UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
UNESP/ *CAMPUS* DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Avaliação dos efeitos da *Bidens pilosa* L., *Brassica campestris* L. e sua associação sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica.

JULIANA ROCHA RIBEIRO

Botucatu - SP
2014

JULIANA ROCHA RIBEIRO

Avaliação dos efeitos da *Bidens pilosa* L., *Brassica campestris* L. e sua associação sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Farmacologia.

ORIENTADOR:

PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI

Botucatu - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Ribeiro, Juliana Rocha.
Avaliação dos efeitos da Bidenspilosa L., Brassica campestris L. e sua associação sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica / Juliana Rocha Ribeiro. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Capes: 21001006

1. Canola. 2. Obesidade. 3. Lipídios. 4. Citocinas.

Palavras-chave: Adipocitocinas; Bidens pilosa L.; Brassica campestris L.; Obesidade induzida ; Perfil lipídico.

AUXÍLIO FINANCEIRO

C A P E S

FAPESP

(2009/52471-1)

DEDICATÓRIA

À minha família pelo amor, confiança e principalmente pelo apoio, pois sempre me encorajaram e me incentivaram nas minhas escolhas. Principalmente à Ciomara, minha mãe e conselheira, sem você nada disso seria possível.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Biociências, pela infraestrutura necessária;

Aos funcionários da seção de Pós-graduação pelo serviço prestado;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e à Janete pela disposição, aulas e serviços prestados;

À Pós-graduação de Farmacologia pelo apoio financeiro à participação de congressos nacionais e internacionais;

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi pela oportunidade, orientação e incentivo;

À Empresa Chemyunion LTDA. pela disponibilização dos produtos testados;

Aos pós-doutorandos que juntamente ofereceram disciplinas, participaram de discussões a cerca dos dados desta dissertação no SIMFAR e como membro na banca avaliadora nos exames de qualificação auxiliando no meu desenvolvimento como mestranda;

ÀUNIPEX (FMB), principalmente aos funcionários Dellala e Diego Generoso, pelo auxílio na peletização da ração hipercalórica;

À Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes que gentilmente nos ensinou e nos acompanhou nas dosagens do perfil lipídico;

Aos colegas de Laboratório Adriano Araújo (Doutorado), Aline Witaicenis (Pós-doutorado), Alexandre Chagas (Doutorado), Alexandre Tanimoto (Doutorado), Camila Chiba (Iniciação Científica), Celso Acácio (Pós-doutorado), Ellen de Oliveira (Iniciação Científica), Juliana Serevi (Pós-doutorado), Leonardo Seito (Pós- doutorado), Luiz Domingues Jr. (Doutorado), Tainan Freitas (Mestrado) e Ubirajara Lanza Jr. (Pós-doutorado) pelo auxílio nos experimentos e pelo apoio científico. Especialmente a Ana Elisa Quaqlio (Doutorado) pelo auxílio nas técnicas laboratoriais, a Laura Orsi (Iniciação Científica), a Fabiana Masago (Mestrado) e a Adriana Del Ben (Mestrado) pela participação na etapa da indução da obesidade com camundongos, em particular a última pela participação também nos experimentos com ratos;

Ao órgão de fomento patrocinador deste projeto FAPESP (2009/52471-1).

EPÍGRAFE

“Que as dificuldades que eu experimentar ao longo da jornada
não me roubem a capacidade de encanto.”
Ana Jácomo

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

PRÓLOGO

Durante a realização deste projeto de pesquisa junto ao Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (*FitoFarmaTec*), Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho") sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e como aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, AC: FARMACOLOGIA da mesma instituição, pude, além da execução do projeto de pesquisa de minha dissertação, ampliar minha formação desenvolvendo as seguintes atividades:

Disciplinas cursadas:

Disciplina	Carga horária	Frequência	Conceito
Farmacocinética	**75**	**100**	**B**
Farmacodinâmica: Receptores e interação droga-receptor	**45**	**100**	**A**
Plantas Medicinais: Abordagens de estudo interdisciplinar.	**90**	**100**	**B**
Tópicos Especiais em Farmacologia: Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais	**45**	**100**	**A**
Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória	**30**	**100**	**A**
Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória	**60**	**100**	**A**
Integração das Vias Metabólicas nos Estados Nutricionais	**60**	**100**	**A**
Laboratório de didática em farmacologia	**90**	**91**	**B**
Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória	**30**	**100**	**A**
Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória	**60**	**100**	**A**

Participação em congressos acadêmicos:

- ✓ XI WORKSHOP DE PÓS-GRADUAÇÃO;
- ✓ XXII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL;
- ✓ XIII JORNADA DE NUTRIÇÃO DA UNESP DE BOTUCATU (JONUB);
- ✓ XI CONGRESSO ABERTO AOS ESTUDANTES DE BIOLOGIA (CAEB);
- ✓ XX LATIN-AMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS.

Apresentação de trabalhos (pôster):

RIBEIRO, J. R.; MASAGO, F.; Del Ben, A.; MACHADO, L. O.; QUAGLIO, A. E. V.; DI STASI, L.C. Avaliação preliminar dos efeitos de *Bidens pilosa* L. e *Physalis angulata* L. sobre a obesidade. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22., 2012, Bento Gonçalves -RS. **ANAIS...** XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012.

RIBEIRO, J. R.; MASAGO, F.; Del Ben, A.; MACHADO, L. O.; QUAGLIO, A. E. V.;CHECON, J; DIEMANT, G; VELASQUEZ, M.C; ; DI STASI, L.C. The role of *Bidens* pilosa L. and Physalis angulata L. in obese mice**.** In: Latin-American Congress on Pharmacology and Therapeutics, 20., 2013, La Habana, CUBA. **ANAIS...** XX Latin-American Congress of Pharmacology and Therapeutics, 2013.

Co-autoria em outros trabalhos apresentados:

Del Ben, A.; RIBEIRO, J. R.; MACHADO, L. O.; MASAGO, F.; QUAGLIO, A. E. V.; Di Stasi, L.C. Análise dos efeitos de *Brassica campestris* L. e *Coffea arabica* L. sobre a obesidade. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22., 2012, Bento Gonçalves. **ANAIS...** XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012.

Del Ben, A.; MACHADO, L. O.; RIBEIRO, J. R.; MASAGO, F.; QUAGLIO, A. E. V.;CHECON, J; DIEMANT, G; VELASQUEZ, M.C; ; DI STASI, L.C. Preliminary Evaluation of Brassica campestris and Coffea arabica Effects in Obesity. In: Latin-American Congress of Pharmacology and Therapeutics, 20., 2013, La Habana, CUBA. **ANAIS...** XX Latin-American Congress of Pharmacology and Therapeutics, 2013.

RESUMO

A obesidade é um relevante desafio à saúde publica mundial visto que alcançou proporções pandêmicas como observado pela Organização Mundial de Saúde, estando associada ao aumento no risco de diabetes mellitus tipo 2, complicações cardiovasculares, aterosclerose e dislipidemias. A obesidade ainda não possui cura e é uma doença inflamatória crônica que requer tratamento a longo prazo. Devido ao aumento na incidência mundial da obesidade, aos poucos fármacos disponíveis para tratamento da mesma, os quais possuem efeitos colaterais, a busca por novas alternativas terapêuticas se faz necessária. Considerando que produtos naturais são uma importante estratégia ao tratamento da obesidade selecionamos produtos padronizados das espécies *Bidens pilosa* L. (picão preto) e *Brassica campestris* L. (canola) para o presente projeto, cujos objetivos foram a padronização de um modelo de indução da obesidade por dieta hipercalórica e a investigação das ações isoladas e associadas dos produtos acima no tratamento desta doença. A obesidade foi induzida por dieta hipercalórica em dois modelos animais (camundongos e ratos). Após o período de indução os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: branco, controle, *pair-feeding* e animais tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e associação entre *B. pilosa* e *B. campestris*. O peso corpóreo e a ingesta alimentar foram mensurados em ambos os modelos. Ao término das três semanas de tratamento coletamos amostras do soro para a mensuração de parâmetros bioquímicos. Nos camundongos, mesuramos a proteína C reativa e a leptina. Nos ratos a glicose, leptina, proteína C reativa, β-endorfina, hormônio de crescimento, triacilglicerol, VLDL, LDL, HDL e colesterol total. Além do mais, nos ratos avaliamos parâmetros morfométricos como IMC, índice de Lee, circunferências abdominal e torácica. Após a indução da obesidade, os camundongos apresentaram ganho de massa superior a 40%, obesidade severa e os ratos apresentaram ganho de peso corpóreo de 10%, obesidade moderada. Nos camundongos, os tratamentos com *B. pilosa* e *B. campestris* não reduziram o peso corpóreo, porém *B. pilosa* reduziu a proteína C reativa. Nos ratos tratados com *B. pilosa* e *B. campestris* não reduziram o peso corpóreo, entretanto sua associação reduziu o ganho de peso corpóreo, o colesterol total, VLDL e triacilglicerol. A *B. pilosa* reduziu triacilglicerol, VLDL e aumentar HDL. Em adição, *B. campestris* reduziu colesterol total, LDL e a proteína C reativa. Diante dos dados apresentados podemos elaborar as seguintes conclusões: 1. Camundongo é um modelo animal mais apropriado para a indução de obesidade que o rato; 2. *B. pilosa* associada à *B. campestris* apresentou melhores resultados ao tratamento da obesidade.

ABSTRACT

Obesity is a worldwide major public health challenge with pandemic proportions as noted by World Health Organization. This disease is associated with increased risk of type-2 diabetes, cardiovascular complications, atherosclerosis, dyslipidemia, neurodegenerative and cancer. There is no cure for obesity and it is a chronic inflammatory disease that requires long term treatment. Since increased estimations of worldwide obesity incidence, few available drugs with serious side effects, new strategies to treat obesity are necessary. Based on this, we selected standard plant products from *Bidens pilosa* L. (black jack) and *Brassica campestris* L. (*canola*). The aims of this study were standardizing a model of obesity induction using a high-fat diet for rodents (rats and mice) and investigate isolated and associated products in the treatment of this disease. Obesity was induced by high-fat diet using two animal models (mice and rats). After the obesity induction period, the obese animals were randomly divided experimental groups: non-obese, control, *pair-feeding*, *B. pilosa*, *B. campestris* and *B. pilosa*/*B. campestris*. The body weight and food intake were measured daily in both models in the two experimental steps. At the end of the three weeks of treatment, serum was collected for biochemical assays. In mice, the evaluated parameters were C-reactive protein and leptin. In rats, the evaluated parameters were glucose, leptin, C-reactive protein, β-endorphin, growth hormone, triacylglycerol, VLDL-C, LDL-C, HDL-C and total cholesterol. Moreover, in the rat model, it was possible to measure morphometric parameters such as body mass index, Lee index, thoracic and abdominal circumferences. After obesity induction mice showed a weight gain over 40%, classifying it with severe obesity and rats showed a weight gain of 10%, classifying it with moderated obesity. Mice treated with *B. pilosa* and *B. campestris* were not capable to reduce body weight; however *B. pilosa* reduced C-reactive protein. Rats treated with *B. pilosa* and *B. campestris* did not reduce in body weight, but in contrast their association was capable of reducing body weight gain. Among the biochemical parameters analyzed *B. pilosa* reduced serum triacylglycerol and VLDL and raise HDL. In addition, treatment with *B. campestris* was capable to reduce total cholesterol, LDL and C-reactive protein. *B. pilosa*/ *B. campestris* association reduced total cholesterol, VLDL and triacylglycerol. Facing our data we can conclude: 1. mice were better than rats for obesity induction and, 2. *B. pilosa* associated to *B. campestris* showed the best results to treat obesity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO TECIDO ADIPOSO. 25
FIGURA 2. PLANTAS SELECIONADAS 29
FIGURA 3 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A ALOCAÇÃO DOS CAMUNDONGOS E RATOS EM NOSSO BIOTÉRIO DURANTE TODO O EXPERIMENTO..... 34
FIGURA 4 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL NO EXPERIMENTO COM CAMUNDONGOS 37
FIGURA 5- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL NO EXPERIMENTO COM RATOS 38
FIGURA 6- EVOLUÇÃO DO CONSUMO INDIVIDUAL EM CAMUNDONGOS E RATOS NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 43
FIGURA7 - EVOLUÇÃO DO PESO CORPÓREO EM CAMUNDONGOS E RATOS NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 44
FIGURA 8 – MÉDIA DO DELTA PESO DOS ANIMAIS EM CAMUNDONGOS E RATOS NOS DIFERENTES GRUPOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 46
FIGURA 9 - EVOLUÇÃO DA INGESTA ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS E RATOS NOS DIFERENTES GRUPOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 47
FIGURA 10 - NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA EM CAMUNDONGOS E RATOS NOS DIFERENTES GRUPOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 49
FIGURA 11 - NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C REATIVA EM CAMUNDONGOS E RATOS NOS DIFERENTES GRUPOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 50
FIGURA 12 - NÍVEIS DE GLICOSE PLASMÁTICA EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, B. CAMPESTRIS E B. PILOSA ASSOCIADA À B. CAMPESTRIS NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 51
FIGURA 13- NÍVEIS SÉRICOS DE ADIPONECTINA EM RATOS EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, B. CAMPESTRIS E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 52
FIGURA14 - NÍVEIS SÉRICOS DA B-ENDORFINA EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 53
FIGURA 15 - NÍVEIS SÉRICOS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, B. CAMPESTRIS E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 54

FIGURA 16- NÍVEIS SÉRICOS DE TRIACILGLICEROL EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 55
FIGURA 17 - NÍVEIS SÉRICOS DE VLDL- COLESTEROL EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 56
FIGURA 18 - NÍVEIS SÉRICOS DE HDL – COLESTEROL EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 57
FIGURA 19 - NÍVEIS SÉRICOS DE LDL – COLESTEROL EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 58
FIGURA 20 - NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL EM RATOS TRATADOS COM *B. PILOSA*, *B. CAMPESTRIS* E *B. PILOSA* ASSOCIADA À *B. CAMPESTRIS* NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1- CLASSIFICAÇÃO DO SOBREPESO E DA OBESIDADE PELA OMS 24
QUADRO 2- ESPECIFICAÇÕES DO CARDIOAID™ PLANTSTEROLS 35
QUADRO 3 - MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES DAS RAÇÕES, RC FOCUS 1765 E RC FOCUS 2413 AGROCERES®. 36
QUADRO 4- MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES DAS RAÇÕES, BIOBASE® E RC FOCUS 2413 AGROCERES®. 36
QUADRO 5. RESUMO COMPARATIVO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM CAMUNDONGOS E RATOS 60
QUADRO 6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM RATOS 60
TABELA 1 - COMPARAÇÃO DO PESO CORPÓREO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS E DIETAS AO TERMINO INDUÇÃO DA OBESIDADE. 45
TABELA 2- MENSURAÇÕES ANTROPORMÓFICAS E ÍNDICE DE LEE PARA ANALISAR A OBESIDADE EM RATOS NO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA. 48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **24**

2. OBJETIVOS **32**

3. MATERIAIS & MÉTODOS **34**

3.1. ANIMAIS 34
3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *BIDENS PILOSA* L. 34
3.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *BRASSICA CAMPESTRIS* L. 34
3.4. INDUÇÃO DA OBESIDADE 35
3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL 36
3.6. OBTENÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISE 39
3.7. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MACROSCÓPICOS 39
3.8. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS 39
3.8.1. Determinação por Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA- Sandwich) *40*
3.8.2. Determinação da concentração de triacilgliceróis *40*
3.8.3. Determinação da concentração de colesterol total *41*
3.8.4. Determinação da concentração HDL-colesterol *41*
3.8.5. Determinação da concentração de LDL-colesterol e VLDL-colesterol *41*
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA 41

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO **43**

4.1. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS MODELOS DE OBESIDADE EM DIFERENTES ROEDORES 43
4.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A OBESIDADE 45
4.2.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos *45*
4.2.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos *48*
4.2.2.1. Leptina 48
4.2.2.2. Proteína C Reativa 49
4.2.2.3. Glicemia 50
4.2.2.4. Adiponectina 51
4.2.2.5. β-endorfina 52
4.2.2.6. Hormônio de crescimento 53
4.2.2.7. Triacilglicerol (TAG) 54
4.2.2.8. VLDL-colesterol 55
4.2.2.9. HDL–colesterol 56
4.2.2.10. LDL–colesterol 57
4.2.2.11. Colesterol Total 58

5. CONCLUSÃO **62**

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA **64**

7. ANEXOS **72**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de massa lipídica e pode ser conceituada como uma manifestação física do excesso crônico de lipídeos no organismo (CHAPUT; DOUCET; TREMBLAY, 2012). O acúmulo destes nos adipócitos é devido a questões multifatoriais, tais como pré-disposição genética e influências ambientais. A pré-disposição genética é dada por alterações em genes relacionados ao apetite, ingesta alimentar, balanço energético e metabolismo do tecido adiposo, porém a obesidade necessita de influência ambiental para se manifestar, tais como a inatividade física e fatores dietéticos, nos quais está inserido o aumento no consumo de alimentos ricos em lipídeos e carboidratos (QI; CHO, 2008).

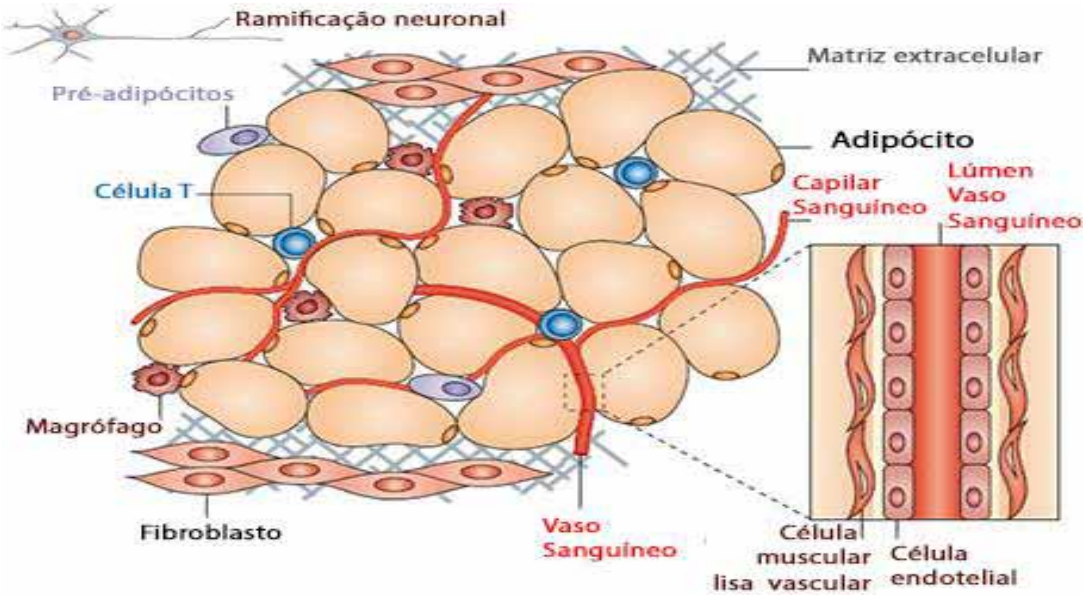
Esta doença é mensurada e diagnosticada pelo IMC: Índice de massa corporal (Kg/m^2) = massa corpórea/altura^2 (Quadro 1). O aumento do IMC é consequência do aumento do tecido adiposo e essa massa corporal é resultante do balanço entre o armazenamento e a remoção de triacilglicerídeos (TAG) nos adipócitos (LANGIN, 2011; OMS, 2013).

Quadro 1- Classificação do sobrepeso e da obesidade pela OMS

Classificação	IMC
Saudável	18.5 - 24.99
Sobrepeso	≥25
Pré-obesidade	25 - 29.99
Obeso	≥ 30
Obeso classe 1	30 - 34.99
Obeso classe 2	35 - 39.99
Obeso classe 3	≥40

O tecido adiposo apresenta uma estrutura tecidual heterogênea (Figura 1) que contêm adipócitos maduros, fibroblastos, células endoteliais, pré-adipócitos, macrófagos, vasos sanguíneos, células T e inervação (FLIERS et al., 2003; FLIER, 2004; AHIMA, 2006; SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH, 2010; OUCHI et al., 2011).

Figura 1- Características histológicas do tecido adiposo.



Fonte: Adaptado de OUCHI et al.(2011).

Inicialmente, o tecido adiposo foi considerado apenas um armazenador de energia, no entanto, após a descoberta da leptina por Zang et al. (1994), este tecido também foi reconhecido por sua função endócrina e metabólica e consequentemente por seu envolvimento em diversos processos fisiológicos tais como a saciedade, a função pancreática e como regulador da quantidade de TAG intracelular (AHIMA; FLIER, 2000; FLIER, 2004; AHIMA, 2006; SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH, 2010; OUCHI et al., 2011).

Outros estudos ainda descreveram que o tecido adiposo possui função imunológica, já que os adipócitos sintetizam e secretam TNF-α (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; LIN et al., 2000). Tanto a função imune quanto a função metabólica do tecido adiposo são mediadas pela sua habilidade em secretar inúmeras proteínas denominadas adipocitocinas, tais como leptina, adiponectina, resistina e citocinas como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-1β (IL-1β) (TILG; MOSCHEN, 2006; SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH, 2010; OUCHI et al., 2011).

Diante da importância endócrina e imune do tecido adiposo é necessário compreendermos as alterações deste tecido ao longo de uma exposição prolongada de nutrientes, como ocorre na obesidade. Durante o gradual desenvolvimento da obesidade há um aumento no armazenamento de TAG excedente nos adipócitos. Este processo pode ser realizado de duas maneiras diferentes, pela expansão das células adiposas disponíveis (hipertrofia) ou pela diferenciação de pré-adipócitos (hiperplasia) (GUSTAFSON et al.,

2009). Esta expansão do tecido adiposo desencadeia uma desregulação na produção de adipocitocinas e citocinas que podem ter efeito inflamatório local e sistêmico (OUCHI et al., 2011). Desta forma, quando o tecido adiposo é exposto a um excesso de nutrientes há a ativação de diversos mecanismos intracelulares nos adipócitos, dentre eles os mecanismos de sinalização inflamatória (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Dentre estes sinais desencadeados pelos adipócitos diante da supernutrição, podemos citar primeiramente as vias de sinalização intracelular, tais como JNK, IKK e PKR (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). A ativação destes mediadores induz a inflamação no tecido em resposta ao excesso de nutrientes que é moderada pelas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α e IL-1β (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Com o tempo, esta inflamação de baixo grau pode induzir o recrutamento e a ativação de células imunes incluindo macrófagos e populações de células T helper 1 e celuas T citotoxicas $CD8^+$ (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; KANNEGANTI; DIXIT, 2012), que desencadeiam uma resposta pró-inflamatória mais intensa com alterações na função metabólica celular, por exemplo, resistencia insulina e lipólise (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

No estado obeso, a inflamação é induzida pelo excesso de nutrientes e mantida sem uma resolução aparente, ou seja, as vias inflamatórias continuam a se reforçar mutuamente (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Esta resposta inflamatória é de natureza diferente da inflamação clássica (HOTAMISLIGIL, 2006). Além do mais, indivíduos obesos apresentam um quadro moderado de inflamação crônica, pelo aumento nos níveis séricos da proteína C reativa (VISSER et al., 1999b).A obesidade é hoje entendida como uma condição de "metaflamação", pois se caracteriza por duas deteriorações a metabólica e a inflamatória (TOUBAL et al., 2013). No entanto, a seqüência de eventos responsáveis pelo inicio da resposta inflamatória é pouco conhecida (WOOD et al., 2009).

Além da inflamação também estão presentes complicações metabólicas devido ao aumento do tecido adiposo, tais como resistência a leptina favorecendo o comportamento alimentar, o aumento dos níveis séricos de resistina associados à redução na sensibilidade à insulina e a depleção dos níveis séricos da adiponectina relacionados a complicações cardiovasculares (KARASTERGIOU et al., 2009; KELESIDIS et al., 2010; STEPPAN; LAZAR, 2002). Estes fatores aumentam o risco de doenças correlatas, tais quais diabetes mellitus Tipo 2, complicações cardiovasculares, acidente vascular cerebral, aterosclerose, dislipidemias, doenças neurodegenerativas, doenças respiratórias e alguns tipos de câncer, tais

como na vesícula biliar e no pâncreas (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011; MITCHELL et al., 2011).

Conhecidas as complicações presentes na obesidade ressalta-se a informação de que esta doença ainda não possui cura e por ser uma doença crônica requer tratamento prolongado (KABRA; KABRA; TSCHÖP, 2012). Dentre os fármacos existentes apenas o orlistat foi aprovado para uso contínuo de longo prazo pelo *Food and Drug Administration* (FDA), agência americana regulamentadora de fármacos. No Brasil, os fármacos aprovados são a sibutramina e o orlistat de acordo com a ANVISA. A sibutramina possui mecanismo de ação como inibidora da re-captação da norepinefrina e da serotonina, suprimindo então o apetite, enquanto que o orlistat possui mecanismo de ação como inibidor da lípase pancreática inibindo em parte a absorção de lipídeos no tratogastrointestinal. Ambos apresentam uma série de efeitos colaterais, sendo que a sibutramina promove aumento do risco de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral em pacientes com problemas cardíacos preexistentes (JAMES et al., 2010), motivo que levou o FDA em 2011 retirar a sibutramina do mercado americano (POWELL; APOVIAN; ARONNE, 2011). Ao orlistat tem sido atribuído como principais efeitos colaterais o aparecimento de dores abdominais, diarreia e redução na absorção de vitaminas lipossolúveis (VETTER et al., 2010).

Esta doença se tornou um desafio à saúde publica mundial (KELLY et al., 2008) visto que alcançou proporções pandêmicas como foi observado no levantamento mundial efetuado pela Organização mundial de Saúde (OMS), que identificou mais de 1,4 bilhões (35% da população mundial) de adultos com sobrepeso e 500 milhões (12% da população mundial) de adultos com obesidade. Incidência alarmante também foi descrita em crianças menores de 5 anos, pois 40 milhões foram diagnosticadas com sobrepeso e obesidade em 2011 (OMS, 2013). A obesidade aflige principalmente países desenvolvidos. Nos EUA, em 2011, foram diagnosticados 69,4% dos adultos acima de 20 anos com sobrepeso e 31.8% com obesidade (OMS, 2013). Entretanto, a obesidade também está se tornando um problema de saúde em países em desenvolvimento como o Brasil (JAIME et al., 2013). Segundo levantamentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a incidência da obesidade em crianças brasileiras entre 5 a 9 anos foi de 14,2% (IBGE, 2008), enquanto que o excesso de peso atingiu cerca de 52,8% e a obesidade 19,5% da população brasileira com mais de 20 anos neste mesmo ano (OMS, 2013).

Esta doença possui consideráveis custos diretos e indiretos. Os custos diretos estão associados à prevenção, diagnostico e serviços nos tratamentos relativos ao sobrepeso e

à comorbidades (IASO, 2013). Nações europeias gastam 2-8% de seus orçamentos de saúde no tratamento de problemas associados com a obesidade, chegando a 0,1 - 0,6% do produto interno bruto dependendo do país (MÜLLER-RIEMENSCHNEIDER et al., 2008). A Inglaterra prevê que em 2050 seus gastos com doenças relacionadas com a obesidade chegarão a £ 7,1 bilhões (NOO, 2007). Nos EUA estimativas de 2008 indicaram que o sobrepeso e a obesidade juntos contabilizam gastos de U$147 bilhões, que representaram 9,1% do total das despesas médicas deste ano (FINKELSTEIN et al., 2009). No Brasil, estimativas de 2010 indicaram que o custo total anual com doenças crônicas associadas diretamente a obesidade e ao excesso de peso foi de U$ 221 milhões (BAHIA et al., 2012). Embora os custos indiretos para a sociedade possam ser substancialmente altos eles são frequentemente negligenciados, pois estão relacionados à perda de produtividade, doenças correlatas, ausências no trabalho e morte prematura (IASO, 2012). A obesidade e o sobrepeso são responsáveis pela morte de 2,8 milhões de pessoas por ano no mundo, enfatizando a atual preocupação mundial com esta doença, cuja estimativa para 2030 é de que o sobrepeso pode afetar 2,16 bilhões e a obesidade 1,12 bilhões de indivíduos no mundo (KELLY et al., 2008; OMS, 2013).

Diante das alterações metabólicas e imunes desta doença, alarmante estimativa do aumento de sua incidência mundial, aos poucos fármacos disponíveis ao tratamento da mesma e os efeitos colaterais indesejáveis no tratamento desta doença, a busca por novas alternativas se mostra necessária (VETTER et al., 2010). Neste contexto, produtos de origem natural têm sido considerados como uma importante estratégia de controle da obesidade e do sobrepeso (YUN, 2010), associados ou não ao uso de fármacos. Dentre as inúmeras espécies vegetais disponíveis, selecionamos para este estudo dois diferentes produtos padronizados obtidos a partir das espécies *Bidens pilosa* e *Brassica campestris* (Figura 3), as quais foram selecionadas para este presente estudo considerando-se suas características e propriedade químicas e farmacológicas, como descrito a seguir.

Figura 2. Plantas selecionadas

Bidens pilosa L.(A.) popularmente conhecida por picão preto e pertencente à Família botânica Asteraceae. Fonte: Adaptado de Rain-Tree. *Brassica campestris* L. (B.) popularmente conhecida por canola e pertencente à Família botânica Brassicaceae. Fonte: Adaptado de AGROATLAS.

A seleção do extrato padronizado em ácido eicosapentaenoico e α-linolênico da espécie de *Bidens pilosa* L. (picão preto) decorre da importância destes ácidos graxos no metabolismo energético pela estimulação da β-oxidação e redução de triacilglicerol plasmáticos, além de ação anti-inflamatória pela redução de citocinas pró-inflamatórias (HARRIS; BULCHANDANI, 2006; KOMPRDA, 2012; OLIVER et al., 2010). Em adição, estudos preliminares (Pipe-Fapesp – dados não publicados) demonstram que esse extrato diminui o processo inflamatório na derme, especialmente por reduzir os níveis de IL-1α, IL-6 e TNF- α. Além disso, outros estudos ainda mostram que a espécie *B. pilosa* L. possui atividades anti-inflamatória e imunomoduladora devido ao efeito redutor de citocinas: IL-1β, IL-1α, IL-6 e TNF- α e anti-hiperglicêmica. (PEREIRA et al., 1999; ABAJO et al., 2004; YOSHIDA et al., 2006; HSU et al., 2009).

A seleção dos fitoesteróis encontrados na canola (*Brassica campestris* L.) decorre do fato dos fitoesteróis tradicionalmente demonstrarem eficiência na redução de taxas de colesterol total e LDL por suprimir a absorção intestinal de colesterol (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008; OSTLUND, 2004). Dados estes que motivam maiores investigações deste composto na obesidade. Em adição, os fitoesteróis são compostos que apresentam estrutura análoga ao colesterol e diferem no tamanho da cadeia devido à presença de um grupo etila na posição C24 (LING; JONES, 1995). Estudo aponta esteróis como componentes da membrana plasmática das células (YEAGLE, 1985), estando envolvidos na organização e permeabilidade da membrana podendo, assim, modelar muitas das atividades de proteínas membranares (MORA et al., 1999; YEAGLE, 1985). Assim como o colesterol, os fitoesteróis

são hábeis em modificar as propriedades estruturais e funcionais da dupla camada fosfolipídica das membranas celulares (MORA et al., 1999). Tal capacidade dos fitoesteróis favorece a ação de compostos no interior das células, visto que facilitam o transporte de moléculas pela membrana (MORA et al., 1999). Desta forma, os fitoesteróis são compostos potencialmente úteis como coadjuvantes em formulações, facilitando a absorção de outros produtos. Estudo clínico recente mostrou que o produto Slimbuster®, combinação do óleo de café verde com fitoesteróis de *B. campestris* produziu efeitos lipolíticos significativamente superiores àqueles produzidos pelo uso isolado do óleo de café (PEREDA, 2009).

Os modelos animais podem ser particularmente úteis na investigação de novos compostos isolados ou combinados com o potencial anti-obesidade (VICKERS; JACKSON; CHEETHAM, 2011), já que estudos de novos fármacos no tratamento da obesidade são de dificl e complexa execução em humanos. Dentre os modelos animais envolvendo principalmente camundongos e ratos, podemos citar os de dieta hipercalórica e os geneticamente modificados (LUTZ; WOODS, 2012; VICKERS; JACKSON; CHEETHAM, 2011). Os animais geneticamente modificados por mutação espontânea ou transgenia são caracterizados por uma mutação em um único gene (monogênicos) (LUTZ; WOODS, 2012). Os modelos animais por dieta hipercalórica utilizam ratos e camundongos, e são miméticos a obesidade em humanos, pois as mudanças metabólicas tais quais hiperglicemia, resistência à insulina e dislipidemia presentes em modelos de obesidade induzida por dieta em roedores são similares as alterações encontradas na obesidade em humanos (VICKERS; JACKSON; CHEETHAM, 2011).

Existem inúmeras metodologias de modelos de indução de obesidade por dieta hipercalórica, porém estes divergem quanto ao tempo de indução e ao ganho de peso corpóreo, diante disto percebemos a necessidade de padronizarmos um modelo de indução da obesidade em diferentes roedores.

2. OBJETIVOS

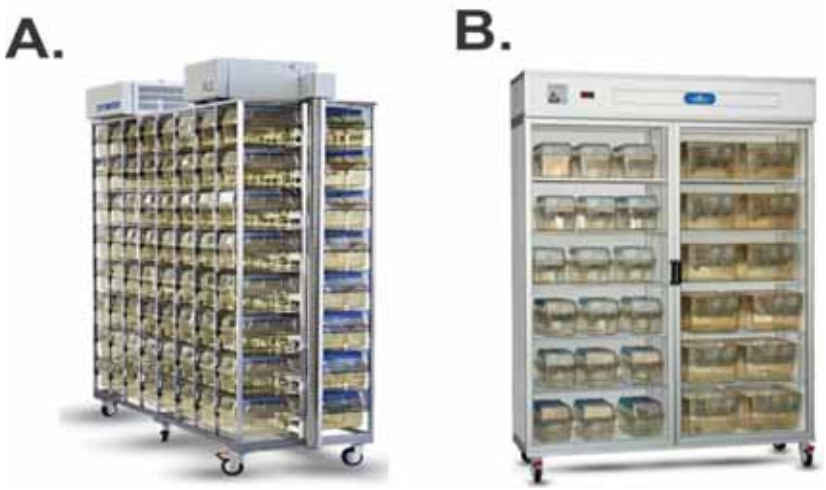
Com base nas informações apresentadas, o presente estudo tem como objetivo a padronização de um modelo experimental de obesidade por dieta hipercalórica em roedores e avaliação dos efeitos do extrato padronizado de *Bidens pilosa* L., fitoesteróis de *Brassica campestris* L. e da associação de ambos os produtos no tratamento da obesidade induzida por dieta hipercalórica em roedores.

3. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos machos da linhagem Swiss adquiridos do biotério central da UNESP e ratos albinos machos da linhagem Wistar adquiridos do biotério ANILAB-Paulínia. Os camundongos foram alocados em estante ventilada ALESCO® (Figura 4A) e os ratos alocados em rack ventilada ALESCO® (Figura 4B). Durante a fase experimental os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura constante de 21° C +/- 2°C, com ciclo 12h claro/escuro e filtração de ar.

Figura 3 - Equipamentos utilizados para a alocação dos camundongos e ratos em nosso biotério durante todo o experimento.



Equipamentos presentes em nosso biotério da marca ALESCO®. A. Estante ventilada para camundongos. B. Rack ventilada para ratos.

3.2. Obtenção do extrato de *Bidens pilosa* L.

O extrato de *Bidens pilosa* L. padronizado em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido α-linolênico (PIPE-Fapesp Fase I – processo 07/59310-8), foi fornecido pela empresa Chemyunion Química Ltda.(Sorocaba-SP) com nome comercial de Revinage®.

3.3. Obtenção do extrato de *Brassica campestris* L.

O produto teste (CardioAid™ PlantSterols) foi fornecido pela empresa ADM Nutrition à Chemyunion Química Ltda. (empresa parceira na realização desse projeto) e consiste principalmente de fitoesteróis de *Brassica campestris* L. (*canola*) conforme composição descrita no Quadro 2.

Quadro 2- Especificações do CardioAid™ PlantSterols

Esteróis vegetais total, %	Min. 95
Beta-sitosterol, %	40-58
Campesterol, %	20-30
Estigmasterol, %	14-22
Brassicasterol, %	0-6
Sitostanol, %	0-5
Tocoferóis, mg/g	0-15
Metais pesados, ppm	Max. 10
Contagem padrão em placas, por g	Max. 1,000
Levedura e mofo, por g	Max. 300
Salmonella	Neg.
E. coli	Neg.
Staphylococcus aureus	Neg.

Fonte: Chemyunion Química Ltda.

3.4. Indução da obesidade

Para a indução da obesidade, os animais receberam dieta hipercalórica RC Focus 2413, que é constituída de milho moído, farelo de soja, farelo de bolacha, proteína concentrada de soja, gérmen de milho, amido de milho, quirera de arroz, soro de leite em pó, farinha de vísceras, levedura, autolisada de cana-de-açúcar, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, iodato de cálcio, monóxido de manganês, niacina, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato ferroso, vitamina A, vitamina B1, vitamina B12, vitamina B2, vitamina B6, vitamina D3, vitamina e, vitamina K3, dl-metionina, l-lisina, l-treonina e l-triptofano.

Como padrão de comparação, camundongos receberam a dieta normocalórica RC Focus 1765, que diferem da dieta hipercalórica apenas na quantidade de macro, micronutrientes e no sabor de chocolate adicionado a ração hipercalórica. Os dados de macro e micronutrientes foram mensurada pela empresa Agroceres®, apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Macronutrientes e micronutrientes das rações, RC Focus 1765 e RC Focus 2413 Agroceres®.

Componentes	Rações %	
	Ração Normocalórica	Ração Hipercalórica*
Proteína	22,0	20,0
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7

Fonte: Dados mensurados pela empresa Agroceres®.

Para os estudos de obesidade em ratos, um grupo com dieta normocalórica foi realizado utilizando-se a ração normocalórica Biobase®. A ração Biobase possui constituição de milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, dl-metionina, óleo de soja degomado, fosfato bicálcico, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, biotina, cloreto de colina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantotênico, iodato de cálcio, selenito de sódio, óxido de zinco, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato ferroso, aditivo adsorvente, aditivo antifúngico e aditivo antioxidante. A composição de macro e micronutrientes das rações normocalórica e hipercalórica, mensurada pelos respectivos fabricantes estão apresentada no Quadro 4.

Quadro 4- Macronutrientes e micronutrientes das rações, Biobase® e RC Focus 2413 Agroceres®.

Componentes	Rações %	
	Ração Normocalórica	Ração Hipercalórica*
Proteína	22,0	20,0
Gordura	4,0	20,0
Minerais	10,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Cálcio	1,3	1,4
Fósforo	0,8	0,7

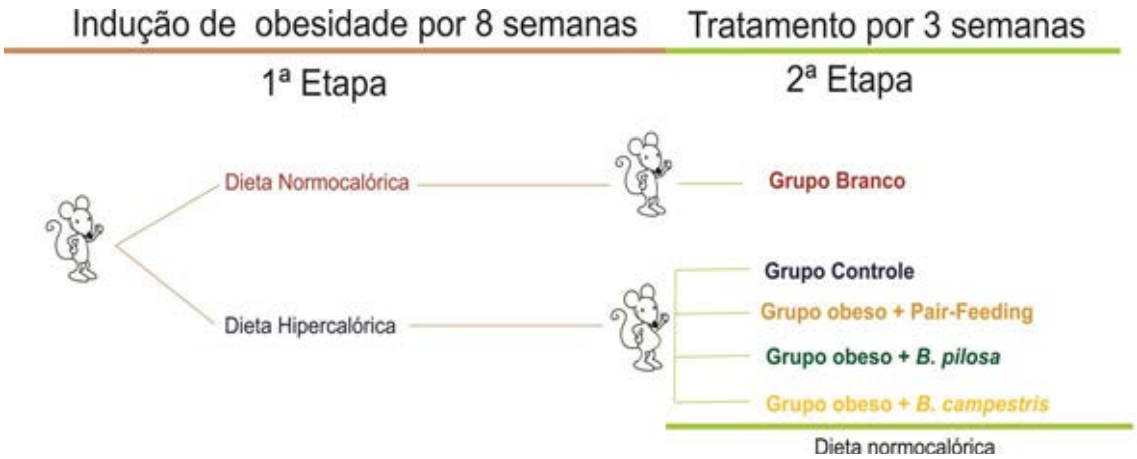
Fonte: Dados mensurados pelas empresas Biobase® (NC) e Agroceres® (DIO).

3.5. Delineamento experimental geral

Os experimentos com camundongos e ratos constituíram-se de duas etapas experimentais: A primeira etapa consistiu da indução de obesidade em camundongos e ratos

de acordo com o descrito nas Figuras 4 e 5. Após a indução da obesidade, uma nova etapa foi realizada envolvendo o tratamento dos animais com os diferentes produtos. Em ambos os protocolos experimentais, o tratamento foi realizado apenas nos camundongos e ratos que obtiveram ganho de peso corpóreo superior a 10% em relação ao grupo que recebeu dieta normocalórica como descrito por Levin; Dunn-Meynell (2002) e Woods et al. (2003).

Figura 4 - Delineamento experimental no experimento com camundongos



Para o estudo realizado com camundongos os animais foram divididos em 5 grupos, conforme descrito a seguir:

Grupo 1 -Branco - animais não obesos, que receberam ração normocalórica durante as onze semanas.

Grupo 2 - Controle - animais que receberam ração hipercalórica durante as oito semanas de indução obesidade e ração normocalórica durante três semanas adicionais correspondentes ao período de tratamento dos animais do grupo 4.

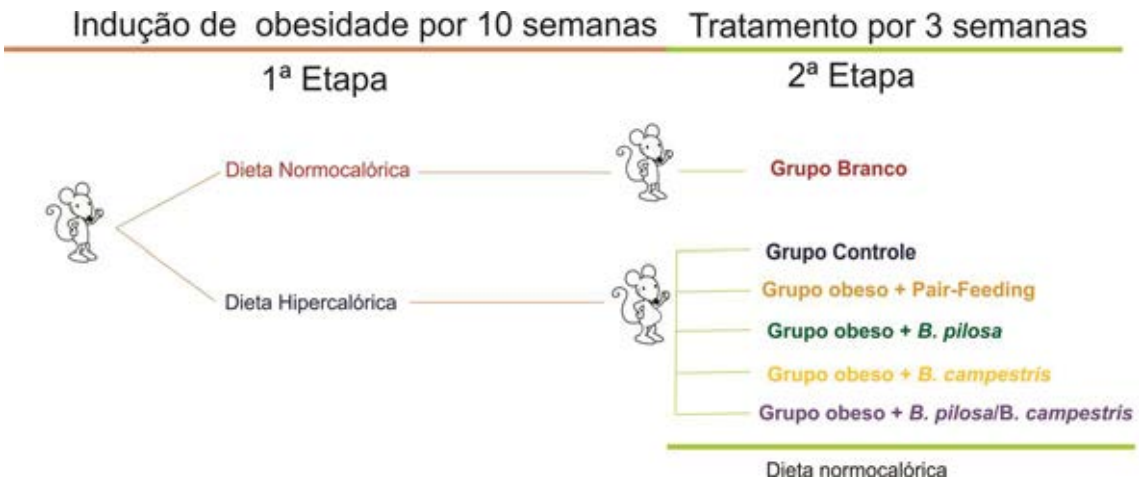
Grupo 3 - (*Pair-feeding*) - animais que receberam ração hipercalórica durante as oito semanas de indução da obesidade e durante as três semanas de tratamento foram submetidos à restrição na dieta normocalórica, consumindo 70% da média de consumo do grupo 2;

Grupo 4 - Obeso + *B. pilosa* - animais que receberam ração hipercalórica durante as oito semanas de indução da obesidade e ração normocalórica durante três semanas de tratamento via oral com *B. pilosa* na dose de 100mg/Kg;

Grupo 5 - Obeso + *B. campestris* - animais que receberam ração hipercalórica durante as oito semanas de indução da obesidade e ração normocalórica durante três semanas de tratamento via oral com *B. campestris* na dose de 100mg/Kg;

O protocolo experimental para camundongos foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), protocolo n°147-CEEA/2011 (Anexo A).

Figura 5- Delineamento experimental no experimento com ratos



Para o estudo realizado com rato os animais foram divididos em 6 grupos, conforme descrito a seguir:

Grupo 1 - Branco - animais não obesos, que receberam ração normocalórica durante as treze semanas.

Grupo 2 - Controle - animais que receberam ração hipercalórica durante as dez semanas de indução da obesidade e ração normocalórica durante três semanas adicionais correspondentes ao período de tratamento dos animais dos grupos 4, 5 e 6.

Grupo 3 - (*Pair-feeding*) - animais que receberam ração hipercalórica durante as oito semanas de indução da obesidade e durante as três semanas de tratamento foram submetidos à restrição na dieta normocalórica, consumindo 70% da média de consumo do grupo 2;

Grupo 4 - Obeso + *B. pilosa* - animais que receberam ração hipercalórica durante as dez semanas de indução da obesidade e ração normocalórica durante três semanas de tratamento via oral com *B. pilosa* na dose de 100mg/Kg;

Grupo 5 - Obeso + *B. campestris* - animais que receberam ração hipercalórica durante as dez semanas de indução da obesidade e ração normocalórica durante três semanas de tratamento via oral com *B. campestris* na dose de 100mg/Kg.

Grupo 6 - Obeso + *B. pilosa*/*B. campestris* - animais que receberam ração hipercalórica durante as dez semanas de indução da obesidade e ração normocalórica durante três semanas tratamento via oral com *B. pilosa* associada à *B. campestris* (proporção 2:1) na dose de 100mg/Kg de *B. pilosa* + 50mg/kg de *B. campestris*;

O protocolo experimental para ratos foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), protocolo n° 440-CEEA/2012 (Anexo B).

Em ambos os experimentos, durante o tratamento todos os animais receberam água *ad libitum*. Os animais foram tratados com os extratos (*B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa*/*B. campestris*) nas doses citadas acima e os grupos não tratados receberam, por via oral, o veículo. Este constituído de 92 % de metilcelulose a 1% e 8% de Tween 80.

3.6. Obtenção de materiais para análise

Após os experimentos, os animais foram decapitados e o sangue obtido foi coletado em *eppendorfs* ou *vacutainers*, deixado em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm. O soro separado foi armazenado à -80° C para as análises bioquímicas.

3.7. Avaliação dos parâmetros macroscópicos

Avaliação diária de parâmetros como aumento ou redução da ingesta e do peso corpóreo de todos os animais em ambas as etapas experimentais. Ao término do tratamento no experimento com ratos foram realizadas medições do comprimento

naso – anal, da circunferência abdominal e torácica, relação circunferência abdominal/torácica, índice de massa corporal (IMC) e índice de Lee, esses dois últimos calculados com suas respectivas fórmulas demonstradas a seguir:

- O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela seguinte equação: $\frac{\text{peso corpóreo (g)}}{\text{Comprimento naso}-\text{anal(cm)}^2}$ (1);
- O índice de Lee foi calculado pela respectiva equação: $\frac{\sqrt[3]{\text{peso corpóreo(g)}}}{\text{Comprimento naso}-\text{anal(cm)}} \times 1000$ (2);

3.8. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

As mensurações de adiponectina, proteína C reativa, leptina, hormônio de crescimento e β-endorfina foram realizadas através de reações enzimáticas enzima-substrato

(ELISA), utilizando kits disponíveis comercialmente usando o soro dos animais. A mensuração de glicose dos ratos foi realizada utilizando o glicosímetro TRUEread®, por tanto foi realizada coleta de amostras de sangue dos ratos.

As análises de triacilgliceróis, colesterol total VLDL-colesterol, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos ratos foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica – UNESP – *Campus* de Botucatu.

3.8.1. Determinação por Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA-Sandwich)

Os Kits utilizados foram: leptina (R&D System Mouse Leptin DY498 e Millipore Rat Leptin #EZRL-83K), β-endorfina (β-endorfin Rat EIA Kit EK-022-33), adiponectina (Millipore Rat Adiponectin #EZRADP-62K), hormônio de crescimento (Millipore Rat/Mouse Hormone #EZRMGH-45K) e proteína C reativa (R&D System Mouse CRP DY1829 e R&D System DY1744).

A técnica consiste em 7 etapas. 1. Adição de anticorpo monoclonal de detecção anti-proteína de interesse em placa para ELISA com 96 poços. 2. Adição do soro dos animais. 3. Adição do anticorpo monoclonal de detecção anti–proteína de interesse. 4. Adição da solução de estreptavidina-peroxidase. 5. Adição da solução de substrato (TMB–tetrametilbenzidina) na placa que resultou em uma alteração na coloração para azul. 6. A reação de coloração foi interrompida adicionando um ácido com concentração molar estipulado pelo fabricante. 7. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda estipulado pelo fabricante em um espectrofotômetro (LGC, LMLGC). Os níveis de adiponectina, proteína C reativa, leptina, hormônio de crescimento e β-endorfina foram calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das respectivas proteínas recombinantes fornecidas pelo fabricante.

3.8.2. Determinação da concentração de triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo Soloni, 1971, o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

3.8.3. Determinação da concentração de colesterol total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colesterol oxidase com hidrólise enzimática prévia dos ésteres mediante uma lipase. A água oxigenada liberada na oxidação produziu fenol oxidado e 4-aminofenazona, catalisada pela peroxidase, com formação de quinonimina vermelha (MOURA, 1982).

3.8.4. Determinação da concentração HDL-colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, encontravam-se as lipoproteínas de alta densidade (HDL), onde se determinou o colesterol incorporado às mesmas (LOPES-VIRELLA et al., 1977).

3.8.5. Determinação da concentração de LDL-colesterol e VLDL-colesterol

Os valores de LDL e VLDL-colesterol foram obtidos pela equação de Friedewald (COHN; ROTH, 1996).

3.9. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. Diferenças estatísticas entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguidas por teste de significância. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS & DISCUSSÃO

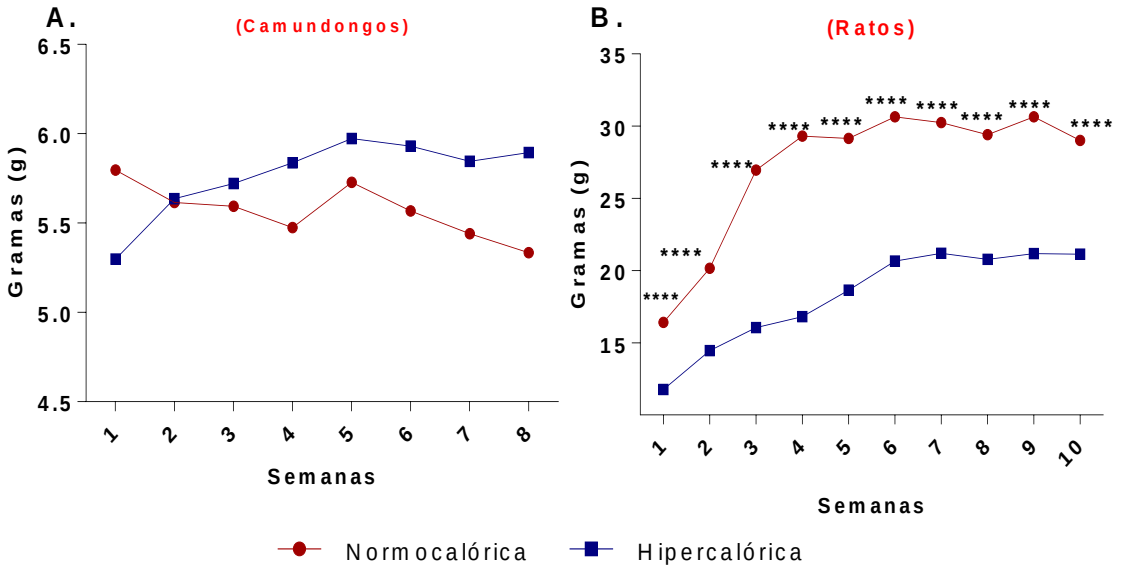
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

Com base nos objetivos do presente estudo, os resultados são apresentados em termos de se verificar as vantagens e desvantagens do modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica utilizando-se de duas diferentes espécies de roedores, camundongos e ratos, e em um segundo momento, avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos (*Bidens pilosa* e *Brassica campestris*) e sua associação no controle da obesidade.

4.1. Avaliação comparativa dos modelos de obesidade em diferentes roedores

Um dos parâmetros avaliados foi a quantidade em gramas do consumo diário das diferentes dietas (Normocalórica e Hipercalórica). Na Figura 6A observa-se que em camundongos ocorreu um consumo diário maior de dieta hipercalórica que de dieta normocalórica, mesmo considerando-se que estes dados não são significativos. Por outro lado, em ratos (Figura 6B), há um consumo significativamente menor de dieta hipercalórica quando comparados com o grupo que recebeu a dieta normocalórica.

Figura 6- Evolução do consumo individual em camundongos e ratos no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

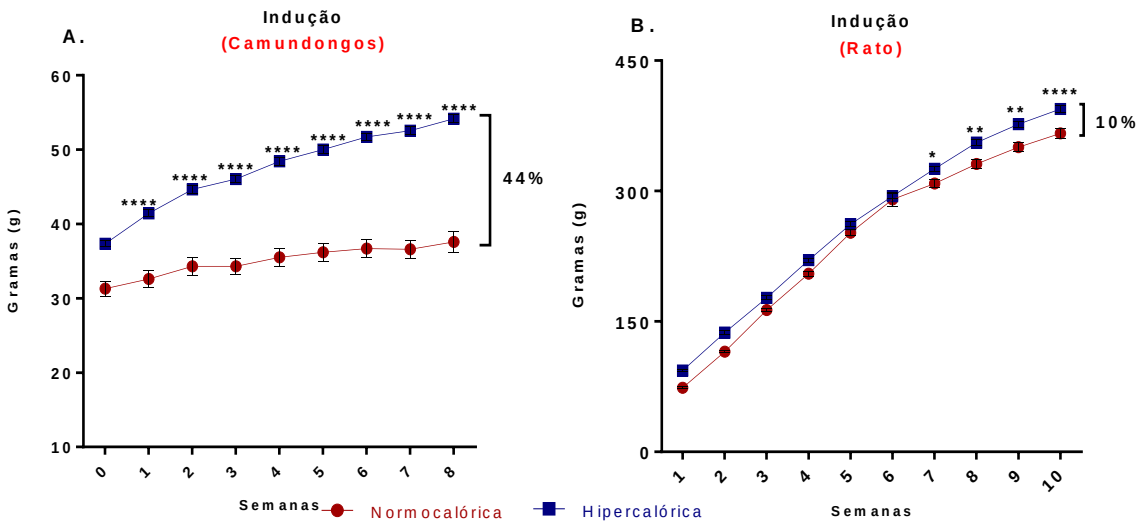


Dados expressos em média. A. Experimento com camundongos durante as oito semanas de indução de obesidade. B. Experimento com ratos durante dez semanas de indução da obesidade.

Na Figura 7, pode-se observar a evolução do peso corpóreo dos camundongos e ratos submetidos à dieta hipercalórica. Na Figura 7A, no final do período de indução da

obesidade constatamos que a diferença de peso entre o grupo que recebeu dieta normocalórica e o grupo que recebeu dieta hipercalórica durante oito semanas foi de 44%. Este valor caracteriza uma obesidade severa nos camundongos (LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2002). Em ratos (Figura 7B) foi possível, após dez semanas de uso da dieta hipercalórica, promover uma diferença de massa corpórea de apenas 10%, a qual se caracteriza como uma obesidade moderada (HARROLD et al., 2000;WOODS; SEELEY, 2003).

Figura7 - Evolução do peso corpóreo em camundongos e ratos no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Dados expressos em média ± E.P.M. durante a etapa de indução da obesidade. A. Experimento com camundongo durante oito semanas. B. Experimento com ratos durante dez semanas, sendo:*p<0.05;**p<0.01;**** p<0.0001.

O ganho de peso corpóreo superior a 40% pode estar relacionado pelo maior consumo de dieta hipercalórica em relação aos animais que receberam dieta normocalórica (Figura 7A). Entretanto, o comportamento alimentar em camundongos é contrário ao relatado por Stubbs; Whybrow (2004). De acordo com este estudo após um determinado tempo animais e humanos submetidos a dietas altamente energéticas reduzem o consumo alimentar em resposta a alta densidade alimentar da dieta (STUBBS; WHYBROW, 2004). Na Figura 7B, observa-se que os ratos que receberam a dieta hipercalórica apresentaram uma menor ingesta alimentar se compararmos com os animais que receberam a dieta normocalórica, como descrito por Stubbs; Whybrow (2004). No entanto, mesmo com uma menor ingesta alimentar apresentaram um ganho de massa corpórea de 10%.

Dentre os parâmetros obtidos, podemos ainda citar que a diferença total de peso corpóreo (delta peso) dos animais (Tabela 1), evidencia o ganho de peso ao longo da indução da obesidade em ambos os modelos. Em camundongos verificou-se que após oito semanas, obtivemos ganho de massa corpórea de 9,1 g nos animais que receberam dieta normocalórica, enquanto que nos animais que receberam dieta hipercalórica, este ganho foi de 16,4 g. Em ratos, este ganho foi de 287,6 g e 320,1 g para animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica, respectivamente.

Tabela 1 - Comparação do peso corpóreo entre as diferentes espécies animais e dietas ao termino indução da obesidade.

	Camundongo		**Rato**	
	Normocalórica	Hipercalórica	Normocalórica	Hipercalórica
Peso inicial	30,2±0,9	37,1±0,4	72,02± 1,0	80,1±1,1
Peso após a engorda	39,3±1,1	53,5±0,5****	356,1±4,5	401,1±3,5****
Δ peso	9,1	16,4	287,6	320,1

Dados expressos em média ± E.P.M. Análise estatística por Test t ****p<0,0001

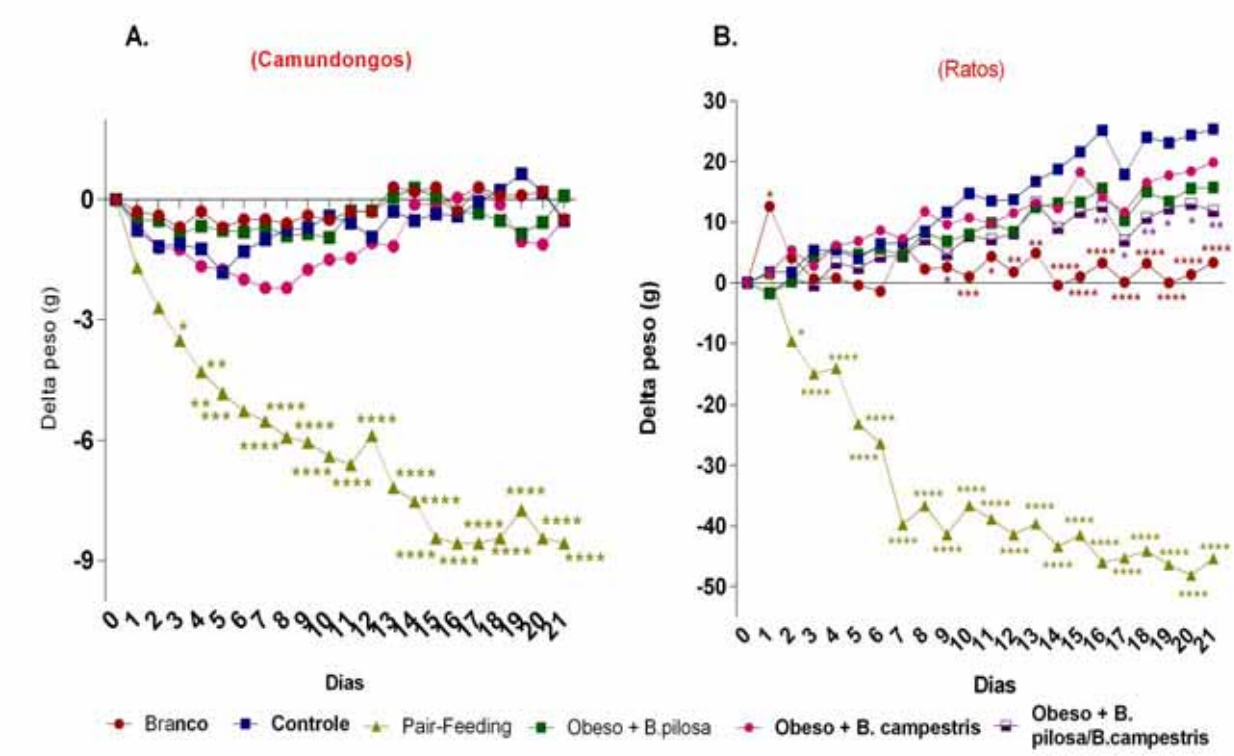
Com base nestes dados, verifica-se que o uso da dieta hipecalórica foi mais eficiente na indução de obesidade em camundongos que em ratos, no entanto, os ratos mostram-se como um modelo que permite a obtenção de amostras em quantidades suficientes para as análises, diferente da restrição de amostras quando se utiliza o camundongo como modelo experimental.

4.2. Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a obesidade

4.2.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos

Após o processo de indução da obesidade, os animais foram tratados com os diferentes produtos por um período de 21 dias. Neste período, não foram verificadas alterações significativas na redução de massa corpórea dos animais tratados com B. pilosa e B. campestris (Figura 8), no entanto a associação de ambos produziu uma redução significativa da massa corpórea dos ratos a partir do décimo sexto dia (Figura 8B). Como esperado, no grupo com restrição calórica (pair-feeding), a redução da massa corpórea foi evidente (Figuras 8A-B).

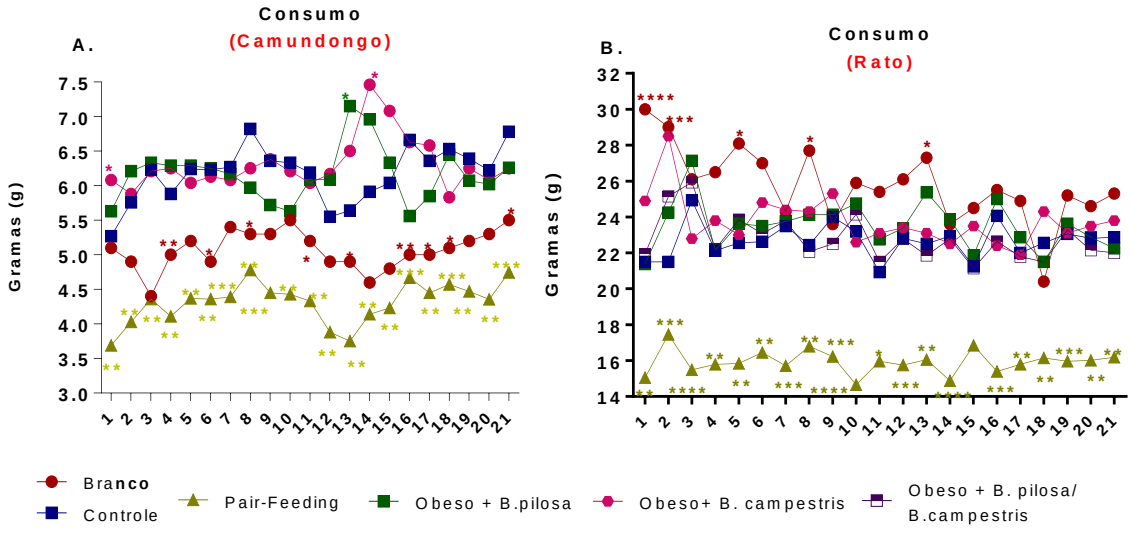
Figura 8 – Média do delta peso dos animais em camundongos e ratos nos diferentes grupos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Dados expressos em média durante os 21 dias de tratamento A. Experimento realizado em camundongos. B. Experimento realizado em ratos. Sendo: *p<0.05;**p<0.01; ***p<0.001;**** p<0.0001.

Quanto à ingesta alimentar (Figura 9A-B) verificou-se que não houve diminuição da ingesta após os diferentes tratamentos, indicando que os mesmos não atuam na redução da saciedade.

Figura 9 - Evolução da ingesta alimentar em camundongos e ratos nos diferentes grupos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Dados expressos em média durante os 21 dias de tratamento com as plantas de interesse. A. Experimento realizado com camundongos. B. Experimento realizado com ratos. *p<0.05;**p<0.01; *** p<0.001;**** p<0.0001

Além do peso corpóreo e ingesta alimentar, foram realizados em ratos a avaliação do IMC, índice de Lee, circunferências torácica (CT) e abdominal (CA) e a relação Circunferência Abdominal/Circunferência Torácica que estão apresentados na Tabela 2.

O Índice de peso corporeo (IMC) é uma estimativa simples que indica a gordura corporal, cujo valor só foi alterado no grupo de animais com restrição calórica (*pair-feeding*). A circunferência abdominal (CA) é um indicativo de acúmulo de lipídio que se caracteriza como um marcador clínico de obesidade visceral (NG et al., 2012). Em ratos, há indicações que a variação em animais brancos (não obesos) esteja no range de 14.9±0.2 a 17.2±0.3 cm (NOVELLI et al., 2007). Na Tabela 2, observa-se uma diferença significativa nos gruposbranco e *pair-feeding* quando comparados ao grupo controle. Nos grupos tratados com os diferentes produtos não foram observadas diferenças significativas na circunfrência abdominal em relação ao grupo controle. A circunferencia toráxica (CT) que também está aumentada em ratos com dieta hipercalórica (NOVELLI et al., 2007), não foi afetada por nenhum dos tratamentos (Tabela2). O índice de Lee, que mensura a obesidade em ratos (HARIRI; THIBAULT, 2010) não diferiu entre o grupo branco e controle (Tabela 2), assim como com os grupos tratados, sendo apenas significativamente distinto nos animais do grupo

com restrição calórica (pair-feeding). A relação circunferência abdominal /circunferência torácica evidencia o aumento da circunferência abdominal (Tabela 2).

Tabela 2- Mensurações antropormóficas e índice de Lee para analisar a obesidade em ratos no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

	IMC (g/cm^2)	**Lee (g^3/cm)**	**Circunferência Torácica (cm)**	**Circunferência Abdominal (cm)**	**Circ. Abdominal/ Circ. Torácica**
Branco	0,62±0,01	0,288±0,001	16,63±0.14 **	17,54±0,27 **	1,05±0,01**
Controle	0,66±0,01	0,297±0,002	17,75±0.16	20,13±0,28	1,13±0,01
Pair-feeding	0,55±0,01**	0,281±0,002**	16,38±0.21**	17,13±0,18 **	1,05±0,01 **
Obeso + *B. pilosa*	0,65±0,01	0,294±0,002	18,00±0.28	19,88±0,42	1,10±0,02
Obeso + *B. pilosa*/*B. campestris*	0,64±0,01	0,294±0,003	17,21±0.21	19,86±0,30	1,15±0,03
Obeso+ *B. campestris*	0,65±0,01	0,294±0,003	16,94±0,22	19,25±0,30	1,14±0,01

Dados expressos em média ± E.P.M.

4.2.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

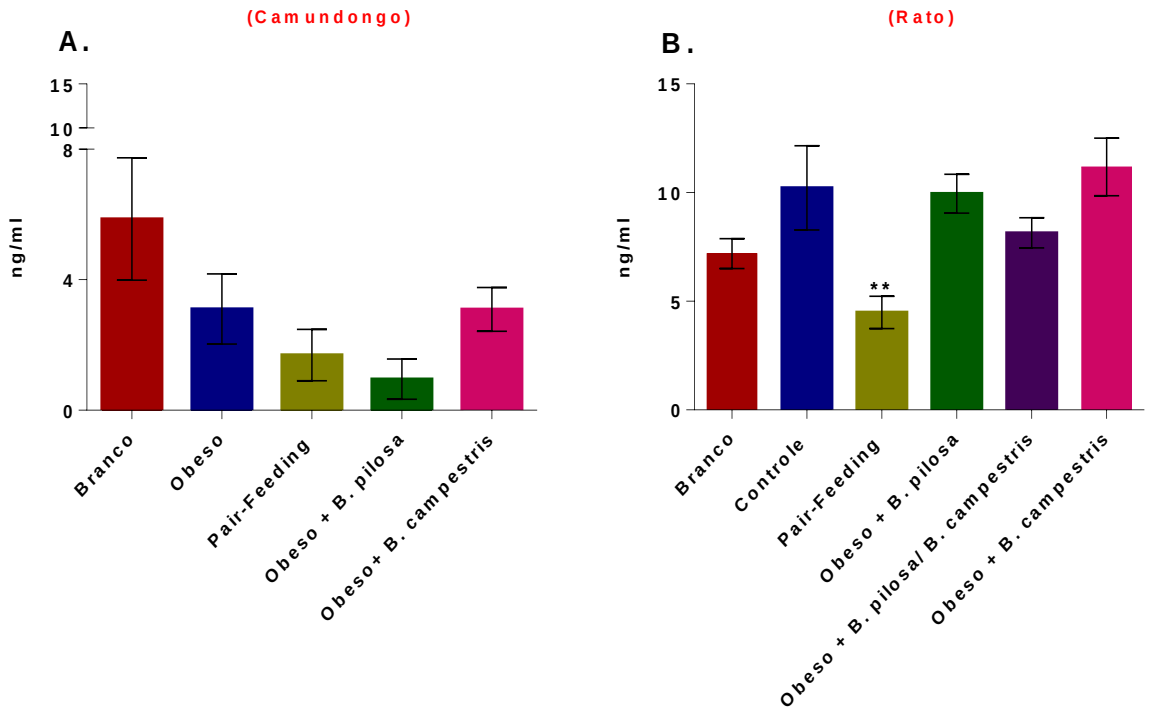
Considerando-se a pequena quantidade de amostras biológicas provenientes dos camundongos, foi realizada nestes animais a mensuração apenas dos níveis de leptina e proteína C reativa. No entanto, em ratos foi realizado um perfil bioquímico mais detalhado, incluindo análises dos níveis de insulina, leptina, adiponectina, β-endorfina, hormônio de crescimento, triacilglicerol, colesterol total e lipoproteínas VLDL, HDL e LDL.

4.2.2.1. Leptina

A leptina é um hormônio produzido e secretado pelos adipócitos que desempenha papel na homeostase energética, na função neuroendócrina e no sistema imune (CONSIDINE et al., 1996; KELESIDIS et al., 2010; LEAL; MAFRA, 2013; SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH, 2010). Seus níveis são positivamente correlacionados com a quantidade de gordura corporal e estão elevados em indivíduos obesos (CONSIDINE et al., 1996). Desde que indivíduos obesos apresentam resistência à leptina, seus efeitos metabólicos de diminuição de apetite e aumento no gasto energético não são observados (CONSIDINE et al., 1996; MOON et al., 2011). Em nosso estudo foi verificado que apenas nos ratos se observou um aumento dos níveis de leptina nos animais obesos e sua redução nos animais com restrição calórica, enquanto que em camundongos estes níveis são similares aos animais do grupo

branco (Figura 10). Em ambos os modelos experimentais, os diferentes tratamentos não foram capazes de reduzir significativamente os níveis de leptina. De acordo com Furlan et al.(2013) ratos obesos com suplementação de 2% fitoesteróis por oito semanas não apresentam alteração nos níveis séricos de leptina.

Figura 10 - Níveis séricos de leptina em camundongos e ratos nos diferentes grupos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



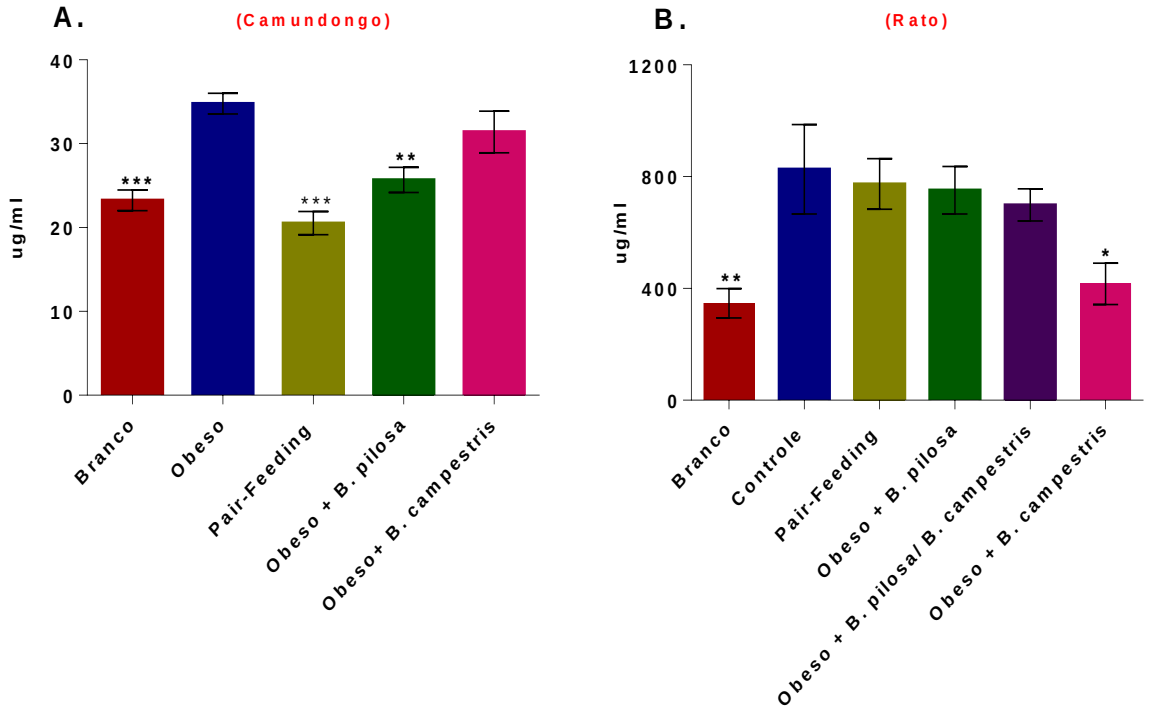
Dados expressos em média ± E.P.M. obtidos ao final dos 21 dias de tratamento. A. Hormônio dosado em camundongos e B. Hormônio dosado em ratos, sendo:**p<0.01.

4.2.2.2. Proteína C Reativa

A proteína C Reativa (PCR) é um marcador não específico da inflamação, no entanto uma das mais importantes correlações desta proteína é a adiposidade, sendo positivamente proporcional ao índice de massa corporal e à circunferência da cintura (VISSER et al., 1999; WEE; MUKAMAL; HUANG, 2008). Em nosso estudo, tanto em camundongos como em ratos, os níveis de proteína C reativa foram significativamente aumentados nos animais obesos em relação aos animais do grupo branco. Nos animais do grupo pair-feeding observou-se uma redução significativa apenas em camundongos. Após os diferentes tratamentos, foi

possível se observar que o tratamento com os fitoesteróis de B. campestris foi capaz de produzir uma redução significativa, no entanto, estes efeitos só foram observados em ratos, enquanto que o tratamento com B. pilosa produziu efeitos significativos apenas nos camundongos (Figura 11).

Figura 11 - Níveis séricos de Proteína C Reativa em camundongos e ratos nos diferentes grupos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

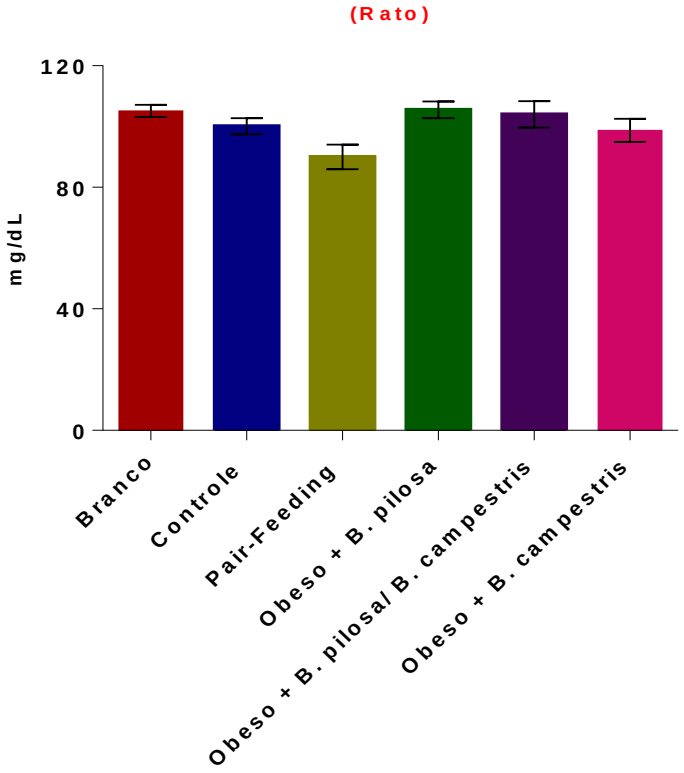


Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento. A. Hormônio dosado em camundongos e B. Hormônio dosado em ratos, sendo: ***p<0.001;**** p<0.0001.

4.2.2.3. Glicemia

Apesar de desordens nos níveis glicêmicos estarem associadas à obesidade (BANO, 2013), não foi verificada diferença significativa em nenhum dos grupos testados quando comparados ao grupo controle (Figura 12). Em estudos recentes foi demonstrado que a dieta com 3.6% de ácido eicosapentaenoico foi capaz de reduzir os níveis de glicose em camundongos obesos (BERTRAND et al., 2013), enquanto que a suplementação da dieta com 2% de fitoesteróis por oito semanas não foi capaz de alterar os níveis glicêmicos de camundongos (CALPE-BERDIEL et al., 2008).

Figura 12 - Níveis de glicose plasmática em ratos tratados com *B. pilosa*, B. campestris e B. pilosa associada à B. campestris no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



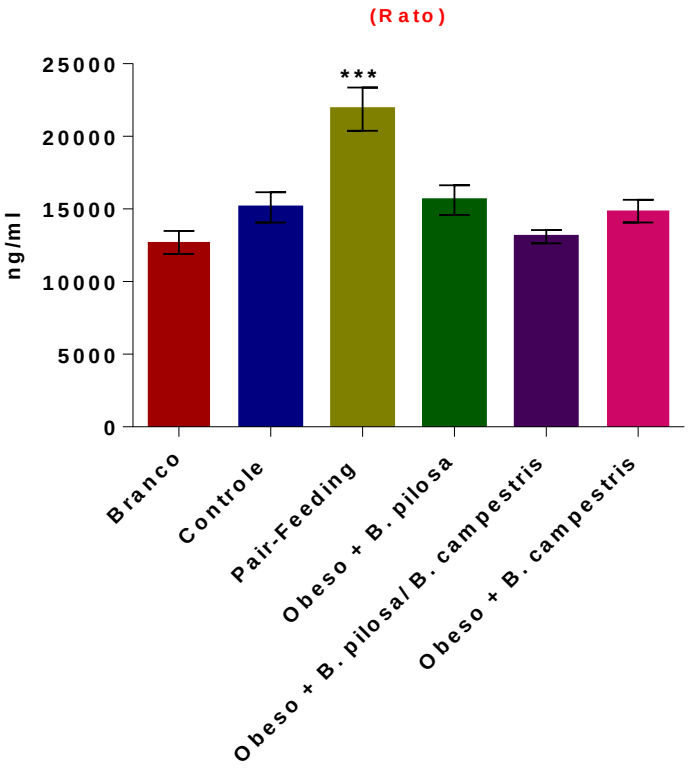
Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento.

4.2.2.4. Adiponectina

A adiponectina é um hormônio produzido e secretado pelos adipócitos (LEAL; MAFRA, 2013; TILG; MOSCHEN, 2006) cujo efeito metabólico está relacionado com estimulação da β-oxidação nos hepatócitos de ratos, a melhora na sensibilidade insulínica e no metabolismo da glicose, além de atuar como antiaterosclerótico e anti-inflamatório (MATSUZAWA et al., 2004; TILG; MOSCHEN, 2006; YAMAUCHI et al., 2002). Na obesidade ocorre a depleção dos níveis circulantes de adiponectina (TILG; MOSCHEN, 2006), o que não foi detectado em nosso estudo (Figura 13). De acordo com BRUUN et al., 2003 a perda de peso corpóreo é um importante indutor na síntese de adiponectina, fato observado no grupo *pair-feeding*. Nenhum dos grupos tratados alterou este hormônio. Em estudos com camundongos foi evidenciado que a suplementação da dieta com 5% de acido eicosapentaenoico por duas semanas foi capaz de aumentar os níveis de adiponectina (ITOH

et al., 2007). De acordo com Furlan et al., 2013 ratos obesos com suplementação de 2% fitoesteróis por oito semanas não apresentam alteração nos níveis séricos de adiponectina.

Figura 13- Níveis séricos de adiponectina em ratos em ratos tratados com *B. pilosa*, B. campestris e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



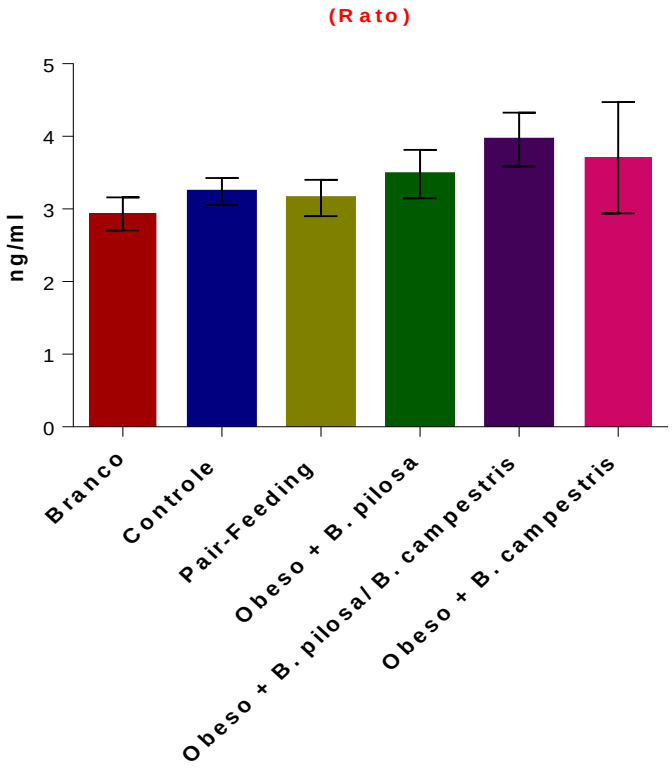
Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento., sendo: **** $p<0.0001$.

4.2.2.5. β-endorfina

Há evidencias de que na obesidade em humanos e em ratos ocorre um aumento de β-endorfina tanto plasmática e tecidual (MARGULES et al., 1978). Estudos mostraram que este mediador está envolvido na estimulação do comportamento alimentar e a das secreções insulínica e glucagon (FELDMAN et al., 1983; GIUGLIANO, 1984; GIUGLIANO et al., 1987; GRANDISON; GUIDOTTI, 1977; MARGULES et al., 1978). No entanto, em nossos experimentos, não foi possível identificar nenhuma diferença significativa nos níveis deste mediador em nenhum dos grupos estudados quando comparados ao grupo controle (Figura 14). Diferentemente de outros dados presentes na literatura, não foi possível notar diferenças significativas entre nenhum dos grupos estudados. Davis et al. (1983) também não encontrou

diferença entre ingestão alimentar e os níveis de β-endorfina nos obesos quando comparados aos indivíduos magros, dados esses que corroboram nosso resultado.

Figura14 - Níveis séricos da β-endorfina em ratos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

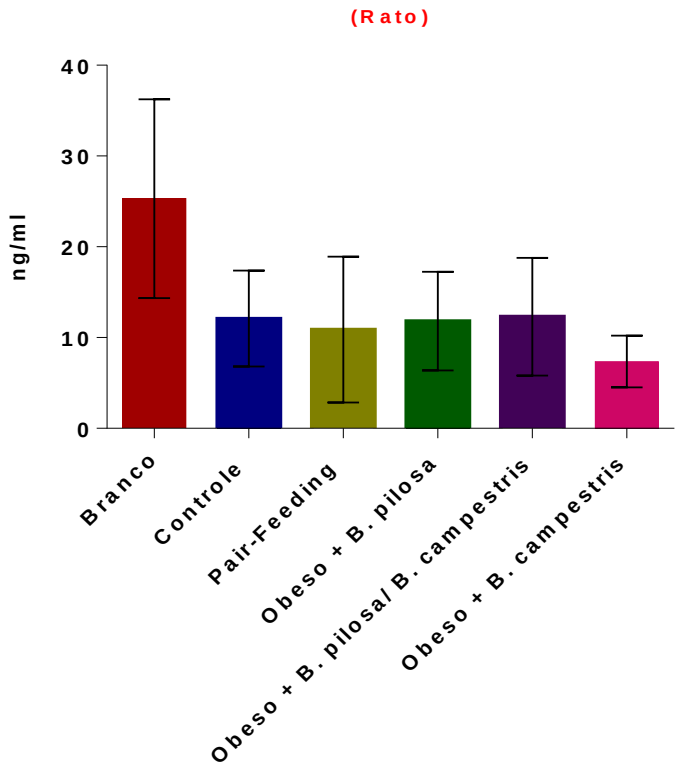


Dados expressos em média ± E.P.M. obtidos ao final dos 21 dias de tratamento.

4.2.2.6. Hormônio de crescimento

Com relação ao hormônio de crescimento (HC), há dados que mostram que a obesidade desregula sua secreção, dessa forma, a secreção está diminuída nos animais obesos, mas pode ser restaurada com uma restrição calórica e perda de peso (SCACCHI; PINCELLI; CAVAGNINI, 1999; THOMAS et al., 2013). Os níveis séricos de HC não foram afetados de forma significativa nos grupos de animais obesos em relação ao grupo branco, assim como os diferentes tratamentos não interferiram de forma significativa em relação ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15 - Níveis séricos de hormônio de crescimento em ratos tratados com *B. pilosa*, B. campestris e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

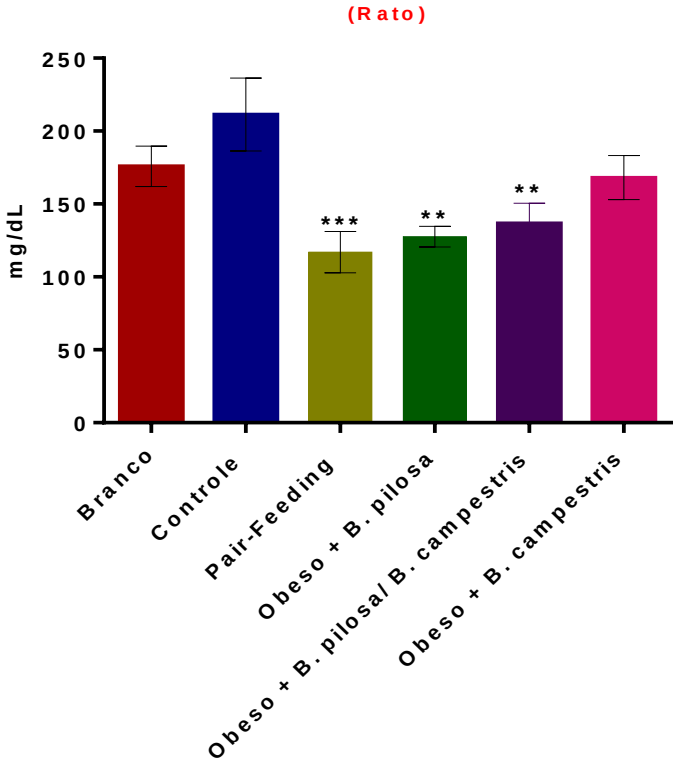


Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento.

4.2.2.7. Triacilglicerol (TAG)

Na obesidade, os adipócitos hipertrofiados caracterizam-se por uma atividade lipolítica, assim, aumentando o influxo de ácidos graxos livres ao fígado (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; JENSEN, 2006). Desta forma, com o aumento de ácidos graxos no fígado na obesidade verifica-se o aumento na produção de TAG (KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). Na Figura 16, apesar de não ter sido detectada diferença significativa entre o grupo de animais obesos e grupo branco, foi detectada uma redução significativa nos níveis de TAG nos animais obesos tratados com *B. pilosa* e sua associação com *B. campestris* em níveis similares a redução produzida pela restrição calórica. O grupo *B. campestris* não apresentou redução nos níveis de TAG. Recentemente, foi descrito que o consumo de 1,8 g EPA por humanos por três meses reduziu os níveis de TAG circulantes em indivíduos obesos (ITOH et al., 2007), enquanto que a suplementação da dieta com 2% de fitoesteróis por oito semanas não foi capaz de alterar os níveis de TAG em camundongos (CALPE-BERDIEL et al., 2008).

Figura 16- Níveis séricos de Triacilglicerol em ratos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

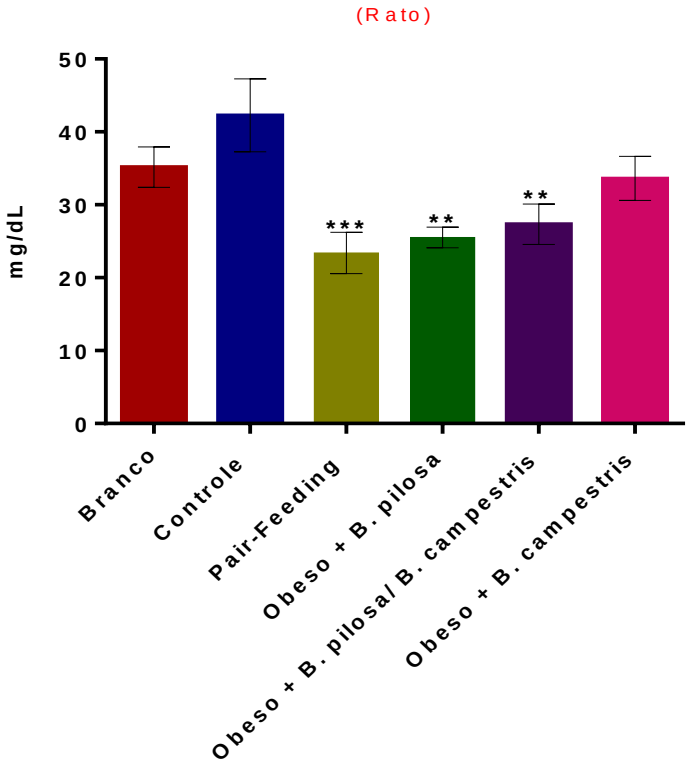


Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento, .sendo: *p<0.05;**p<0.01.

4.2.2.8. VLDL-colesterol

A produção de VLDL está aumentada na obesidade desde que esta esteja associada à resistencia insulinica (HOWARD; RUOTOLO; ROBBINS, 2003; SINGH et al., 2011). Na Figura 21, apesar de não ter sido detectada diferença significativa entre o grupo de animais obesos e grupo branco, foi detectada uma redução significativa nos níveis de VLDL nos animais obesos tratados com *B. pilosa* e sua associação com *B. campestris* em níveis similares á redução produzida pela restrição calórica. O grupo tratado com *B. campestris* não apresentou redução neste parâmetro. Em adição, o estudo realizado por Harris et al. (1984) relatou que consumo 50g de óleo de peixe contendo 8,5 g por dia de EPA é capaz de reduzir VLDL.

Figura 17 - Níveis séricos de VLDL-colesterol em ratos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

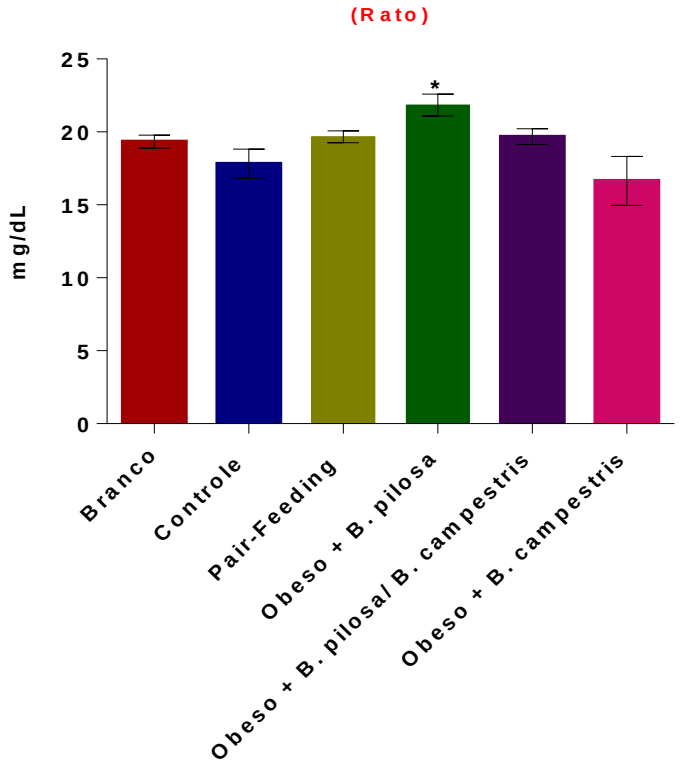


Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento. sendo: *p<0.05;**p<0.01.

4.2.2.9. HDL–colesterol

O HDL-C uma lipoproteína de alta densidade que contem apolipoproteínas, colesterol livre e ésteres de colesterol (NELSON; COX, 2008). Os níveis de HD –C estão comumente baixos em indivíduos com obesidade (FRANSSEN et al., 2011). Na Figura 18, apesar de não ter sido detectada diferença significativa entre o grupo de animais obesos e grupo branco, foi detectada uma aumento significativo nos níveis de HDL nos animais obesos tratados com *B. pilosa.* A suplementação da dieta com 2% de fitoesteróis por oito semanas não foi capaz de alterar os níveis de HDL de camundongos (CALPE-BERDIEL et al., 2008).

Figura 18 - Níveis séricos de HDL–colesterol em ratos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

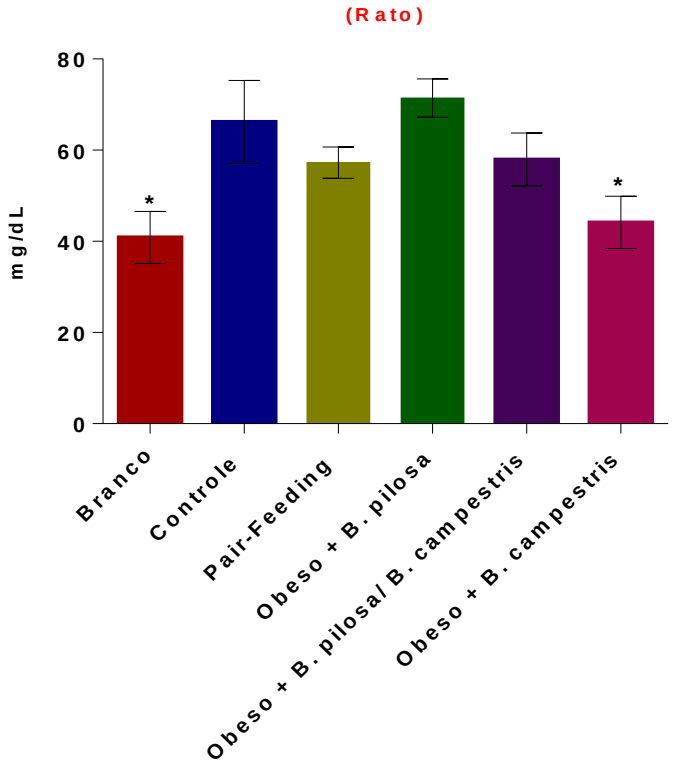


Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento, sendo:*p<0.05.

4.2.2.10. LDL–colesterol

O LDL é uma lipoproteína de baixa densidade que contem ésteres de colesterol, colesterol e apolipoproteína ApoB-100, responsável pelo transporte de lipídios na circulação(NELSON; COX, 2008). Os níveis plasmáticos de LDL em obesos estão aumentados e há uma relação positiva com o aumento do IMC (HOWARD; RUOTOLO; ROBBINS, 2003). No presente estudo foi possível observar uma diferença significativa apenas após o tratamento dos animais com *B. campestris* (Figura 19). Levantamentos de pesquisas clínicas relatam que 2g de fitoesteróis por dia também é capaz de reduzir LDL (KATAN et al., 2003). Estudos clínicos evidenciam que a suplementação da dieta com 1,8 g de acido eicosapentaenoico por três semanas não é capaz de reduzir os níveis de LDL (ITOH et al., 2007).

Figura 19 - Níveis séricos de LDL–colesterol em ratos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

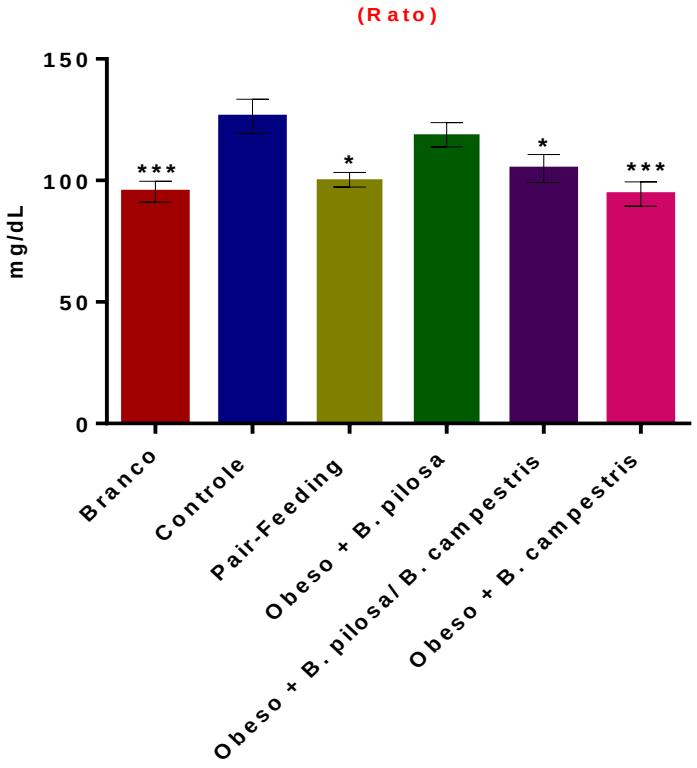


Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento, sendo: *p<0.05.

4.2.2.11. Colesterol Total

Na obesidade há aumento nos níveis de colesterol total sérico (MONTOYE; EPSTEIN; KJELSBERG, 1966). Um mecanismo apontado para isso é devido ao aumento em sua síntese endógena (MIETTINEN, 1971). Em nosso estudo foi observado diferença significativa entre o grupo de animais obesos e grupo branco. O tratamento com *B. campestris* e sua associação com *B. pilosa* reduz os níveis plasmáticos de colesterol que estão aumentados nos animais obesos (Figura 20) tal redução significativa nos níveis de colesterol total nos animais obesos tratados foram similares á redução produzida pela restrição calórica. Os fitoesteróis são capazes de reduzir a absorção de colesterol, pois competem pelos transportadores de colesterol no intestino (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008), aspecto que auxilia na justificativa da redução do colesterol na *B. campestris*. Em estudos clínicos foi evidenciado que a suplementação da dieta com 1.8 g de acido eicosapentaenoico por três meses não foi capaz de alterar os níveis de colesterol total (ITOH et al., 2007).

Figura 20 - Níveis séricos de colesterol total em ratos tratados com *B. pilosa*, *B. campestris* e *B. pilosa* associada à *B. campestris* no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Dados expressos em média ± E.P.M. e obtidos ao final dos 21 dias de tratamento, sendo: *p<0.05;**p<0.01.

Diante da quantidade de dados obtidos e com o objetivo de facilitar a análise conjunta dos dados apresentamos nos Quadros (6-7) um sumário dos resultados discutidos.

Quadro 5. Resumo comparativo dos resultados obtidos em camundongos e ratos

Camundongo				
	Branco	***Pair-feeding***	***B. pilosa***	***B. campestris***
Leptina	↔	↔	↔	↔
PCR	↓	↓	↓	↔
Rato				
	Branco	***Pair-feeding***	***B. pilosa***	***B. campestris***
Leptina	↔	↓	↔	↔
PCR	↓	↔	↔	↓

Os símbolos representam os resultados apresentados anteriormente: ↑ Aumento, ↔ Não alterou e ↓ Reduziu. Todos foram comparados ao controle.

Quadro 6. Resumo dos resultados obtidos com ratos

Branco	***Pair-feeding***	***B. pilosa***	***B. pilosa/B. campestris***	***B. campestris***	
↓	↓	↔	↓	↔	Delta peso
↔	↓	↔	↔	↔	IMC
↓	↓	↔	↔	↔	LEE
↓	↓	↔	↔	↔	Circunferência Torácica
↓	↓	↔	↔	↔	Circunferência Abdominal
↓	↓	↔	↔	↔	Circunferência Abdominal/ Circunferência Torácica
↔	↔	↔	↔	↔	Glicose
↓	↓	↔	↔	↔	Leptina
↔	↑	↔	↔	↔	Adiponectina
↔	↔	↔	↔	↔	GH
↔	↔	↔	↔	↔	β-Endorfina
↓	↔	↔	↔	↓	Proteína C Reativa
↔	↓	↓	↓	↔	Triacilglicerol
↔	↓	↓	↓	↔	VLDL
↓	↔	↔	↔	↓	LDL
↔	↔	↑	↔	↔	HDL
↓	↓	↔	↓	↓	Colesterol total

Os símbolos representam os resultados apresentados anteriormente: ↑ Aumento, ↔ Não alterou e ↓ Reduziu. Todos foram comparados ao controle.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente estudo, podemos apresentar as seguintes conclusões.

Em relação à padronização do modelo de obesidade por dieta hipercalórica, verificamos que a obesidade foi induzida em ambos os roedores utilizados, camundongos e ratos, no entanto, foi possível identificar que para os camundongos o estabelecimento da obesidade foi mais eficaz, visto que foram necessárias apenas oito semanas para induzir um nível de obesidade severa, enquanto que em ratos se atingiu apenas um nível de obesidade moderada após dez semanas de uso da dieta hipercalórica. Por outro lado, o uso de ratos como modelo experimental permite a obtenção de um número maior de amostras, facilitando a análise de maior número de mediadores.

Os diferentes tratamentos foram capazes de interferir em distintos parâmetros envolvidos na obesidade, no entanto foi evidenciado que a associação de *B. pilosa* com *B. campestris* produziu efeitos mais eficazes, pois além de interferir com diferentes parâmetros bioquímicos, também foi capaz de reduzir o ganho de massa corpórea dos animais. Tal efeito provavelmente está relacionado à hipótese de que os fitoesteróis de canola facilitam o transporte de outros compostos pela membrana plasmática das células, colaborando assim com a produção dos efeitos observados na associação.

Desde que o tratamento da obesidade mostra-se como uma estratégia complexa, é possível sugerir que a incorporação destes produtos, especialmente da associação *Bidens pilosa* com *Brassica campestris*, na dieta de pacientes obesos em associação com fármacos anti-obesidade e exercício físico, poderia representar uma estratégia associada para facilitar o controle da obesidade nestes pacientes, no entanto, estudos mais detalhados e prolongados seriam necessários.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABAJO, C. et al. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of Bidens pilosa. Journal of ethnopharmacology, v. 93, n. 2-3, p. 319–23, ago. 2004.

AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. Obesity (Silver Spring, Md.), v. 14 Suppl 5, n. August, p. 242S–249S, ago. 2006.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends in endocrinology and metabolism, v. 11, n. 8, p. 327–32, out. 2000.

BAHIA, L. et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. BMC public health, v. 12, n. 1, p. 440, jan. 2012.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-κB, inflammation, and metabolic disease. Cell metabolism, v. 13, n. 1, p. 11–22, 5 jan. 2011.

BANO, G. Glucose homeostasis, obesity and diabetes. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, v. 27, n. 5, p. 715–26, out. 2013.

BERTRAND, C. et al. Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. PloS one, v. 8, n. 11, p. e78874, jan. 2013.

BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. Nutrition research, v. 28, n. 4, p. 217–25, abr. 2008.

BRUUN, J. M. et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. American journal of physiology - Endocrinology and metabolism, v. 285, n. 3, p. E527–33, set. 2003.

CALPE-BERDIEL, L. et al. Phytosterols do not change susceptibility to obesity, insulin resistance, and diabetes induced by a high-fat diet in mice. Metabolism: clinical and experimental, v. 57, n. 11, p. 1497–501, nov. 2008.

CHAPUT, J.-P.; DOUCET, E.; TREMBLAY, A. Obesity: a disease or a biological adaptation? An update. Obesity reviews, v. 13, n. 8, p. 681–91, ago. 2012.

CINTI, S. The adipose organ. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, v. 73, n. 1, p. 9–15, 2005.

COHN, R. M.; ROTH, K. S. Lipid and lipoprotein metabolism. In: Biochemistry and disease. Baltimore: Williams and Wilkins Publishers, 1996. p. 280.

CONSIDINE, R. V et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. The New England journal of medicine, v. 334, n. 5, p. 292–5, 1 mar. 1996.

DAVIS, J. M. et al. Relationship between plasma concentrations of immunoreactive beta-endorphin and food intake in rats. Peptides, v. 4, n. 1, p. 79–83, 1983.

DESPRÉS, J.-P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature, v. 444, n. 7121, p. 881–7, 14 dez. 2006.

FELDMAN, M. et al. Beta-endorphin and the endocrine pancreas. Studies in healthy and diabetic human beings. The New England journal of medicine, v. 308, n. 7, p. 349–53, 17 fev. 1983.

FINKELSTEIN, E. A et al. Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. Health affairs, v. 28, n. 5, p. w822–31, 2009.

FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell, v. 116, n. 2, p. 337–50, 23 jan. 2004.

FLIERS, E. et al. White adipose tissue: getting nervous. Journal of neuroendocrinology, v. 15, n. 11, p. 1005–10, nov. 2003.

FRANSSEN, R. et al. Obesity and dyslipidemia. The Medical clinics of North America, v. 95, n. 5, p. 893–902, set. 2011.

FURLAN, C. P. B. et al. Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. Food Research International, v. 51, n. 1, p. 429–435, abr. 2013.

GIUGLIANO, D. Morphine, opioid peptides, and pancreatic islet function. Diabetes care, v. 7, n. 1, p. 92–8, 1984.

GIUGLIANO, D. et al. Sensitivity to beta-endorphin as a cause of human obesity. Metabolism: clinical and experimental, v. 36, n. 10, p. 974–8, out. 1987.

GRANDISON, L.; GUIDOTTI, A. Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. Neuropharmacology, v. 16, p. 533–536, 1977.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. Annual review of immunology, v. 29, p. 415–45, jan. 2011.

GUSTAFSON, B. et al. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, v. 297, n. 5, p. E999–E1003, nov. 2009.

HARIRI, N.; THIBAULT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutrition research reviews, v. 23, n. 2, p. 270–99, dez. 2010.

HARRIS, W. S. et al. Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. Metabolism: clinical and experimental, v. 33, n. 11, p. 1016–9, nov. 1984.

HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? Current opinion in lipidology, v. 17, n. 4, p. 387–93, ago. 2006.

HARROLD, J. A; WILLIAMS, G.; WIDDOWSON, P. S. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. Journal of neurochemistry, v. 74, n. 3, p. 1224–8, mar. 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. Nature, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 14 dez. 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor-x : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. Science, v. 259, n. January, p. 87–91, 1993.

HOWARD, B. V; RUOTOLO, G.; ROBBINS, D. C. Obesity and dyslipidemia. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, v. 32, n. 4, p. 855–867, dez. 2003.

HSU, Y.-J. et al. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of Bidens pilosa water extract. Journal of ethnopharmacology, v. 122, n. 2, p. 379–83, 18 mar. 2009.

IASO. International Association for the Study of Obesity. Disponível em: <http://www.worldobesity.org/aboutobesity/>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf>.

ITOH, M. et al. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, v. 27, n. 9, p. 1918–25, set. 2007.

JAIME, P. C. et al. Brazilian obesity prevention and control initiatives. Obesity reviews, v. 14 Suppl 2, n. November, p. 88–95, nov. 2013.

JAMES, W. P. T. et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. The New England journal of medicine, v. 363, n. 10, p. 905–17, 2 out. 2010.

JENSEN, M. D. Adipose tissue as an endocrine organ: implications of its distribution on free fatty acid metabolism. European Heart Journal Supplements, v. 8, n. Suppl B, p. B13–B19, 1 maio 2006.

KABRA, D. G.; KABRA, U. D.; TSCHÖP, M. H. Pharmacological Treatment of Obesity. In: SHIROMANI, P. et al. (Eds.). Sleep Loss and Obesity: Intersecting Epidemics. New York, NY: Springer New York, 2012.

KANNEGANTI, T.-D.; DIXIT, V. D. Immunological complications of obesity. Nature immunology, v. 13, n. 8, p. 707–12, ago. 2012.

KARASTERGIOU, K. et al. Review: Adiponectin for prediction of cardiovascular risk? The British Journal of Diabetes & Vascular Disease, v. 9, n. 4, p. 150–154, 28 ago. 2009.

KATAN, M. B. et al. Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. Mayo Clinic Proceedings, v. 78, n. 8, p. 965–978, ago. 2003.

KELESIDIS, T. et al. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. Annals of internal medicine, v. 152, n. 2, p. 93–100, 19 jan. 2010.

KELLY, T. et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. International journal of obesity, v. 32, n. 9, p. 1431–7, set. 2008.

KLOP, B.; ELTE, J. W. F.; CABEZAS, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. Nutrients, v. 5, n. 4, p. 1218–40, abr. 2013.

KOMPRDA, T. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. Journal of Functional Foods, v. 4, n. 1, p. 25–38, jan. 2012.

LANGIN, D. In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. Cell metabolism, v. 14, n. 5, p. 569–70, 2 nov. 2011.

LEAL, V. D. O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, v. 419, p. 87–94, 18 abr. 2013.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, v. 282, 2002.

LIN, Y. et al. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. The Journal of biological chemistry, v. 275, n. 32, p. 24255–63, 11 ago. 2000.

LING, W. .; JONES, P. J. . MINIREVIEW DIETARY PHYTOSTEROLS: A REVIEW OF METABOLISM, BENEFITS AND SIDE EFFECTS. Life Sciences, v. 57, n. 3, p. 195–206, 1995.

LOPES-VIRELLA, M. F. et al. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. Clinical chemistry, v. 23, n. 5, p. 882–4, maio 1977.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. Current protocols in pharmacology, v. Chapter 5, p. 1–22, set. 2012.

MARGULES, D. L. et al. beta-Endorphin is associated with overeating in genetically obese mice (ob/ob) and rats (fa/fa). Science, v. 202, n. 4371, p. 988–91, 1 dez. 1978.

MATSUZAWA, Y. et al. Adiponectin and metabolic syndrome. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, v. 24, n. 1, p. 29–33, jan. 2004.

MIETTINEN, T. A. Cholesterol Production in Obesity. Circulation, v. 44, n. 5, p. 842–850, 1 nov. 1971.

MITCHELL, N. S. et al. Obesity: overview of an epidemic. The Psychiatric clinics of North America, v. 34, n. 4, p. 717–32, dez. 2011.

MONTOYE, H. J.; EPSTEIN, F. H.; KJELSBERG, M. O. Relationship Between Serum Cholesterol and Body Fatness: An Epidemiologic Study. Am J Clin Nutr, v. 18, n. 6, p. 397–406, 1 jun. 1966.

MOON, H. et al. Ef fi cacy of Metreleptin in Obese Patients With Type 2 Diabetes: Cellular and Molecular Pathways Underlying Leptin Tolerance. v. 60, n. June, p. 1647–1656, 2011.

MORA, M. P. et al. Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity. Chemistry and physics of lipids, v. 101, n. 2, p. 255–65, set. 1999.

MOURA, R. A. Técnicas de laboratório. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

MÜLLER-RIEMENSCHNEIDER, A. F. et al. Health-economic burden of obesity in Europe. European Journal of Epidemiology, v. 23, n. 8, p. 499–509, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER Principles of biochemistry. [s.l: s.n.]. p. 1294

NG, A. C. et al. Visceral adipose tissue, but not waist circumference is a better measure of metabolic risk in Singaporean Chinese and Indian men. Nutrition & diabetes, v. 2, n. July, p. e38, jan. 2012.

NOO. Natinal Obesity Observatory. Disponível em: <http://www.noo.org.uk/uploads/doc/vid_8202_Burden_of_obesity_181010_MG.pdf. >.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Laboratory animals, v. 41, n. 1, p. 111–9, jan. 2007.

OLIVER, E. et al. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. Proceedings of the Nutrition Society, v. 69, n. 2, p. 232–43, maio 2010.

OMS. World Health Organization. Disponível em: <Overweigh: http://apps.who.int/gho/data/node.main.A897>.

OSTLUND, R. E. Phytosterols and cholesterol metabolism. Current opinion in lipidology, v. 15, n. 1, p. 37–41, fev. 2004.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nature reviews. Immunology, v. 11, n. 2, p. 85–97, fev. 2011.

PEREDA, M. D. C. V. Avaliação dos efeitos do óleo extraído dos grãos verdes de coffea arabica L. e dos fitoesterois de Brassica campestris L. na melhora da celulite e da gordura localizada. [s.l.] UNICAMP, 2009.

PEREIRA, R. L. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from Bidens pilosa L. Immunopharmacology, v. 43, n. 1, p. 31–7, jun. 1999.

POWELL, A G.; APOVIAN, C. M.; ARONNE, L. J. New drug targets for the treatment of obesity. Clinical pharmacology and therapeutics, v. 90, n. 1, p. 40–51, jul. 2011.

QI, L.; CHO, Y. Gene environment interaction and obesity. Nutrition reviews, v. 66, n. 12, p. 684–694, 2008.

SCACCHI, M.; PINCELLI, A. I.; CAVAGNINI, F. Growth hormone in obesity. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, v. 23, n. 3, p. 260–271, 1999.

SCHÄFFLER, A.; SCHÖLMERICH, J. Innate immunity and adipose tissue biology. Trends in immunology, v. 31, n. 6, p. 228–35, jun. 2010.

SINGH, A. et al. Obesity and dyslipidemia. Int J Biol Med Res, v. 2, n. 3, p. 824–828, 2011.

SOLONI, F. G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. Clinical chemistry, v. 17, n. 6, p. 529–34, jun. 1971.

STEPPAN, C. M.; LAZAR, M. A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. Trends in Endocrinology & Metabolism, v. 13, n. 1, p. 18–23, jan. 2002.

STUBBS, R. J.; WHYBROW, S. Energy density, diet composition and palatability: influences on overall food energy intake in humans. Physiology & behavior, v. 81, n. 5, p. 755–64, jul. 2004.

THOMAS, G. A et al. Obesity, growth hormone and exercise. Sports medicine (Auckland, N.Z.), v. 43, n. 9, p. 839–49, 2013.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nature reviews. Immunology, v. 6, n. 10, p. 772–83, out. 2006.

TOUBAL, A. et al. SMRT-GPS2 corepressor pathway dysregulation coincides with obesity-linked adipocyte inflammation. The Journal of clinical investigation, v. 123, n. 1, p. 362–79, 2 jan. 2013.

VETTER, M. L. et al. Behavioral and pharmacologic therapies for obesity. Nature reviews. Endocrinology, v. 6, n. 10, p. 578–88, out. 2010.

VICKERS, S. P.; JACKSON, H. C.; CHEETHAM, S. C. The utility of animal models to evaluate novel anti-obesity agents. British journal of pharmacology, v. 164, n. 4, p. 1248–62, out. 2011.

VISSER, M. et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. JAMA : the journal of the American Medical Association, v. 282, n. 22, p. 2131–35, 1999.

WEE, C.; MUKAMAL, K.; HUANG, A. Obesity and C-reactive Protein Levels Among White, Black, and Hispanic US Adults. Obesity (Silver Spring), v. 16, n. 4, p. 875–880, 2008.

WOOD, I. S. et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. The Proceedings of the Nutrition Society, v. 68, n. 4, p. 370–7, nov. 2009.

WOODS, S.; SEELEY, R. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. The Journal of Nutrition, v. 133 no. 4, n. September 2002, p. 1081–1087, 2003.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature medicine, v. 8, n. 11, p. 1288–95, nov. 2002.

YEAGLE, P. Cholesterol and the cell membrane. Biochimica et Biophysica Acta, v. 822, p. 267–287, 1985.

YOSHIDA, N. et al. Bidens pilosa suppresses interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of mitogen activated protein kinases phosphorylation in normal human dermal fibroblasts. The Journal of dermatology, v. 33, n. 10, p. 676–83, out. 2006.

YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review. Phytochemistry, v. 71, n. 14-15, p. 1625–41, out. 2010.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, v. 372, n. 6505, p. 425–32, 1 dez. 1994.

7. ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO EXPERIMENTO COM CAMUNDONGOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **147-CEEA**, sobre "*Avaliação dos efeitos de fármacos, de plantas medicinais, e alimentos funcionais sobre o estresse físico e psicogênico em animas normais e geneticamente modificados (CB57L/6J lep^{ob})*", sob a responsabilidade de **LUIZ CLAUDIO DI STASI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *ad referendum* pela ***COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*** (CEEA).

Botucatu, 20 de outubro de 2009.

Profa. Dra. PATRÍCIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO
Presidente - CEEA

ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO EXPERIMENTO COM RATOS

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **440-CEUA**, sobre "Avaliação da atividade de produtos naturais na obesidade induzida por dieta hipercalórica", sob a responsabilidade de **Luiz Claudio Di Stasi**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "*Ad referendum*" da ***COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS*** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 20 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n. CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6015/6014 Fax 14 3815 3744 e-mail dta@ibtu.unesp.br