Int.** v.19, n.7, p.979–90, 2008.

SHEN CL, CAO JJ, DAGDA RY, TENNER TE JR, CHYU MC, YEH JK. Supplementation with green tea polyphenols improves bone microstructure and quality in aged, orchidectomized rats. **Calcif Tissue Int.** v.88, n.6, p.455–463, 2011a

SONG, E.K.; HUR, H.; HAN, M.K.; ARCH, M.K. Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. **Pharm. Res.** v.26, p.559–563, 2003.

STETTLER, N.; BERKOWTIZ, R.I.; CRONQUIST, J.L.; SHULTS, J.; WADDEN, T.A.; ZEMEL, B.S.; LEONARD, M.B. Observational Study of Bone Accretion During Successful Weight Loss in Obese Adolescents. **Obesity**, v.16, n.1, p.96–101, 2008.

STOLZING, A.; COLEMAN, N.; SCUTT, A. glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. **Rejuvenation Res.** v. 9, p. 31–35, 2006

TAKEDA, S.; ELEFTERIOU, F.; LEVASSEUR, R.; LIU, X.; ZHAO, L.; PARKER, K.L.; ARMSTRONG, D.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. **Cell.** v.111, p.305–317, 2002.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nat. Rev.Genet.** v.4, p.638–649, 2003.

TJADERHANE, L.; LARMAS, M. A high sucrose diet decreases the mechanical strength of bones in growing rats. **J. Nutri.** V. 128, p. 1807–1810, 1998.

THOMMESEN, L.; STUNES, A.K.; MONJO, M.; GROSVIK, K.; TAMBURSTUEN, M.V.; KJIBLI, E.; LYNGSTADAAS, S.P.; RESELAND, J.E.; SYVERSEN, U. Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism. **J. Cell. Bioche.** v.99, n.3, p.824–834, 2006.

TSANZI, E.; LIGHT, H. R., TOU, J.C. The effects of feeding sugar-sweetened beverages to growing female Sprague-Dawley rats on bone mass and strength. **Bone.** v. 42, p. 960–968, 2008.

UNACHUKWU U.J., AHAMED S., KAVALIER A., LYLES J.T., KENNELLY E.J. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. **J Food Sci.** 2010 Aug 1;75 (6):C541-8

VALI, B.; RAO, L.G.; EL-SOHEMY, A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. **J Nutr Biochem.**, v.18, n.5, p.341–347, 2007.

VENDRELL, J.; BROCH, M.; VILARRASA, N.; MOLINA, A.; GÓMEZ, J. M.; GUTIÉRREZ, C.; SIMÓN, I.; SOLER, J.; RICHART, C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. **Obes. Res.** v.12, n.6, p.962–971, 2004.

WESTERTERP-PLANTENGA, M.S.; LEJEUNE, M,P,; KOVACS, E.M. Body Weight Loss and Weight Maintenance in Relation to Habitual Caffeine Intake and Green Tea Supplementation. **Obes. Res.** v.13, n7, p. 1195–1204, 2005.

WENZEL, A. Effect of manual compared with reference point superimposition on image quality in digital subtraction radiography. **Dentomaxillofac Radiol.** v. 18, p.145–150, 1989.

WEYNER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, S.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R.E.; TATARANNI, P.A. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.86, n.5, p.1930–1935, 2001.

WOLFRAM, S.; RAEDERSTORFF, D.; PRELLER, M.; WANG, Y.; TEIXEIRA, S.R.; RIEGGER, C.; WEBER, P. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. **J. Nutri.** v.136, n.10, 2512–2518, 2006.

WU, C.H.; YANG, Y.C.; YAO, W.J.; LU, F.H.; WU, J.S.; CHANG, C.J.  
Epidemiological evidence of increased bone mineral density in habitual tea drinkers. **Arch Intern. Med.** v.162, p.1001–1006, 2002.

YADAV, V.K.; OURY, F.; SUDA, N.; LIU, Z.W.; GAO, X.B.; CONFAVREUX, C.; KLEMENHAGEN, K.C.; TANAKA, K.F.; GINGRICH, J.A.; GUO, X.E.; TECOTT, L.H.; MANN, J.J.; HEN, R.; HORVATH, T.L.; KARSENTY, G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. **Cell.** v.138, p.976–989, 2009.

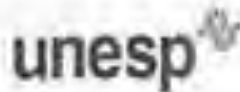
YOSHIZAWA, T.; HINOI, E.; JUNG, D. Y.; KAJIMURA, D.; FERRON, M.; SEO, J.; GRAFF, J. M.; KIM, J. K.; KARSENTY, G. The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. **J. Clin. Invest.** v.119, p. 2807-2817, 2009.

YUN, H.H.; PANG, E.K.; KIM, C.S.; YOO, Y.J.; CHO, K.S.; CHAI, J.K.; KIM, C.K.; CHOI, S.H. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate of the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. **J Periodontal Res.** V.39, N.5, P.300–307, 2004.

ZABOLOTNY, J.M.; BENCE-HANULEC, K.K.; STRICKER-KRONGRAD, A. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Dev. Cell** v.2, p. 489–495, 2002.

ZERNICK, R.F.; SALEM, G.J.; BARNARD, R.J.; SCHRAMM, E. Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. **Bone.** v.16, p. 25–31, 1995.

ZHAO, L.J.; LIU, Y.J.; LIU, P.Y.; HAMILTON, J.; RECKER, R.R.; DENG, H.W. Relationship of obesity with osteoporosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.92, p.1640–1646, 2007.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
 "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
 Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
 (CEEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "EFETO DA INGESTÃO DE CHÁ VERDE E CHÁ BRANCO NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E PARÂMETROS METABÓLICOS DE RATOS JOVENS, SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA" sob responsabilidade do Profa. Dra. Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamura e colaboração de Lucilene de Andrade Oliveira Marques, Prof. Antônio Augusto Carvalho, Prof. Adj. Mario Jefferson Quirino Louzada está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA "ad referendum" protocolo número 003286-2009.

Araçatuba, 26 de Maio de 2009.

Prof. Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva

Presidente da CEEA-FOA/UNESP