

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**EFEITOS DA EPIGALOCATEQUINA GALATO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE**

CAMILA FRAGA LECH

Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Porto Alegre

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**EFEITOS DA EPIGALOCATEQUINA GALATO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE**

CAMILA FRAGA LECH

Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, com
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2010

Dedico ao meu avô Raul Ferreira Fraga
e a minha mãe.

Agradeço:

À minha família, em especial a minha mãe e ao meu avô, por todo amor, carinho, incentivo e orações. Agradeço a todos aqueles que sempre me apoiaram neste projeto.

À Professora Mirna por ter me levado ao laboratório 33, pelos seus ensinamentos, sua paciência, dedicação e carinho.

À Professora Carmem pela confiança, disponibilidade, conhecimento, dedicação e carinho.

À Professora Elaine pelo conhecimento.

À Vívís, que me ensinou e me ajudou muito ao longo deste trabalho, agradeço também por toda a participação que a Érica teve neste trabalho, sempre incansável e pronta para mais um experimento!

Ao grupo de alunos da Professora Elaine.

Ao pessoal do laboratório 32, em especial ao colega André Simões Pires.

A todos os colegas do lab. 33.

ÍNDICE	PÁGINA
I. INTRODUÇÃO.....	01
1. Chá verde e propriedades antioxidantes.....	01
1.1. Biodisponibilidade da EGCG.....	06
2. Envelhecimento e Estresse Oxidativo.....	06
3. Sistema Neural e Estresse Emocional.....	08
3.1. Modelo de Estresse por Imobilização.....	09
II. CAPÍTULO I - Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Behavioral and Biochemical Alterations Induced by Restraint Stress in Mice.....	12
III. DISCUSSÃO.....	42
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
V. ANEXO 1 – LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO.....	56

ABSTRACT

The green tea extract has been used during many centuries to treat and prevent some diseases. Many of these beneficial effects of green tea are related to its catechin, particularly (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), content. Catechins have been reported to have many pharmacological properties such as the effects of anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-ultraviolet, and reduction of blood pressure as well as glucose and cholesterol levels. EGCG displays potential properties of anticancer and neuroprotection, iron chelation, scavenging of radicals, activation of survival genes and cell signaling pathways. As a consequence, these compounds are receiving significant attention as therapeutic cytoprotective agents for the treatment of neurodegenerative and other diseases related to reactive oxygen species (ROS). ROS are believed to be involved in tissue damage resulting from a variety of insults. These substances can directly damage cellular proteins, DNA and lipids, and thereby affect all cellular functions. In this study, using the restraint stress animal model, we investigated the protective effects of EGCG on antioxidant defense systems in hippocampus (HC) and cerebral cortex (Cx) of mice, and these brain areas were chosen due to their known involvement in stress response. Restraint stress is used as an animal model of emotional stress in rats and mice and the light/dark test may be useful to predict anxiolytic-like or anxiogenic-like activity in mice after stress exposure. Mice were administered orally (by gavage) once a day during 30 days with EGCG 1.5, 2.9 and 5.8 mg/Kg or NaCl 0.9% (control group). The biochemical results show that restraint stress improved the hippocampal activity of superoxide dismutase (SOD) in 39%, improved catalase (CAT) activity in and in Hc (57%) and Cx (54%). The restraint stress also improved the hippocampal and cortical formation of free radicals in 11% and 9%, respectively and the amount of non-enzymatic antioxidants were decreased by restraint stress in Hc (23%) and Cx (41%). EGCG was able to prevent these alterations, indicating a neuroprotective effect. EGCG (2.9 and 5.8 mg/Kg) seem to prevent the restraint stress effect on the number of crossings in the light/dark test. The locomotor activity was not altered by any parameters investigated. Future studies from cell cultures should be integrated with studies *in vivo* to fully elucidate the molecular mechanisms of action of EGCG.

RESUMO

O extrato de *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze (chá verde) é usado na medicina tradicional chinesa há séculos para tratar e prevenir doenças, sendo bastante comum em países asiáticos, especialmente no Japão, China, Coréia, Índia e Sri Lanka. O extrato de chá verde é particularmente rico em flavonóides, uma família de polifenóis encontrada em frutas e vegetais. Folhas da planta *Camellia sinensis* contêm polifenóis tais como flavanóis (catequinas), flavonóis, flavanodióis e ácidos fenólicos. As catequinas representam de 35 a 40% do extrato sólido de chá verde, e acredita-se que principalmente a epigallocatequina galato (EGCG) contribua com os efeitos benéficos atribuídos ao chá verde, tais como propriedades antitumoral, antiinflamatória, quelante de ferro e antioxidante. As doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington parecem todas terem uma base comum, o estresse oxidativo, que por sua vez pode estar diretamente relacionado à morte neuronal observada nessas doenças. O objetivo deste estudo, utilizando modelo de estresse por imobilização, foi investigar os efeitos protetores da EGCG no sistema de defesa antioxidante no hipocampo (Hc) e em córtex cerebral (Cx) de camundongos. Os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 30 dias, com EGCG nas doses 1,5; 2,9 e 5,8 mg/Kg e submetidos ao modelo de estresse por imobilização. A análise comportamental foi feita pelos testes claro/escuro e de atividade locomotora. Os resultados bioquímicos mostram que estresse por imobilização foi capaz de aumentar a atividade hipocampal de superóxido dismutase (SOD) em 39%, e aumentar a atividade de catalase (CAT) em Hc (57%) e em Cx (54%). O estresse por imobilização induziu aumento da formação de radicais livres em Hc (11%) e em Cx (9%), enquanto que a quantidade de defesa antioxidante não enzimática foi diminuída em Hc (23%) e em Cx (41%). A EGCG foi capaz de prevenir todas estas alterações. O estresse por imobilização induziu, no teste do claro/escuro, diminuição do número de cruzamentos entre os dois compartimentos, este efeito parece ter sido prevenido pelo tratamento com EGCG (2,9 e 5,8 mg/Kg). Nenhuma alteração foi observada na atividade locomotora espontânea, indicando que o modelo de estresse por imobilização e o tratamento com EGCG não interferiram na atividade locomotora espontânea dos animais. Os resultados apresentados aqui demonstram que níveis adequados de EGCG podem modular sistemas encefálicos mediante condições decorrentes de estresse, neste caso evidenciado pelo modelo agudo de estresse por imobilização.

LISTA DE ABREVIATURAS

EC = Epicatequina

EGC = Epigalocatequina

ECG = Epicatequina galato

EGCG = Epigalocatequina galato

ERO = Espécie reativa de oxigênio

AGE = Produtos finais avançados de glicação

GSH = Glutathiona

SOD = Superóxido dismutase

CAT = Catalase

GPx = Glutathiona peroxidase

GSSG = Glutathiona oxidada

SNC = Sistema nervoso central

I. INTRODUÇÃO

1. Chá Verde e Propriedades Antioxidantes

Camellia sinensis (L) O. Kuntze (Figura 1) é um arbusto ramoso pertencente à família Theaceae, do gênero *Camellia* e espécie *sinensis*,



originária do leste da Ásia, onde é extensivamente cultivada até aproximadamente 1,5 metros de altura e apresenta folhas verde-escuro, normalmente coriáceas. As flores são brancas possuindo de seis a nove pétalas (Patel, 2005). É das folhas tenras e brotos desta planta que se produz o verdadeiro e tradicional "chá" (Stavric et al., 1996). A infusão derivada de outros tipos de planta deve ser chamada de "chá de ervas" e, diferente da infusão das folhas da *Camellia sinensis*, também pode incluir outras partes da planta, como flores

e raízes (Stavric et al., 1996). Desde a pré-história as plantas têm sido utilizadas como produtos terapêuticos. O chá é obtido por infusão, que é a forma mais popular de uso dos diferentes produtos de origem vegetal (Trevisanato e Kim, 2000). O extrato de chá verde é usado na medicina tradicional chinesa há séculos para tratar e prevenir doenças (Chacko et al.,

2010), e é bastante comum em países asiáticos, especialmente no Japão, China, Coréia, Índia e Sri Lanka . Alterações no processo de manufatura da *Camellia sinensis* resultam no chá verde, chá preto e chá oolong, os quais representam aproximadamente 23%, 75% e 2% da produção mundial, respectivamente (Frank, 2003). O chá verde é produzido sob altas temperaturas, em um processo que inativa a oxidação das catequinas presentes nas folhas da planta. O chá preto é intensamente oxidado durante seu processo de produção enquanto que o chá oolong sofre processo de semi-oxidação. O chá oolong é considerado um intermediário entre o chá verde e preto (Frei e Higdon, 2003). Estes três tipos de chás derivam da mesma planta, e suas diferenças químicas quantitativas e qualitativas resultam das diferentes técnicas de processamento (Cabrera et al., 2006).

Entre vários compostos bioativos, o extrato de chá verde é particularmente rico em flavonóides, uma família de polifenóis encontrada em frutas e vegetais (Butterfield et al., 2002). Algumas das principais características dos flavonóides em sistemas biológicos incluem sua habilidade de transferir elétrons para espécies reativas de oxigênio (ERO), quelar metais, ativar enzimas antioxidantes e inibir oxidases (Doronicheva et. al., 2007). Folhas da planta *Camellia sinensis* contêm polifenóis tais como flavanóis (catequinas), flavonóis, flavanodióis e ácidos fenólicos (Wang et al., 1994). Catequinas representam de 35 a 40% do extrato sólido de chá verde (Wang et al., 1994; Yang e Wang, 1993). Os efeitos benéficos do consumo regular de chá verde são principalmente atribuídos ao conteúdo de polifenóis presentes nas folhas da *Camellia sinensis* (Thielecke e Boschmann, 2009). Existem quatro tipos de catequinas as quais estão ilustradas na Figura 2: (-)-

epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (EGG), e (-)- epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Sano et al., 2001).

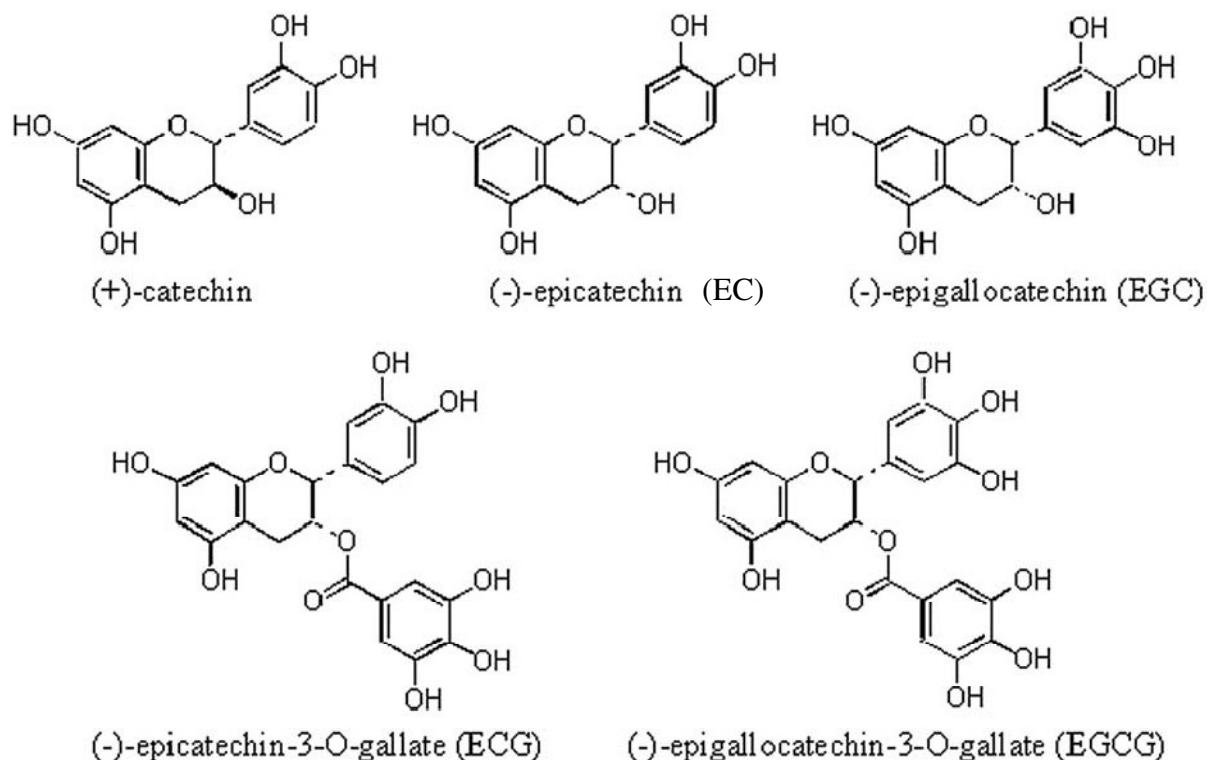


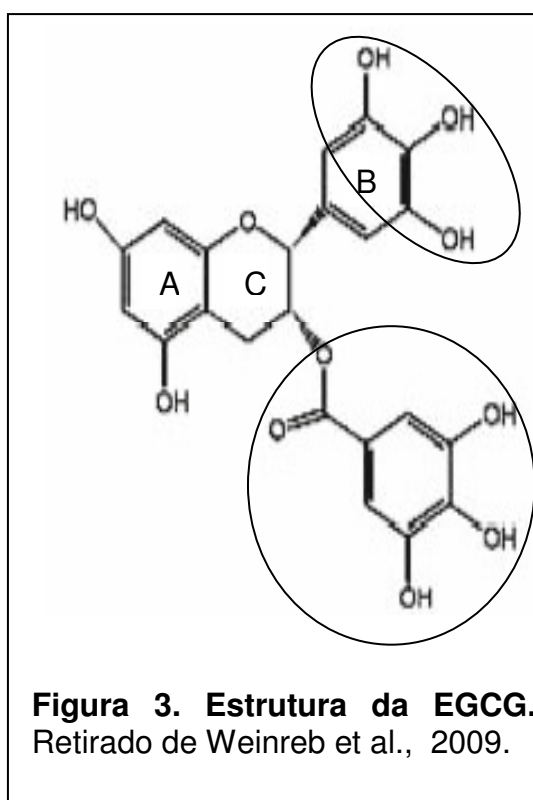
Figura 2. Estrutura química das catequinas. Retirado de Korte et.al., 2010.

O composto polifenólico mais abundante do chá verde é a EGCG, seguida pela EGC > EC ≥ ECG (Mandel e Youdim, 2004). Acredita-se que principalmente a EGCG contribua com os efeitos benéficos atribuídos ao chá verde, tais como propriedades antitumoral, antioxidante e antiinflamatória, assim como melhora da função cardiovascular (Mandel et al., 2005). Estima-se que um copo de chá verde (2.5g de folhas de chá verde/200 mL de água) pode conter 90 mg de EGCG e particularmente contribuir para os efeitos benéficos atribuídos ao chá verde, tais como propriedades neuroprotetoras (Lin et al., 2003; Wu e Wei, 2002).

Dentre as catequinas do chá verde, a EGCG apresenta maior atividade antioxidante, seguidas pela ECG, EGC e EC (Nanjo et al., 1999).

Evidências epidemiológicas indicam que populações com alto consumo de catequinas do chá verde apresentam melhores índices de peso e gordura corporal, homeostase de glicose e saúde cardiovascular (Thielecke e Boschmann, 2009).

Os benefícios do chá verde são atribuídos principalmente às suas propriedades antioxidantes e a habilidade das catequinas polifenólicas de sequestrarem espécies reativas de oxigênio (Trevisanato e Kim, 2000). Na grande maioria dos estudos, a EGCG aparece como a catequina mais eficiente



como sequestradora de radicais livres, fato este que pode ser atribuído a presença do grupo triidroxil no anel B e do grupamento galato na posição 3 no anel C (Weinreb et al., 2009), conforme ilustrado da figura 3. Estruturalmente, o potencial quelante das catequinas se deve aos grupamentos triidroxil e grupamento galato, os quais podem quelar metais, principalmente ferro e cobre, capazes de catalisar reações que envolvem radicais livres. Ocorre assim a

proteção das células contra dano oxidativo (Mandel et al., 2005).

1.1. Biodisponibilidade da EGCG

A absorção e os níveis plasmáticos de EGCG são maiores quando o chá verde é ingerido, em comparação com a ingestão de EGCG isoladamente. A base molecular para esta absorção diferente não é conhecida, mas é possível que a formação de um complexo entre EGCG e outro componente do chá verde possa aumentar a sua absorção. As catequinas ligam-se fortemente a proteínas, sendo assim, é possível que outros componentes do chá verde possam competir com EGCG pela ligação a proteínas do sangue e dos tecidos, alterando assim o comportamento farmacocinético da EGCG (Chen et al., 1997). EGCG não demonstra nenhum efeito adverso em relação à reprodução ou a fertilidade de ratas (Isbrucker et al., 2006). EGCG pode atravessar barreira hematoencefálica e penetrar em várias regiões encefálicas, e em função disso, se tem sugerido importante papel neuroprotetor para esta catequina (Lin et al., 2007). A EGCG é pouco absorvida pelo intestino, resultando na baixa biodisponibilidade. EGCG está amplamente presente no plasma na forma conjugada (50-90%), e esta é eliminada mais rapidamente do organismo, a excreção fecal é a sua maior rota de eliminação (Lambert et al., 2003).

2. Envelhecimento e Estresse Oxidativo

Com o envelhecimento o organismo aumenta a produção de ERO, enquanto que as defesas antioxidantes declinam, levando ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGE) associados a danos macromoleculares, os quais potencializam a produção de ERO. Este ciclo vicioso não pode ser terminado, mas pode ser interrompido pela intervenção da suplementação com antioxidantes. Antioxidantes derivados de plantas e de

alimentos têm sido considerados benéficos na proteção contra diversas doenças, sendo usados como estratégia terapêutica (Rice-Evans e Diplock, 1993).

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a quantidade de radicais livres e o sistema de defesa contra eles, o qual é formado por enzimas e metabólitos antioxidantes. A defesa antioxidante celular envolve a síntese de compostos antioxidantes, como glutathiona reduzida (GSH) e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (Flora, 2007). A SOD está presente nas células eucarióticas, nas isoformas cobre/zinco dependente (Cu/Zn-SOD) e manganês-dependente (Mn-SOD). Embora a Cu/Zn-SOD seja também encontrada nos fluidos extracelulares, sua maior atividade é no citosol. A Mn-SOD localiza-se estrategicamente no interior da mitocôndria (matriz e membrana), sítio de produção de radicais superóxido. Ambas as isoformas de SOD catalisam a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio (Flora, 2007; Reynolds et al., 2007). A catalase, de ampla distribuição tecidual, neutraliza a ação deletéria do peróxido de hidrogênio produzido na dismutação do radical superóxido. A GPx existe nos organismos em duas formas protéicas diferentes: selênio dependente (Se-GPx) e selênio independente. Ambas as isoformas catalizam a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, utilizando glutathiona reduzida (GSH) como doador de elétrons, com formação da glutathiona oxidada (GSSG) e água (Flora, 2007). Falhas neste sistema de defesa podem estar relacionadas com o surgimento de patologias neurais. Com o aumento da vida média da população, tem se observado um maior número de doenças degenerativas em relação direta com a idade. As

doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington parecem todas terem uma base comum, o estresse oxidativo, que por sua vez pode estar diretamente relacionado à morte neuronal observada nessas doenças (Kazantsev, 2007). Significativas evidências indicam que o estresse oxidativo resulta na geração de espécies reativas de oxigênio e em processos inflamatórios, e que desencadeiam uma cascata de eventos que podem gerar respostas apoptóticas e/ou necróticas em diversas patologias, incluindo a Esclerose Lateral Amiotrófica e especialmente doenças neurodegenerativas, tais como: Doença de Parkinson, de Alzheimer e de Huntington (Zecca et al., 2004).

O papel patogênico das ERO está bem relacionado com a etiologia de doenças neurodegenerativas. Sendo assim, não surpreende que os antioxidantes foram os primeiros compostos a serem estudados com a intenção de retardar o progresso da Doença de Parkinson (Mandel et al., 2005). Acredita-se que as ERO estão envolvidas no dano tecidual desencadeado por uma grande variedade de insultos. Estas substâncias podem danificar diretamente proteínas, DNA e lipídeos, afetando desta forma as funções celulares (Cochrane, 1991). Sabe-se que o estresse oxidativo afeta a plasticidade sináptica, a morfologia dendrítica e induz dano neurotóxico em humanos, provavelmente através da geração de radicais livres (Zaidi e Banu, 2004). De todos os órgãos, o Sistema Nervoso Central (SNC) é o mais vulnerável ao dano oxidativo devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados na membrana, alto consumo de oxigênio e aos baixos níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Cafe et al., 1994; Floyd, 1991; Liu et al., 1994).

3. Sistema Neural e Estresse Emocional

O SNC possui papel crucial na regulação da resposta ao estresse oxidativo (Carrasco e Van de Kar, 2003; Ray e Henke, 1990) e ao mesmo tempo é extremamente sensível ao dano oxidativo uma vez que este é rico em substratos oxidáveis, tem alta tensão de oxigênio e baixa capacidade antioxidante (Anderson et al., 1985; Metodiewa e Koska, 2000). A membrana lipídica é altamente suscetível a este tipo de injúria e este evento também pode interferir com a atividade de enzimas associadas à membrana. Além disso, dano oxidativo induz alterações na fluidez da membrana, assim como alterações na permeabilidade a íons (Sandhir et al., 1994). Dessa forma, o sistema neural apresenta uma complexa via neuroquímica de resposta ao estresse, envolvendo comportamento emocional.

Estresse oxidativo induz alterações no comportamento, e está diretamente ligado a ansiedade (Masood et al., 2004). Tem sido sugerido que estresse emocional pode induzir dano oxidativo e considerável alteração do balanço entre fatores pró e antioxidantes no encéfalo de ratos (Fontella et al., 2005). Exposição de ratos a diferentes modelos de estresse tem sido acompanhada por ativação de processos mediados por radicais livres, particularmente peroxidação lipídica (Liu et al., 1994; Manoli et al., 2000).

3.1. Modelo de Estresse por Imobilização e Teste Claro/Escuro

A imobilização é um método fácil e conveniente de induzir estresse psicológico e físico em ratos e em camundongos (Lin et al., 2007; Romanova et al., 1994; Singh et al., 1999). Estudos têm demonstrado que estresse por imobilização aumenta a peroxidação lipídica e diminui a proteção antioxidante no plasma (Liu et al., 1994).

O teste do claro/escuro pode ser útil para avaliar atividade ansiolítica ou ansiogênica em camundongos (Bourin and Hascoet, 2003), o mesmo é realizado logo após a exposição dos animais ao modelo de estresse por imobilização, como uma ferramenta comportamental para avaliar atividade ansiolítica.

O fato do tratamento com antioxidantes atenuar o comportamento induzido pelo estresse e o estresse oxidativo encefálico em ratos sugere que o balanço entre substâncias anti e pró-oxidantes pode estar associado com alterações neurocomportamentais induzidas pelo estresse (Chakraborti et al., 2007). Tem sido relatada que a suplementação exógena de antioxidantes exerce efeito protetor em vários estados patológicos nos quais radicais livres estão envolvidos (Vendemiale et al., 1999). Estes relatos sugerem que exposição ao estresse agudo induz diferentes alterações comportamentais e em marcadores de estresse oxidativo em ratos, sendo que ambas alterações são revertidas pelo tratamento por antioxidantes, indicando assim, o possível envolvimento de radicais livres na resposta ao estresse (Chakraborti et al., 2007).

II. OBJETIVOS

Investigar os efeitos comportamentais e bioquímicos do tratamento de camundongos com diferentes doses de EGCG através da avaliação:

- 1) de alterações em parâmetros comportamentais indicativos de atividade no sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo;
- 2) da proteção da EGCG contra estresse induzido por imobilização;
- 3) de parâmetros de estresse oxidativo pela formação de radicais livres, pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e pelo conteúdo de sulfidril em estruturas cerebrais de animais submetidos ao estresse por imobilização;
- 4) das defesas antioxidantes enzimáticas (SOD e CAT) e não-enzimáticas (TRAP) em estruturas cerebrais de animais submetidos ao estresse por imobilização;

III. Capítulo I

Manuscrito a ser submetido à revista Phytomedicine.

**Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates
Behavioral and Biochemical Alterations Induced by Restraint Stress in
Mice**

Camila Fraga Lech¹, Viviane de Moura Linck¹, Victório Bambini¹, André Simões
Pires¹, Érica Santos Maciel², José Claudio Fonseca Moreira¹, Elaine
Elizabetsky², Mirna Bainy Leal², Carmem Gottfried^{1*}.

¹Research Group in Neuroglial Plasticity, Post-Graduation Program in Biochemistry, Department of Biochemistry and ²Laboratory of Ethnopharmacology, Department of Pharmacology. Institute of Health's Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

***CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Carmem Gottfried
Departamento de Bioquímica
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo
90035 –003 - Porto Alegre, RS - Brazil
Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5565
E-mail: cgottfried@ufrgs.br

ABSTRACT

The green tea extract has been used during many centuries to treat and prevent some diseases. Many of these beneficial effects of green tea are related to its catechin, particularly (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which have been reported to have many pharmacological properties such as the effects of anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-carcinogenic and iron chelation. The objective of the present study, using the restraint stress animal model, was to investigate the protective effects of EGCG on antioxidant defense systems in hippocampus and cerebral cortex of mice. Light/dark test and locomotor activity were used to analyze behavioral changes after the exposure to restraint stress. EGCG (2.9 and 5.8 mg/Kg) seem to prevent the restraint stress effect on the number of crossings in the light/dark test. The locomotor activity was not altered by any parameters investigated. The biochemical results show that restraint stress improved the hippocampal activity of superoxide dismutase (SOD) in 39%, improved catalase (CAT) activity in 57% and 54% in hippocampus and cerebral cortex respectively. The restraint stress improved de formation of free radicals in hippocampus and cerebral cortex in 11% and 9%. The amount of non-enzymatic antioxidants defenses were decreased by restraint stress in hippocampus and cortex, 23% and 41% respectively. EGCG was able to prevent all these alterations. The understanding of the cell response to stress conditions and the molecular events leading to neural diseases will provide more insight into the identification and development of potent chemopreventive/chemotherapeutic agents that specifically target these pathways.

1. INTRODUCTION

The literature supports the notion that dietary antioxidants play an important role in preventing many human diseases (e.g., cancer, atherosclerosis, stroke, rheumatoid arthritis, neurodegeneration, and diabetes) (Fang et al., 2002). The green tea extract has been used during many centuries to treat and prevent some diseases (Chacko et al., 2010). Many of these beneficial effects of green tea are related to its catechin, particularly (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), content (Chacko et al., 2010; Mandel et al., 2005). Catechins have been reported to have many pharmacological properties such as the effects of anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-ultraviolet, and reduction of blood pressure as well as glucose and cholesterol levels (Yu et al., 2010). EGCG displays potential properties of anticancer and neuroprotection (Chacko et al., 2010; Ravindranath et al., 2008), iron chelation, scavenging of radicals, activation of survival genes and cell signaling pathways. As a consequence these compounds are receiving significant attention as therapeutic cytoprotective agents for the treatment of neurodegenerative and other diseases (Mandel and Youdim, 2004).

The oxidative stress can be defined as an imbalance between the amount of free radicals and the defense system. The antioxidant defense system includes enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). There are also non-enzymatic antioxidants like glutathione (GSH) with important roles in defense mechanisms (Flora, 2007). There is a support for the pathogenic role of reactive oxygen species (ROS) in neurodegenerative diseases (Mandel et al., 2005). ROS are believed to be involved in tissue damage resulting from a variety of insults. This

substances can directly damage cellular proteins, DNA and lipids, and thereby affect all cellular functions (Cochrane, 1991).

Common stress behaviors include constant perceived time urgency, impatience, or easily aroused irritation, as well as hostility and competitiveness (Hilmert et al., 2010). Stress induces changes in emotional behavior, anxiety like state (Bondi et al., 2008) that are associated with oxidative damage (Gilgun-Sherki et al., 2001). Exposure to stress may lead to oxidative injury in various tissues (Fontella et al., 2005), increase plasma levels of thiobarbituric acid reactive substances (Liu et al., 1994; Oishi et al., 1999) and lipid peroxidation in the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, and midbrain (Liu et al., 1996). The nervous system is extremely sensitive to peroxidative damage, since it is rich in oxidizable substrates, has a high oxygen tension and low antioxidant capacity (Cafe et al., 1994; Floyd, 1991; Liu et al., 1994).

Restraint stress is used as an animal model of emotional stress in rats and mice (Glavin et al., 1994; Liu et al., 1994; Sosnovskii and Kozlov, 1992) and a whole range of physiological, behavioral and biochemical parameters have been used for the assessment of the animal's response to stress, including the investigation of drug effects, increasing emphasis on central nervous system mechanisms in peripheral disease. In addition, oxidative stress affects the synaptic plasticity, dendritic morphology, probably through the formation of free radicals (Zaidi and Banu, 2004).

In this study, using the restraint stress animal model, we investigated the protective effects of EGCG on antioxidant defense systems in hippocampus and cortex of mice.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Experiments were performed with male albino mice (CF1) at two months old weighing 40–45 g, purchased from Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde (FEPS) and maintained in our animal facility, under controlled environment ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 h light/12 h dark cycle, free access to standard food [Nuvilab CR1] and water), for at least 1 week before the experiments. All behavioral experiments were performed between 11:00 and 14:00 h. All procedures carried out in accordance with experimental animals institutional policies. Different groups of animals were used in the distinct experiments. The project was approved by the University Ethics Committee (approval 2007881).

2.2. Drugs

All the chemicals were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

2.3. Comportamental Pharmacological Trial:

Groups of mice ($n=6$) were administered orally (by gavage) with EGCG 1.5, 2.9 and 5.8 mg /Kg or NaCl 0.9% (control group). Each animal was watched during 1 minute in the period of 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 minutes and 24 hours after the administration. Behaviors indicating depressive or stimulant activities of central nervous system and autonomic manifestations were observed. The signs observed were: locomotor activity, reaction to stimulus, muscle tone, righting reflex, piloerection, diarrhea, salivation, cyanoses, lachrymation, respiration, tremble, ptosis, hypnoses, convulsion, estereotipypies, vocalization, jump, catatonia, tail of straub, abdominal

contortion. The quantification of the results: (0) no effect, (-) little effect, (+) presence of the effect, (++) intense effect. Lethality was observed during the 24 hours after the drug administration. The results of this trial are going to be used as a parameter to define the doses (Elisabetsky et al., 1995).

2.4. Drug administration

The animals were divided in five groups ($n=7$ per group): 1) control; 2) restraint stressed; 3) EGCG 1.5 mg/Kg + restraint stressed; 4) EGCG 2.9 mg/Kg + restraint stressed; 5) EGCG 5.8 mg/Kg + restraint stressed. EGCG were dissolved in 0.9% sterile NaCl, and administered orally (by gavage) once a day during 30 days.

2.5. Restraint Stress

The restraint stress section started 24 hours after the last EGCG administration. The animals were taken into the dark room where the restraint stress procedures were carried out. Each animal were placed in a plastic tube, with plaster tape on the outside, so that the animal was unable to move. There were some holes on the plastic tube for breathing. The animals were restrained during 100 minutes.

2.6. Behavioral tests

Light/dark test: The apparatus of the light/dark test consisted of a rectangular wood box (46 x 27 x 30 cm), divided in to one small (18 x 27 cm) and one large (27 x 27 cm) areas, with a door-like opening (7,5 x 7,5 cm) in the center of the separation. The small compartment was painted in black and light-free, where as the large one was white and brightly lit with two 60 W cold light sources.: Immediately after living the restraint stress each animal was individually placed in the center of the bright compartment (facing away from the

door) and the following parameters were noted for 5min: latency to the first crossing from one compartment to the other, time spent in the light compartment and the number of crossings between the light and dark compartments. The test was performed in a quiet and darkened room (red bulb), and mice were kept in this room for at least 1 h before the session (Piato et al., 2010).

Locomotor activity assessment: Immediately after living the light/dark test, the mice were individually placed in the activity cages to evaluate the spontaneous locomotor activity. The crossings were recorded for 15 min, being the first 5 min of exploratory and the 10 final minutes of locomotor activity. The method to evaluate spontaneous locomotor activity was adapted from Creese *et al.* (1976). Activity cages (45 cm x 25 cm x 20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Brazil), equipped with three parallel photocells and automatically recorded the number of crossings (Schmidt et al., 2009).

2.7. Biochemical tests

Analysis: Animals were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine and xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and were killed by decapitation (Ribeiro et al., 2009). Brain structures (hippocampus and cortices) were dissected to the followed tissue analyses.

Preparation of the tissue samples: The animals were killed by decapitation 24 h after the exposure to stress. Brain structures, hippocampus and cortices were quickly dissected out and were stored at minus 70°C until analysis, when they were homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), containing 140 mM KCl and 1 mM EDTA. The homogenates were centrifuged (700 x g, 5 min) to remove cellular debris. Supernatants were

used to all biochemical assays described herein. All the results were normalized by the protein content using bovine albumin as standard (Lowry et al., 1951).

Superoxide Dismutase Activity: Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (Bannister and Calabrese, 1987). The results were expressed as U/mg protein.

Catalase Activity: Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease of H₂O₂ absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). One unit (U) of the enzyme is defined as 1 μmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is reported as U/mg protein.

Free radical content: To assess the free radicals content we used DCFH-DA as a probe. This method does not determine the presence of specific free radicals, because DCFH may be oxidized by several reactive intermediates (Wang and Joseph, 1999). An aliquot of the sample was incubated with DCF-DA (100 μM) at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by chilling the reaction mixture in ice. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000). Values were obtained as fluorescence units/mg protein and expressed as % of control.

Lipid Peroxidation: As an index of lipid peroxidation, the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction has been used (Draper and Hadley 1990). Briefly, the samples were mixed with 1 ml of trichloroacetic acid (TCA) 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67%, then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the

absorbance at 535 nm. All the results were expressed as nmol/mg protein. (Lowry et al., 1951).

Total Radical-Trapping Potential (TRAP) Assay: TRAP represents the amount (quantity) of non-enzymatic antioxidants present in the sample. The total reactive antioxidant potential has been described (Lissi et al., 1992). We used this test as an index of the non-enzymatic antioxidant capacity on simple, based on the peroxy radical (generated by AAPH solution, 2,2'-azobis[2-amidinopropane], with luminol) quenching by sample compounds. The reading is done by chemiluminescence emission. Briefly we prepared AAPH solution and added luminol (system); thereafter we waited for 1 h for the system stabilization to do the first reading. After the sample addition we analyze the readings for nearly 30 min. The results were transformed in percentual and the area under curve (AUC) was calculated by software (GraphPad Software Inc.1, San Diego, CA, USA –version 5.00) as described

Measurement of Protein Thiol Content: Other assay that serves to analyze oxidative alterations in proteins is to measure the level of protein thiol content in samples. Briefly, an aliquot was diluted in SDS 0.1% and 0.01 M 5,5'-dithionitrobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) in ethanol was added and the intense yellow color was developed and read in a spectrophotometer at 412 nm after 20 min. Free sulfhydryl (–SH) content was estimated in supernatants of 20% TCA precipitated homogenates by the same method (Ellman, 1959). Results are expressed as $\mu\text{mol SH/mg protein}$.

2.8. Statistical Analysis.

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.); P values were considered significant when $P < 0.05$. Statistical significance was

assessed using one way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc (SPSS 15.0 for Windows) to determine differences among specific groups at the behavioral results. One way ANOVA was used followed by Tukey's post-hoc (SPSS 15.0 for Windows) to determine differences among specific groups at the biochemical results.

3. RESULTS

3.1. Behavioral Tests

3.1.1. Comportamental Pharmacological Trial

Results of the comportamental pharmacological trial indicated that administration of EGCG at 1.5, 2.9 e 5.8 mg/Kg did not alter comportamental parameters (data not shown).

3.1.2. Light/Dark Test

The number of crossings between compartments in the light/dark test (show in Fig. 1) was significantly decreased in the group exposed to restraint stress when compared to control group ($P < 0.01$). EGCG 2.9 and 5.8 mg/Kg (but not 1.5 mg/Kg) prevented the restraint stress effect on the number of crossings.

3.1.3. Locomotor Activity

The locomotor activity was not altered by any parameters investigated as demonstrated in Fig. 2.

3.2. Antioxidant Enzymes Activities

3.2.1. SOD activity

In order to investigate antioxidant parameters, it was measured the activity of SOD which is considered a key antioxidant defense enzyme, dismutating superoxide anion - free radical into hydrogen peroxide. As demonstrated in Fig. 3A, restraint stress induced a significantly increase (39%) in hippocampus SOD activity compared to the control group (from 44.68 ± 5.49 to 62.26 ± 2.13 $P < 0.05$). This effect was completely prevented by EGCG, only at 2.9 mg/Kg. In cerebral cortex (Fig. 3B), there was no statistically difference between control and other groups.

3.2.2. CAT activity

Hydrogen peroxide also represents a risk for cells and the enzyme catalase can convert it into water. Restraint stress increased significantly CAT activity in hippocampus (57%, from 2.69 ± 0.22 to 4.22 ± 0.22 , $P < 0.05$) and cerebral cortex (54 %, from 2.48 ± 0.13 to 3.83 ± 0.38) compared to the control group. In the hippocampus, only EGCG 2.9 mg/Kg was able to prevent this effect (Fig. 4A). However, in cerebral cortex, all doses of EGCG prevented the increase in CAT activity induced by restraint (Fig. 4B).

3.3. Oxidative Damage Parameters

3.3.1. DCF

DCFH-DA was used to access the free radicals content. As demonstrated in Fig. 5A, restraint stress induced a significantly increase (11%) in hippocampal free radical production compared to the control group (from 10959.50 ± 158.05 to 12163.00 ± 298.61 , $P < 0.05$). This effect was completely prevented by EGCG, only at 2.9 mg/Kg. Restraint stress induced a significantly increase (9%) in cortical free radical production compared to the control group

(from 9676.00 ± 147.24 to 10523.25 ± 136.46 , $P < 0.05$). This effect was completely prevented by EGCG, only at 1.5 mg/Kg (Fig. 5B).

3.3.2. Lipid Peroxidation

TBARS assay measures the formation of malondialdehydes (MDA), which are products of lipid peroxidation. As demonstrated in Fig. 6, no alterations were detected in TBARS between control and other groups.

3.3.3. Total Radical-Trapping Potential

TRAP represents the amount (quantity) of non-enzymatic antioxidants present in the sample. Results for TRAP assay are shown in Fig. 7. Restraint stress induced a significantly decrease in non-enzymatic antioxidants at both hippocampal (23%) and cortical (41%) structures and all doses of EGCG prevented the decrease in TRAP induced by restraint stress.

3.3.4. Protein Thiol Content

As demonstrated in Fig. 8, no alterations were detected in thiol content between control and other groups.

4. DISCUSSION

Naturally occurring substances provides a new insight in aging and associated diseases, such as Parkinson and Alzheimer. In this context, the mechanisms of action of chemopreventive compounds derived from plants have gained considerable attention in research related to stress conditions. The present work investigated the effect of EGCG on neural parameters under restraint stress model.

Restraint stress is a well-known method for the production physical and emotional stress (Singh et al., 1999) and has been shown to bring about antioxidant defense changes in the plasma of rats (Al-Qirim et al., 2002). The activities of SOD and CAT in blood are also increased during and after acute stress (Oishi et al., 1999). All cells in the body are exposed chronically to oxidants from both endogenous and exogenous sources but are also equipped with an antioxidant system. Reactive oxygen and nitrogen species, if unchecked, can contribute to chronic disease development by oxidatively modifying lipids, nucleic acids and proteins (Liu et al., 1996).

Comportamental pharmacological trial can indicate depressive or stimulant activities of central nervous system and autonomic manifestations. Results of the comportamental pharmacological trial indicated that EGCG did not alter comportamental parameters. Moreover, lethality was not observed at any dose of EGCG (data not shown).

The light/dark test and the locomotor activity were used to analyze behavioral changes induced by restraint stress. The light/dark test may be useful to predict anxiolytic-like or anxiogenic-like activity in mice after stress exposure (Bourin and Hascoet, 2003). EGCG seem to prevent the restraint stress effect on the number of crossings in the light/dark test. The locomotor activity was not altered by any parameters investigated, indicating that the restraint stress and the EGCG did not interfere in the mice locomotor activity.

In this study, the areas of interest analyzed were cortex and hippocampus, these brain areas were chosen due to their known involvement in stress response. In summary, the present data showed that restraint stress can interfere with the activity of SOD and CAT, with the free radical content and with

the amount of non-enzymatic antioxidants. The biochemical results show that restraint stress improved the hippocampal activity of SOD in 39%, improved CAT activity in 57% and 54% in hippocampus and cerebral cortex, respectively. The restraint stress also improved the hippocampal and cortical formation of free radicals in 11% and 9%, and the amount of non-enzymatic antioxidants were decreased by restraint stress in hippocampus and cortex, 23% and 41% respectively. EGCG was able to prevent these alterations, indicating a neuroprotective effect.

The understanding of the cell response to stress conditions and the molecular events leading to neural diseases will provide more insight into the identification and development of potent chemopreventive/chemotherapeutic agents that specifically target these pathways. Future studies from cell cultures should be integrated with studies *in vivo* to fully elucidate the molecular mechanisms of action of EGCG.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5. REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Al-Qirim, T. M., Shahwan, M., Zaidi, K. R., Uddin, Q., Banu, N., 2002. Effect of khat, its constituents and restraint stress on free radical metabolism of rats. *J Ethnopharmacol* 83, 245-250.
- Bannister, J. V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32, 279-312.
- Bondi, C. O., Rodriguez, G., Gould, G. G., Frazer, A., & Morilak, D. A. (2008). Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. *Neuropsychopharmacology*, 33(2), 320-331.
- Bourin, M., Hascoet, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55-65.
- Cafe, C., Torri, C., Gazzaniga, L., Adinolfi, D., & Marzatico, F. (1994). Oxygen radicals in central nervous system injury. *Minerva Anesthesiol*, 60(10), 517-521.
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chin Med*, 5, 13.
- Cochrane, C. G. (1991). Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med*, 12(2), 137-147.
- Dresch, M. T., Rossato, S. B., Kappel, V. D., Biegelmeyer, R., Hoff, M. L., Mayorga, P., Zuanazzi, J. A., Henriques, A. T., Moreira, J. C., 2009. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* 385, 107-114.

Driver, A. S., Kodavanti, P. R., Mundy, W. R., 2000. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol* 22, 175-181.

Elisabetsky, E., Amador, T. A., Albuquerque, R. R., Nunes, D. S., Carvalho Ado, C., 1995. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. *J Ethnopharmacol* 48, 77-83.

Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.

Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.

Flora, S. J. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 53(1), 1-2.

Floyd, R. A. (1991). Oxidative damage to behavior during aging. *Science*, 254(5038), 1597.

Fontella, F. U., Siqueira, I. R., Vasconcellos, A. P., Tabajara, A. S., Netto, C. A., & Dalmaz, C. (2005). Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem Res*, 30(1), 105-111.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959-975.

Hilmert, C. J., Ode, S., Zielke, D. J., & Robinson, M. D. (2010). Blood pressure reactivity predicts somatic reactivity to stress in daily life. *J Behav Med*.

Lissi, E., Pascual, C., Del Castillo, M. D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17, 299-311.

Liu, J., Wang, X., & Mori, A. (1994). Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem*, 26(4), 511-517.

Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M. K., Yeo, H. C., Mori, A., & Ames, B. N. (1996). Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J*, 10(13), 1532-1538.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

Mandel, S., & Youdim, M. B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, 37(3), 304-317.

Mandel, S. A., Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T., et al. (2005). Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals*, 14(1-2), 46-60.

Oishi, K., Yokoi, M., Maekawa, S., Sodeyama, C., Shiraishi, T., Kondo, R., et al. (1999). Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand*, 165(1), 65-69.

Piato, A. L., Detanico, B. C., Linck, V. M., Herrmann, A. P., Nunes, D. S., Elisabetsky, E., (2010). Anti-stress effects of the "tonic"*Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. *Phytomedicine* 17, 248-253.

Ravindranath, M. H., Ramasamy, V., Moon, S., Ruiz, C., & Muthugounder, S. (2008). Differential Growth Suppression of Human Melanoma Cells by Tea (*Camellia sinensis*) Epicatechins (ECG, EGC and EGCG). *Evid Based Complement Alternat Med*.

Ribeiro, L. C., Quincozes-Santos, A., Leite, M. C., Abib, R. T., Kleinkauf-Rocha, J., Biasibetti, R., et al. (2009). Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neurosci Res*, 64(3), 330-334.

Schmidt, A. P., Bohmer, A. E., Antunes, C., Schallenberger, C., Porciuncula, L. O., Elisabetsky, E., Lara, D. R., Souza, D. O., 2009. Antinociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 156, 163-172.

Singh, L. K., Pang, X., Alexacos, N., Letourneau, R., Theoharides, T. C., 1999. Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav Immun* 13, 225-239.

Sosnovskii, A. S., & Kozlov, A. V. (1992). [Increased lipid peroxidation in the rat hypothalamus after short-term emotional stress]. *Biull Eksp Biol Med*, 113(5), 486-488.

Yu, P. L., Pu, H. F., Chen, S. Y., Wang, S. W., & Wang, P. S. (2010). Effects of catechin, epicatechin and epigallocatechin gallate on testosterone production in rat leydig cells. *J Cell Biochem*, 110(2), 333-342.

Zaidi, S. M., & Banu, N. (2004). Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta*, 340(1-2), 229-233.

Wang, H., Joseph, J. A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27, 612-616.

Figure 1. Effects of EGCG in the mice light/dark model. Number of crossings. EGCG 1.5, 2.9 e 5.8 mg/ Kg administered orally (by gavage) once a day during 30 days. Each column represents the mean \pm S.E.M. ($n= 7$). * $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group. ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated group. One way ANOVA was followed by Duncan's post-hoc.

Figure 2. Effects of EGCG on spontaneous locomotor activity: (A) First 5 min of exploratory activity and (B) Final 10 min of locomotor activity. EGCG 1.5, 2.9 e 5.8 mg/ Kg administered orally (by gavage) once a day during 30 days. Each column represents the mean \pm SEM. ($n= 7$). One way ANOVA was followed by Duncan's post-hoc.

Figure 3. Effects of restraint stress and different doses of EGCG on SOD activity. (A) Hippocampus. (B) Cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. ($n= 5$). A $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group. B $P < 0.05$ vs. restraint stressed group. One way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc.

Figure 4. Effects of restraint stress and different doses of EGCG on CAT activity. (A) Hippocampus. (B) Cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. ($n= 5$). A $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group. B $P < 0.05$ vs. restraint stressed group. One way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc.

Figure 5. Effects of restraint stress and different doses of EGCG on free radicals production using the DCF test. (A) Hippocampus. (B) Cerebral

cortex. Data are mean \pm S.E.M. ($n= 5$). A $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group. B $P < 0.05$ vs. restraint stressed group. One way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc.

Figure 6. Effects of restraint stress and different doses of EGCG on lipid peroxidation using the TBARS assay. (A) Hippocampus. (B) Cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. ($n= 5$). One way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc.

Figure 7. Effects of restraint stress and different doses of EGCG on non-enzymatic antioxidants using the TRAP assay. (A) Hippocampus. (B) Cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. ($n= 5$). A $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group. One way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc.

Figure 8. Effects of restraint stress and different doses of EGCG on thiol content. (A) Hippocampus. (B) Cerebral cortex. Data are mean \pm S.E.M. ($n= 5$). One way ANOVA was followed by Tukey's post-hoc.

Figure 1.

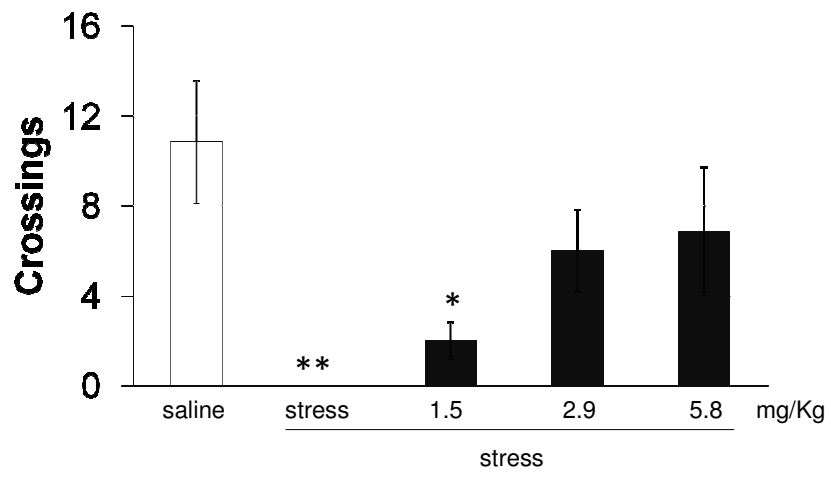


Figure 2.

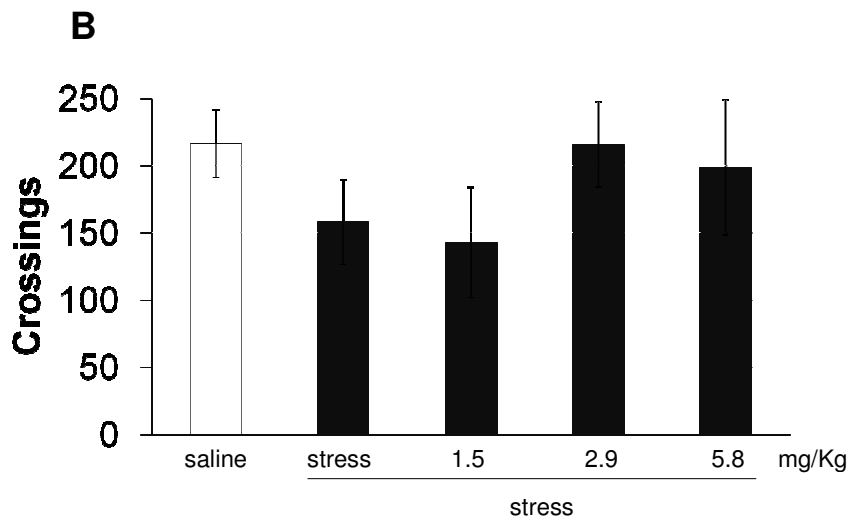
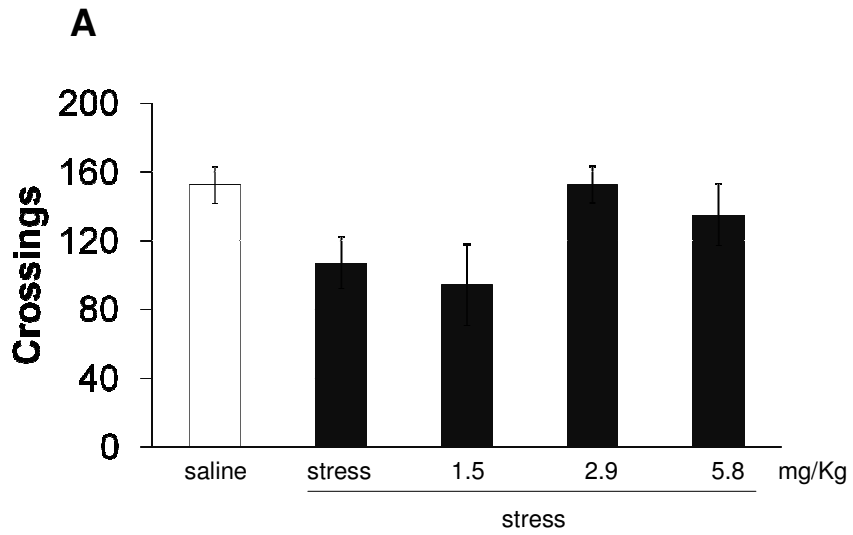


Figure 3.

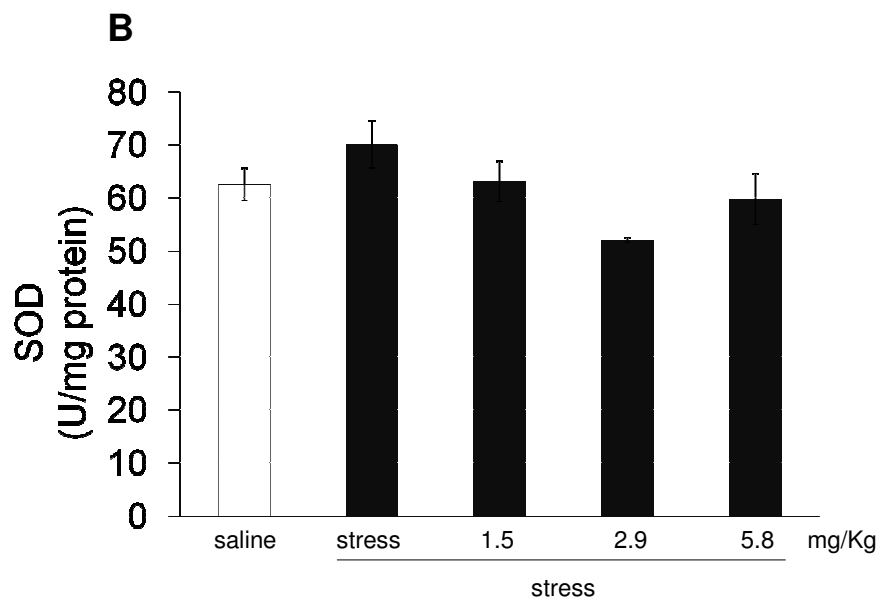
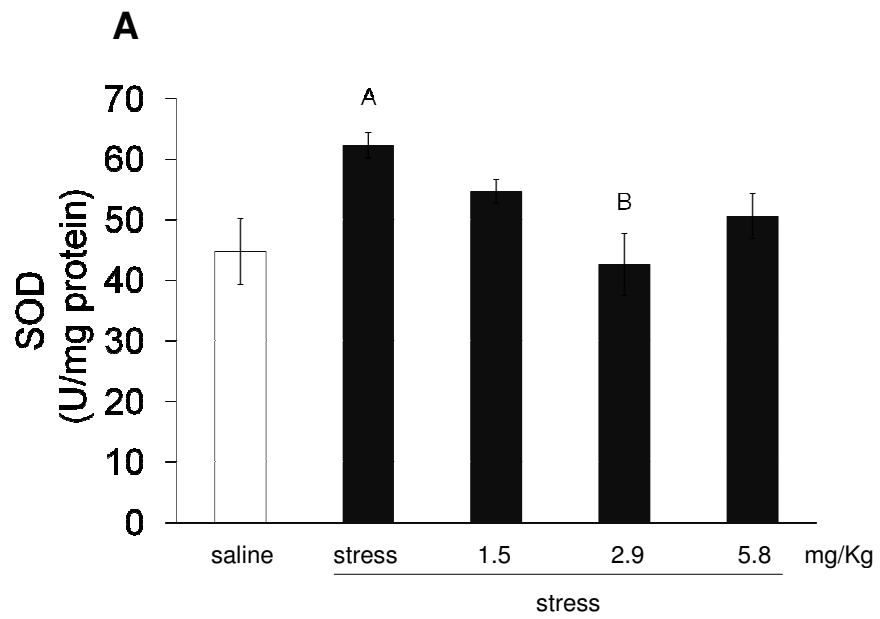


Figure 4.

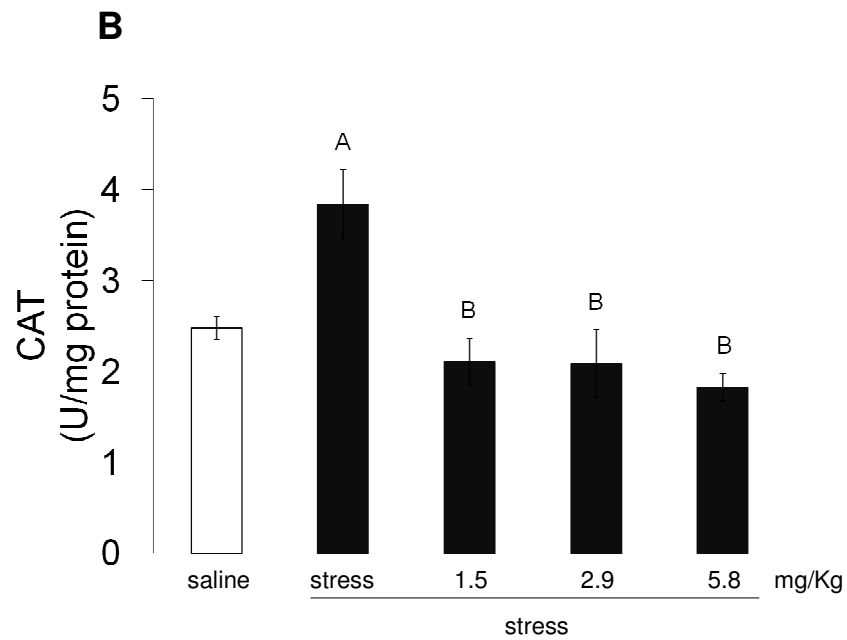
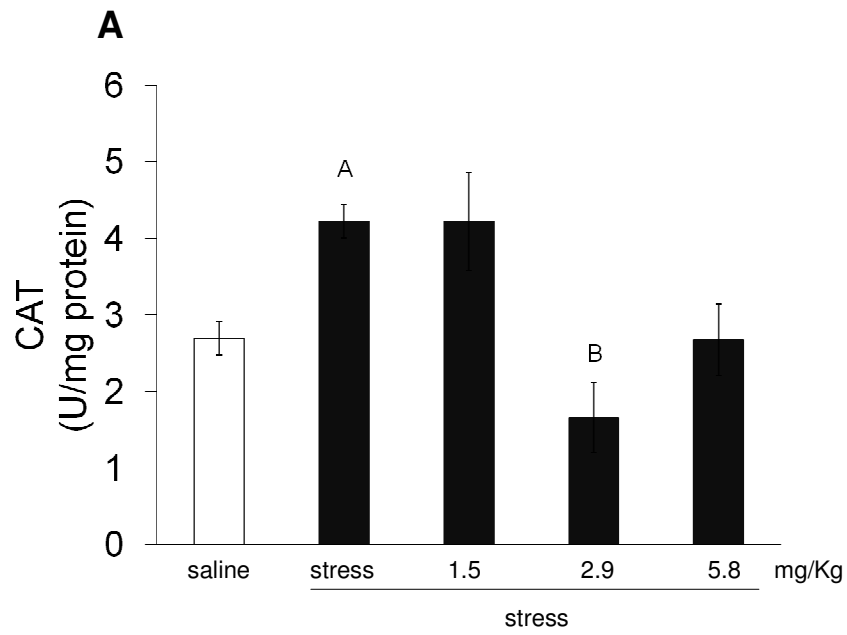


Figure 5.

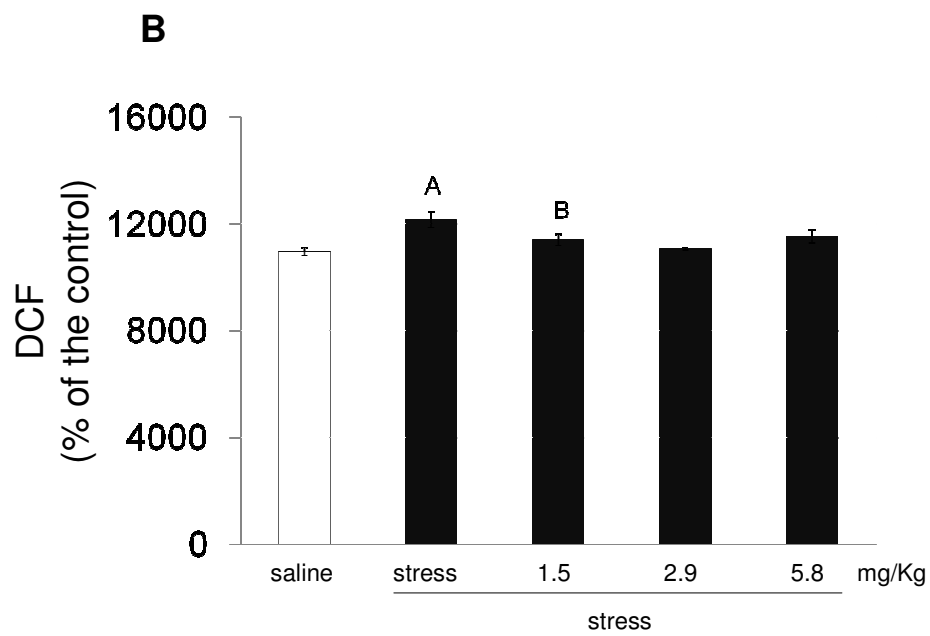
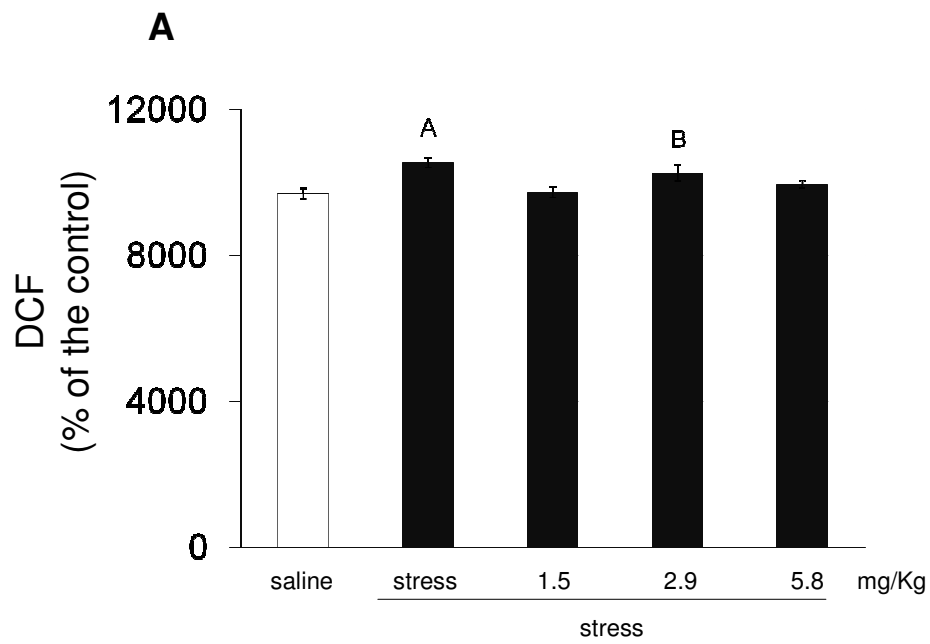


Figure 6.

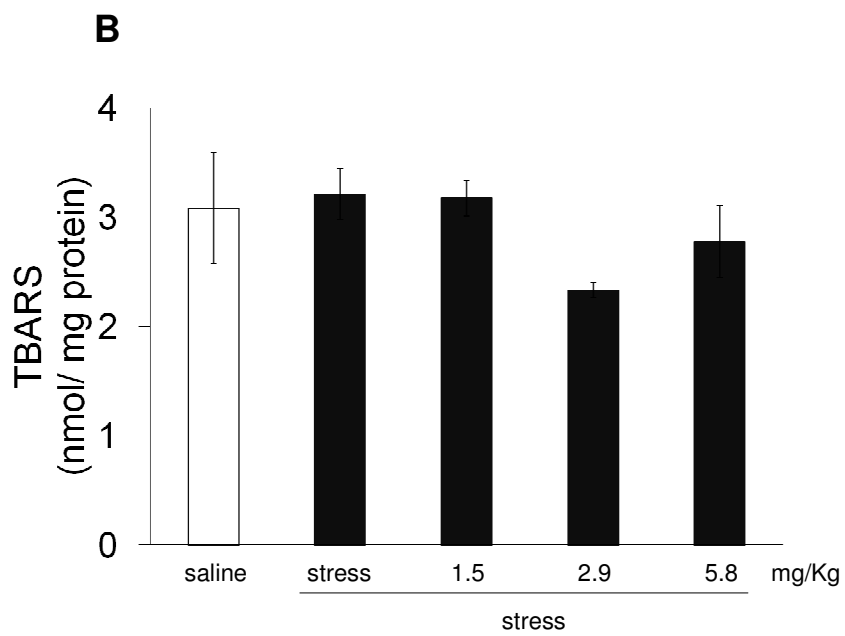
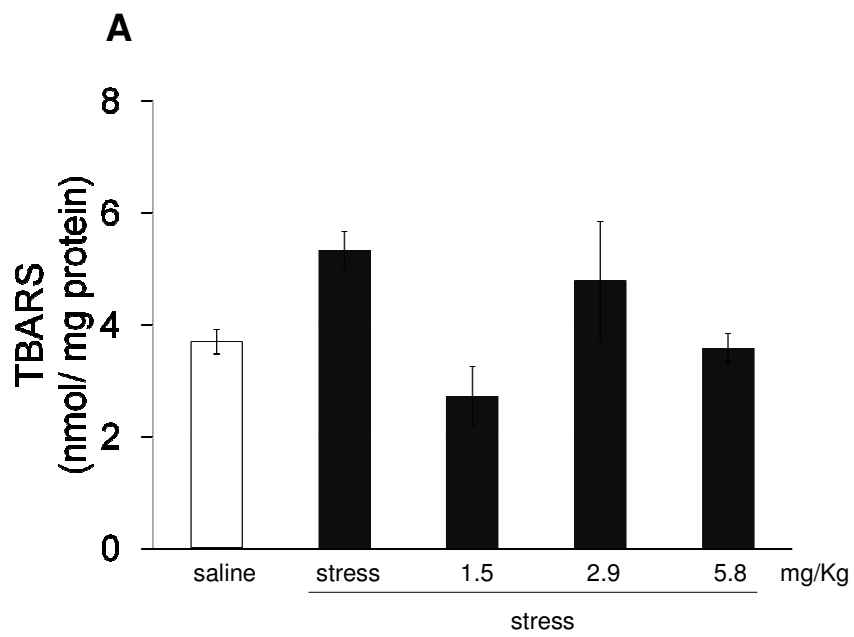


Figure 7.

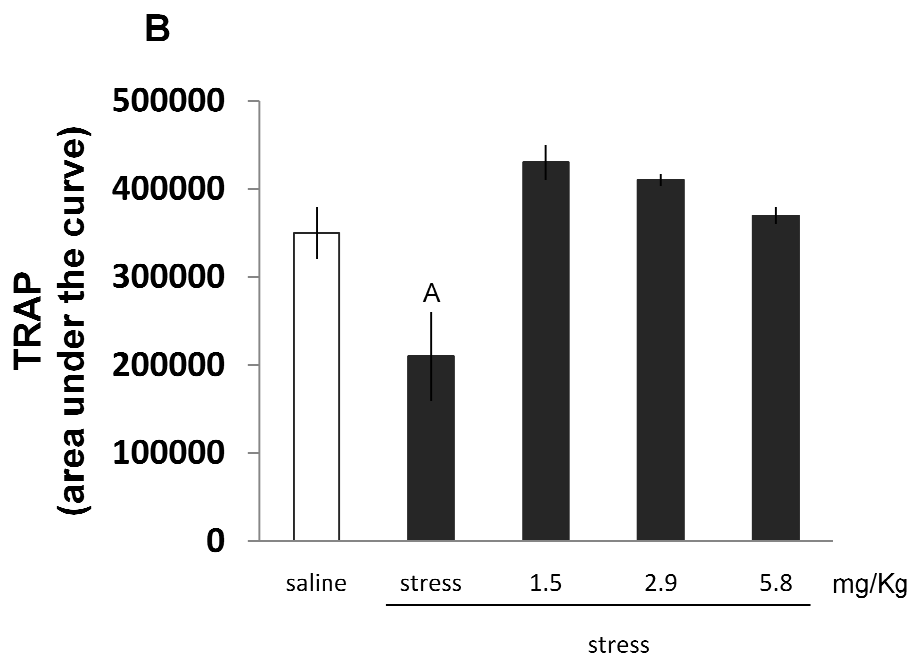
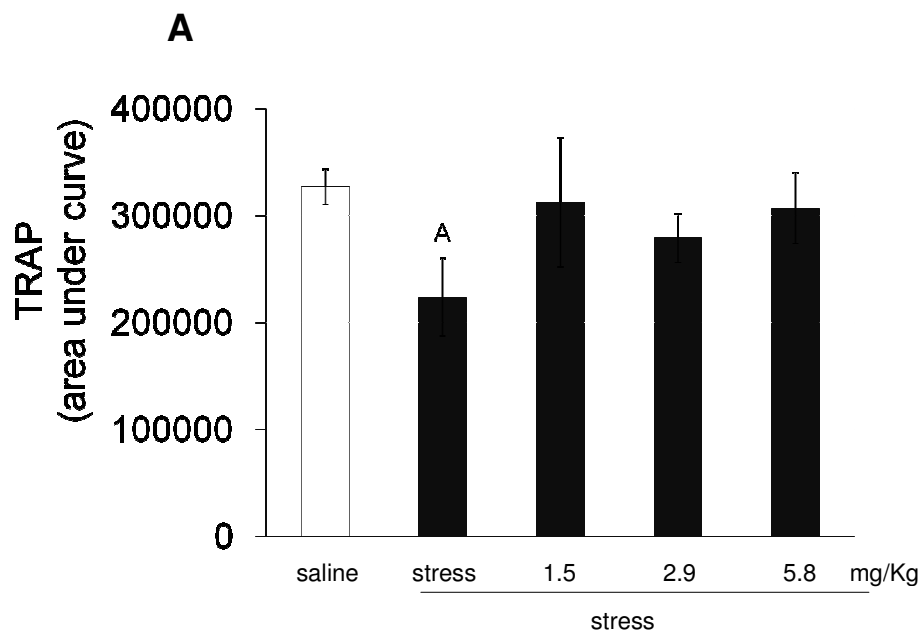
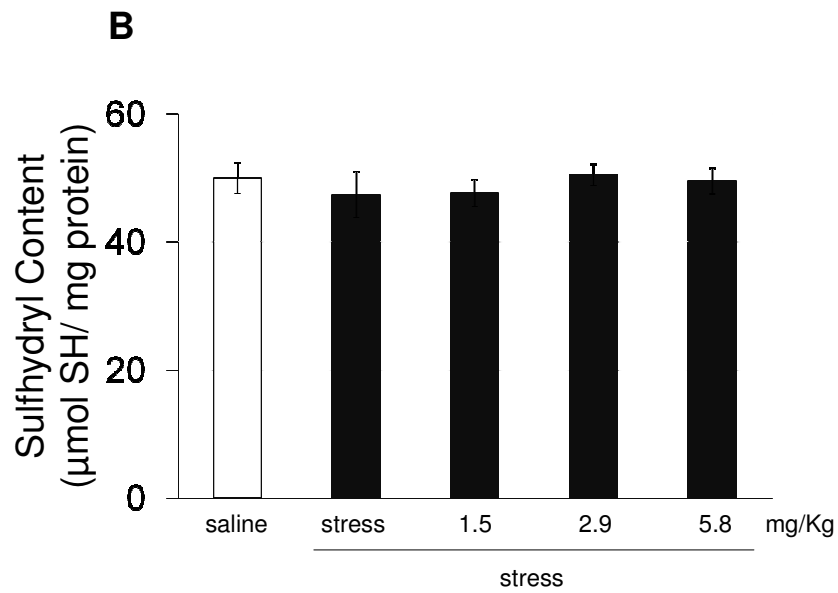
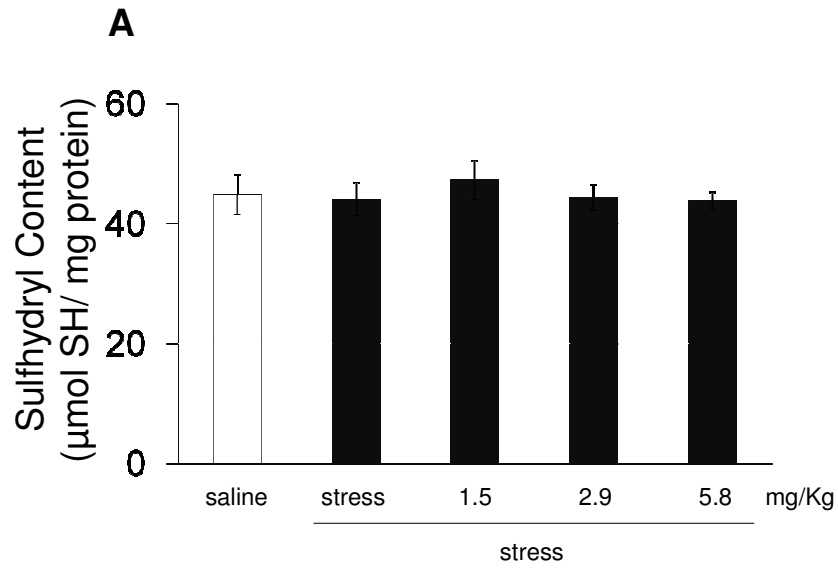


Figure 8.



6. DISCUSSÃO

Muitos pesquisadores no mundo todo têm trabalhado no sentido de validar o uso de plantas medicinais e o isolamento de seus metabólitos com efeitos biológicos. Entretanto, é importante mencionar que numerosas plantas medicinais podem apresentar atividades no sistema nervoso (autônomo e central). A triagem farmacológica comportamental é uma metodologia importante que possibilita a detecção de efeito central ou autônomo apresentado pela substância analisada. Os resultados obtidos nesta triagem não revelaram alterações comportamentais, indicando que o tratamento agudo de EGCG via oral nas doses de 1,5; 2,9; e 5,8 mg/Kg não altera parâmetros indicativos de atividade no sistema nervoso central ou no sistema nervoso autônomo. Também não foi observada letalidade em nenhuma das doses de EGCG (dados não mostrados).

O teste do claro/escuro e teste de atividade locomotora espontânea foram utilizados para analisar alterações comportamentais nos camundongos após exposição destes ao estresse por imobilização.

O teste do claro/escuro pode ser útil para avaliar atividade ansiolítica ou ansiogênica em camundongos (Bourin e Hascoet, 2003), e o mesmo é realizado logo após a exposição ao modelo de estresse por imobilização, como uma medida comportamental do estresse. Diferenças entre os tipos de estressores externos como o manuseio dos animais e condições de armazenamento podem acarretar em resultados variados, afetando a resposta comportamental dos animais, uma vez que o estresse pode afetar a atividade motora dos roedores (Bourin e Hascoet, 2003). Neste estudo, no teste do

claro/escuro, os animais submetidos ao estresse por imobilização e tratados com EGCG nas doses de 2,9 e 5,8 mg/Kg apresentaram número de cruzamentos entre os compartimentos semelhante ao grupo controle, demonstrando, desta forma, uma tendência a reversão da imobilidade causada pelo estresse por imobilização no teste do claro/escuro. Diferentemente do grupo tratado com EGCG na dose de 1,5 mg/Kg. Uma hipótese para a imobilidade observada no teste do claro/escuro é o fato de que os animais foram retirados do estresse por imobilização e foram imediatamente expostos a outra situação aversiva, sendo esta a área clara do teste claro/escuro. Nenhuma alteração foi observada na atividade locomotora espontânea, indicando que o modelo de estresse por imobilização e o tratamento com EGCG não interferiram na atividade locomotora espontânea dos animais.

Para as análises bioquímicas, foram isolados hipocampo e córtex cerebral destes animais. Atividade enzimática antioxidante (SOD e CAT), medida de defesas antioxidantes não-enzimáticas (TRAP), e parâmetros de dano oxidativo (TBARS e conteúdo de SH) foram analisados. Este estudo demonstra alterações na homeostase oxidativa induzida por estresse por imobilização. Estas alterações incluem modulação na atividade de SOD e de CAT, na formação de radicais livres e no perfil antioxidante não enzimático.

O estresse por imobilização é um método clássico de induzir estresse físico e emocional (Singh et al., 1999), e é capaz de alterar defesas antioxidantes no plasma de ratos (Al-Qirim et al., 2002). De fato, estudos prévios demonstraram que a atividade de SOD e de CAT pode aumentar no sangue durante e após exposição ao estresse por imobilização (Oishi et al., 1999).

No presente trabalho, o estresse por imobilização induziu aumento na atividade de SOD e de CAT, tanto em hipocampo quanto em córtex cerebral, sugerindo um mecanismo de resposta encefálica ao estresse por imobilização ao qual os animais foram submetidos. O tratamento com EGCG fez com que estes parâmetros retornassem aos níveis basais, provavelmente por sua ação *per se* antioxidante, dispensando um aumento na atividade de sistemas enzimáticos antioxidantes.

Estresse por imobilização induziu aumento da formação de radicais livres medidos pela oxidação do DCF, tanto em hipocampo quanto em córtex cerebral, e este efeito pode estar associado com o aumento na atividade de SOD e de CAT induzido pelo modelo de estresse.

Perfil antioxidante não enzimático foi diminuído no grupo submetido ao estresse por imobilização, enquanto que o tratamento com EGCG foi capaz de prevenir este efeito, indicando uma ação protetora.

O índice de dano causado normalmente pelos radicais livres no organismo foi determinado pela peroxidação lipídica, que é considerada marcador importante do estresse oxidativo e, também, um dos principais fatores envolvidos no dano celular, causado por estes radicais (Balu et al., 2005). Entretanto, neste estudo os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e o conteúdo de sulfidril não foram alterados pelo modelo de estresse por imobilização. Este fato pode ser resultado da exposição aguda ao estresse por imobilização, o qual não foi suficiente para causar dano em lipídeos.

Naturalmente ao longo do dia, as células do nosso organismo são expostas cronicamente a agentes oxidantes, oriundos de fontes endógenas e exógenas, e precisam manter um bom sistema de defesa antioxidante. Além disso, esse sistema de defesa sofre um prejuízo com o avanço da idade, relacionando-se com o surgimento de doenças neurodegenerativas devido ao aumento nos níveis de espécies reativas e de radicais livres (Joseph et al., 2009). Esse prejuízo no sistema redox pode contribuir para desenvolvimento de diversas doenças por modificar a estrutura e função de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Liu et al., 1996). O sistema nervoso central passa a ser um grande alvo para as espécies reativas de oxigênio por apresentar altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, alto consumo de oxigênio e grande conteúdo de metais de transição (Floyd e Carney, 1992). EGCG e outros polifenóis podem prevenir estresse oxidativo induzido por abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (mPTP) via diminuição da produção das proteínas Bax e Bad, as quais podem favorecer o aumento de Bcl-2 e a razão Bcl-xL/ Bax-Bak (Mandel e Youdim, 2004).

Os polifenóis possuem estrutura muito favorável ao sequestro de radicais livres. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (Halliwell, 2006).

A molécula de EGCG era vista apenas como antioxidante e antiinflamatória, mas no presente momento a EGCG é considerada multimodal e envolve vários mecanismos neuroprotetores incluindo atividade quelante de

ferro, sequestro de radicais livres e ativação da via de sinalização PKC e de genes pró-sobrevivência (Weinreb et al., 2009).

Os resultados apresentados aqui demonstram que níveis adequados de EGCG podem modular sistemas de defesas antioxidantes encefálicos mediante condições decorrentes de estresse, neste caso evidenciado pelo modelo agudo de estresse por imobilização. Novas abordagens são necessárias para confirmar o efeito protetor deste polifenol em modelo crônico.

8. REFERÊNCIAS

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.

Anderson, D. K., Saunders, R. D., Demediuk, P., Dugan, L. L., Braugher, J. M., Hall, E. D., Means, E. D., Horrocks, L. A., 1985. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma* 2, 257-267.

Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., Panneerselvam, C., 2005. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Dev Neurosci* 23, 501-507.

Bannister, J. V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32, 279-312.

Bondi, C. O., Rodriguez, G., Gould, G. G., Frazer, A., Morilak, D. A., 2008. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. *Neuropsychopharmacology* 33, 320-331.

Butterfield, D., Castegna, A., Pocernich, C., Drake, J., Scapagnini, G., Calabrese, V., 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 13, 444.

Bourin, M., Hascoet, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55-65.

Cabrera, C., Artacho, R., Gimenez, R., 2006. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr* 25, 79-99.

Cafe, C., Torri, C., Gazzaniga, L., Adinolfi, D., Marzatico, F., 1994. Oxygen radicals in central nervous system injury. *Minerva Anesthesiol* 60, 517-521.

Carrasco, G. A., Van de Kar, L. D., 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463, 235-272.

Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., Nishigaki, I., 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chin Med* 5, 13.

Chakraborti, A., Gulati, K., Banerjee, B. D., Ray, A., 2007. Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behav Brain Res* 179, 321-325.

Chen, L., Lee, M. J., Li, H., Yang, C. S., 1997. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 25, 1045-1050.

Cochrane, C. G., 1991. Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 12, 137-147.

Doronicheva N, Yasui H, Sakurai H. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. *Biol Pharm Bull.* 2007, 30:213-7.

Elisabetsky, E., Amador, T. A., Albuquerque, R. R., Nunes, D. S., Carvalho Ado, C., 1995. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. *J Ethnopharmacol* 48, 77-83.

Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.

Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.

Flora, S. J., 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 53, 1-2.

Floyd, R. A., 1991. Oxidative damage to behavior during aging. *Science* 254, 1597.

Floyd, R. A., Carney, J. M., 1992. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 32 Suppl, S22-27.

Fontella, F. U., Siqueira, I. R., Vasconcellos, A. P., Tabajara, A. S., Netto, C. A., Dalmaz, C., 2005. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem Res* 30, 105-111.

Frank, G. C., 2003. Brewing up good health. Research says tea packs power. *Adv Nurse Pract* 11, 55-56.

Frei, B., Higdon, J. V., 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 133, 3275S-3284S.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40, 959-975.

Glavin, G. B., Pare, W. P., Sandbak, T., Bakke, H. K., Murison, R., 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev* 18, 223-249.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634-1658.

Hilmert, C. J., Ode, S., Zielke, D. J., Robinson, M. D., 2010. Blood pressure reactivity predicts somatic reactivity to stress in daily life. *J Behav Med*.

Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A., Wolz, E., 2006. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. *Food Chem Toxicol* 44, 626-635.

Joseph, J., Cole, G., Head, E., Ingram, D., 2009. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci* 29, 12795-12801.

Kazantsev, A. G., 2007. Cellular pathways leading to neuronal dysfunction and degeneration. *Drug News Perspect* 20, 501-509.

Korte, G., Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Geiger, S., Heilmann, J., Sand, P. G., Tea catechins' affinity for human cannabinoid receptors. *Phytomedicine* 17, 19-22.

Lambert, J. D., Lee, M. J., Lu, H., Meng, X., Hong, J. J., Seril, D. N., Sturgill, M. G., Yang, C. S., 2003. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr* 133, 4172-4177.

Lin, L. C., Wang, M. N., Tseng, T. Y., Sung, J. S., Tsai, T. H., 2007. Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J Agric Food Chem* 55, 1517-1524.

Lin, Y. S., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., Lin, J. K., 2003. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem* 51, 1864-1873.

Liu, J., Wang, X., Mori, A., 1994. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem* 26, 511-517.

Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M. K., Yeo, H. C., Mori, A., Ames, B. N., 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 10, 1532-1538.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Mandel, S., Youdim, M. B., 2004. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37, 304-317.

Mandel, S. A., Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M. B., 2005. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals* 14, 46-60.

Manoli, L. P., Gamaro, G. D., Silveira, P. P., Dalmaz, C., 2000. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res* 25, 915-921.

Masood, A., Banerji, B., Vijayan, V. K., Ray, A., 2004. Pharmacological and biochemical studies on the possible role of nitric oxide in stress adaptation in rats. *Eur J Pharmacol* 493, 111-115.

Metodiowa, D., Koska, C., 2000. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res* 1, 197-233.

Nanjo, F., Mori, M., Goto, K., Hara, Y., 1999. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 1621-1623.

Oishi, K., Yokoi, M., Maekawa, S., Sodeyama, C., Shiraishi, T., Kondo, R., Kuriyama, T., Machida, K., 1999. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand* 165, 65-69.

Patel, S. H., 2005. *Camellia sinensis*: historical perspectives and future prospects. *J Agromedicine* 10, 57-64.

Piato, A. L., Detanico, B. C., Linck, V. M., Herrmann, A. P., Nunes, D. S., Elisabetsky, E., Anti-stress effects of the "tonic"*Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. *Phytomedicine* 17, 248-253.

Ravindranath, M. H., Ramasamy, V., Moon, S., Ruiz, C., Muthugounder, S., 2008. Differential Growth Suppression of Human Melanoma Cells by Tea (*Camellia sinensis*) Epicatechins (ECG, EGC and EGCG). *Evid Based Complement Alternat Med*.

Ray, A., Henke, P. G., 1990. Enkephalin-dopamine interactions in the central amygdalar nucleus during gastric stress ulcer formation in rats. *Behav Brain Res* 36, 179-183.

Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R. L., Gendelman, H. E., 2007. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82, 297-325.

Ribeiro, L. C., Quincozes-Santos, A., Leite, M. C., Abib, R. T., Kleinkauf-Rocha, J., Biasibetti, R., Rotta, L. N., Wofchuk, S. T., Perry, M. L., Goncalves, C. A., Gottfried, C., 2009. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neurosci Res* 64, 330-334.

Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., 1993. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 15, 77-96.

Romanova, T. P., Karpel, G. G., Brill, G. E., Markov Kh, M., 1994. [Mechanism of disorders of the cerebral blood supply during stress in spontaneously hypertensive rats]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 5-8.

Sandhir, R., Julka, D., Gill, K. D., 1994. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol Toxicol* 74, 66-71.

Sano, M., Tabata, M., Suzuki, M., Degawa, M., Miyase, T., Maeda-Yamamoto, M., 2001. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst* 126, 816-820.

Schmidt, A. P., Bohmer, A. E., Antunes, C., Schallenberger, C., Porciuncula, L. O., Elisabetsky, E., Lara, D. R., Souza, D. O., 2009. Antinociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 156, 163-172.

Sosnovskii, A. S., Kozlov, A. V., 1992. [Increased lipid peroxidation in the rat hypothalamus after short-term emotional stress]. *Biull Eksp Biol Med* 113, 486-488.

Stavric, B., Matula, T. I., Klassen, R., Downie, R. H., 1996. The effect of teas on the in vitro mutagenic potential of heterocyclic aromatic amines. *Food Chem Toxicol* 34, 515-523.

Thielecke, F., Boschmann, M., 2009. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - a review. *Phytochemistry* 70, 11-24.

Trevisanato, S. I., Kim, Y. I., 2000. Tea and health. *Nutr Rev* 58, 1-10.

Vendemiale, G., Grattagliano, I., Altomare, E., 1999. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 29, 49-55.

Wang, H., Joseph, J. A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27, 612-616.

Wang, Z. Y., Huang, M. T., Lou, Y. R., Xie, J. G., Reuhl, K. R., Newmark, H. L., Ho, C. T., Yang, C. S., Conney, A. H., 1994. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Res* 54, 3428-3435.

Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., Youdim, M. B., 2009. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes Nutr*. H4:283-296.

Wu, C. D., Wei, G. X., 2002. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition* 18, 443-444.

Yang, C. S., Wang, Z. Y., 1993. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 1038-1049.

Yu, P. L., Pu, H. F., Chen, S. Y., Wang, S. W., Wang, P. S., 2010. Effects of catechin, epicatechin and epigallocatechin gallate on testosterone production in rat leydig cells. *J Cell Biochem* 110, 333-342.

Zaidi, S. M., Banu, N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 340, 229-233.

Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., Crichton, R. R.,
2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5,
863-873.

V. ANEXO I

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Ilustração da planta <i>Camellia sinensis</i>	1
Figura 2. Estrutura química das catequinas.....	3
Figura 3. Estrutura química da EGCG.....	4