

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Adriana Del Ben

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EFEITOS DE *Brassica campestris* SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR
DIETA HIPERCALÓRICA**

**BOTUCATU – SP
2011**

ADRIANA DEL BEN

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EFEITOS DE *Brassica campestris* SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR
DIETA HIPERCALÓRICA**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

**BOTUCATU – SP
2011**

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

Del Ben, Adriana.

Avaliação preliminar dos efeitos de *Brassica campestris* sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica / Adriana Del Ben. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho acadêmico (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Canola – Efeito fisiológico. 2. Sementes oleaginosas. 3. Obesidade.

Palavras-chave: Canola; Dieta enriquecida; Fitoesteróis, Plantas Medicinais.

Primeiramente aos meus pais Marta e Antonio, por todo o apoio e confiança que me permitiram seguir em frente na profissão escolhida.

À minha família, em especial minha avó Maria, pelo incentivo aos estudos.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram, escutaram e estiveram presente, mesmo os que estão longe fisicamente – Natália e Lucas - e os que estão por perto.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do laboratório, Adriano, Alexandre Chagas, Alexandre Tanimoto, Aline, Celso, Juliana Checon, Juliana Severi, Léo, Luiz e Patrícia pelos ensinamentos e auxílio na execução do projeto.

À Laura, Juliana, Fabiana e Aline pelo tratamento dos animais e discussões dos dados obtidos.

À Ana pela ajuda e paciência no desenvolvimento da monografia.

A os professores e funcionários do departamento de Farmacologia.

Aos funcionários da seção de graduação.

Ao Delala do Laboratório Experimental por fazer pellets da ração hipercalórica.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Chemyunion Química Ltda pelo fornecimento do extrato e apoio no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio di Stasi pela oportunidade e confiança no trabalho.

"O sábio não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas"

Claude Lévi-Strauss

A obesidade, juntamente com o sobrepeso, tem sido considerada um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, especialmente por serem os principais fatores de risco para inúmeras doenças crônicas, como a doença coronariana, diabetes mellitus tipo II, hipertensão e alguns tipos de tumores, as quais estão associadas a altas taxas de mortalidade. O uso de alimentos funcionais e de dietas adequadas com apelo de promoção da saúde tem crescido como mecanismo de prevenção, controle e tratamento de doenças crônicas como a obesidade. Vários estudos etnofarmacológicos indicam espécies vegetais para o tratamento de distúrbios relacionados com a obesidade com um importante atrativo de que este esquema terapêutico é entendido como mais seguro e eficaz para a saúde que o tratamento com anorexígenos tradicionais. Considerando que tanto a ingestão de alimentos como o tratamento por via oral com diferentes compostos pode promover alterações na expressão gênica e que uma dieta alimentar adequada tem sido valiosa como mecanismo de manutenção das funções vitais do organismo, o objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos do extrato padronizado de *Brassica campestris* L. na diminuição do peso e controle da ingestão alimentar. Foram feitas triagens *in vivo* deste produto e os estudos de seus efeitos no metabolismo energético em camundongos não obesos e com obesidade induzida por dieta hipercalórica. Após indução da obesidade por 8 semanas, os animais foram tratados por 21 dias com o extrato por via oral. Após os 21 dias os animais foram mortos e os efeitos deste produto foram avaliados sobre o consumo diário de ração e sobre o peso corpóreo. De acordo com os resultados obtidos, o extrato de *Brassica campestris* não foi eficaz na redução do peso corporal dos animais obesos, assim como não reduziu a ingestão de ração.

Palavras chave: Canola; Dieta enriquecida; Fitoesteróis, Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Obesity along with overweight has been considered one of the most serious public health problems in the world, especially because they are the main risk factors for many chronic diseases such as coronary heart disease, type II diabetes mellitus, hypertension and some types of tumors, which are associated with high mortality rates. The use of functional foods and appropriate diets to promote health has grown as a mechanism for prevention, control and treatment of chronic diseases such as obesity. Several ethnopharmacological studies indicate plants species for the treatment of disorders associated with obesity with a major attraction of this regimen is perceived as safer and more effective for health than the traditional treatment with appetite suppressants. Whereas both food intake and the oral treatment with different compounds can cause changes in gene expression and that a proper diet has been valuable as a mechanism for maintaining the body's vital functions, the objective of this project was to evaluate the effects of standardized extract of *Brassica campestris* L. in the decrease in weight and food intake control. *In vivo* trials of this product were conducted and studies of its effects on energy metabolism in non-obese mice and with obesity induced by hypercaloric diet. After induction of obesity by 8 weeks, animals were treated for 21 days with the extract orally. After 21 days the animals were killed and the effects of this product were evaluated on the daily feed intake and on body weight. According to the results obtained, the extract of *Brassica campestris* was not effective in reducing body weight of obese animals, and did not reduce food intake.

Key-words: Canola; Enriched diet; Phytosterols, Medicinal Plants.

Lista de figuras

Figura 1 - Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento.....	34
Figura 2 - Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas.....	35
Figura 3 - Média de consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo/número de animais.....	36
Figura 4 - Avaliação da evolução do peso corporal dos animais. Dados expressos em Δ peso corporal.....	37

Lista de tabelas

Tabela 1 - Especificações do CardioAid™ Plant Sterols.....	27
Tabela 2 - Macronutrientes e micronutrientes das rações (%).....	28
Tabela 3 - Perfil de aminoácidos das rações (%).....	29
Tabela 4 - Perfil de carboidratos das rações (%).....	29
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%).....	30
Tabela 6 - Variação do peso corpóreo dos animais de diferentes grupos experimentais.....	35
Tabela 7 - Variação do peso dos animais de diferentes grupos experimentais após 8 semanas de dieta a pós tratamento com os diferentes produtos-teste.....	37
Tabela 8 - Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	38

INTRODUÇÃO.....	20
1. Obesidade.....	19
2. Epidemiologia	20
3. Modelo Experimental	20
4. Abordagem Farmacológica	21
5. Busca por novos compostos	22
5.1 <i>Brassica campestris</i>	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Compostos teste	27
2. Animais	27
3. Indução de obesidade	28
4. Tratamento e delineamento experimental	30
5. Avaliação geral	31
6. Obtenção do soro dos animais e obtenção do tecido adiposo.....	31
7. Análise Estatística.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	39
BIBLIOGRAFIA	41

O presente projeto é parte integrante de um Auxílio regular Fapesp (09/52471-1) que visa estudar os efeitos de uma série de extratos de plantas na melhora do bem estar, diminuição do estresse, diminuição do peso, controle da ingesta alimentar e melhora das propriedades biológicas e biomecânicas da pele ligadas ao mecanismo do estresse e envelhecimento. A metodologia aplicada nesse projeto é totalmente nova no laboratório, para tanto foi necessário estudo de artigos da área e discussões sobre os mesmos. Após os estudos definiu-se que utilizaríamos camundongos machos das linhagens isogênicas C57BL/6 e C57BL/6J Lep^{ob} para a experimentação, e os parâmetros avaliados seriam: aumento ou redução da ingesta e do peso corpóreo, agitabilidade dos animais, aparência do pelo, quantificação de mediadores - leptina, β -endorfina, IL-6, proteína C reativa, cortisol e insulina - no soro dos animais e expressão gênica de SREBP, ChREBP, AQP-7, PPAR- γ , NPY, adiponectina, resistina e dos receptores para orexina (OX) OX1-R e OX2-R no tecido adiposo dos animais.

Quando o projeto se iniciou, enfrentamos um sério problema com a aquisição dos animais para experimentação. Tais animais seriam fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, porém na época da solicitação dos animais, essa instituição alegou não possuir os mesmos nas quantidades necessárias para a realização dos estudos propostos, pois sua produção estava sendo utilizada apenas pelos docentes e pesquisadores internos da Unicamp, sendo impossível atender a demanda externa. Sendo assim, buscamos alternativas para adquirir estes animais, mas todas as tentativas foram infrutíferas, visto que tal linhagem era escassa em todos os biotérios que entramos em contato, justamente pelo grande número de pesquisadores que passaram a desenvolver seus projetos de pesquisa com estes animais. Os biotérios e fornecedores de animais consultados foram CEDEME (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP), Instituto Butantan, Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP – Ribeirão Preto, USP - São Paulo, Biotério da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

Com toda esta dificuldade, optamos em utilizar uma metodologia de obesidade induzida por dieta enriquecida, utilizando-se camundongos da Linhagem Swiss, disponível em nossa própria universidade. Dessa forma, nesta primeira etapa, precisamos padronizar este modelo de obesidade em camundongos. Para esta padronização, foi utilizado como

base o método descrito por Nascimento *et al.*, 2008. É importante ressaltar que a padronização deste modelo de obesidade permitirá sua utilização em demais projetos de iniciação científica, mestrado e doutorado em fase de implantação em nosso laboratório.

Além disso, outro problema ocorrido foi com a padronização do estresse. Os artigos de Shanks *et al.*, 1990; Katayama *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008; Sim *et al.*, 2010; Golub *et al.*, 2011 que se utilizavam de camundongos para indução do estresse físico e psicogênico foram discutidos e, dessa forma, determinamos que a sessão contaria com 30 choques de 2 segundos de 0,5mA, sem a possibilidade de fuga e com intervalos aleatórios entre 5 e 25 segundos.

1. Obesidade

Sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde (OMS). A classificação de sobrepeso e obesidade é comumente realizada pelo índice de massa corpórea (IMC), que é definido pelo peso da pessoa em kilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros. A incidência da obesidade no mundo tem tomado proporções alarmantes nas últimas décadas (Mathew *et al.*, 2007), sendo considerada uma epidemia global, inclusive nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Eckel *et al.*, 2002; O'Brien & Dixon, 2002; Wong *et al.*, 2004). Em muitos dos quais é uma doença negligenciada pelas políticas públicas de saúde e pelos setores responsáveis pelo desenvolvimento de pesquisas orientadas à busca de novos procedimentos e produtos de valor terapêutico para seu controle e tratamento. Em 2008, pelo menos 1,5 bilhão de pessoas adultas no mundo estavam com sobrepeso ((IMC) ≥ 25 kg/m²) e destas, pelo menos 500 milhões eram obesas ((IMC) ≥ 30 kg/m²)(OMS).

O acúmulo excessivo de gordura tem sido considerado um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, especialmente por ser o principal fator de risco para inúmeras doenças crônicas, como a doença coronariana, *diabetes mellitus* tipo II, hipertensão e alguns tipos de tumores (O'Brien & Dixon, 2002), as quais estão associadas às altas taxas de mortalidade e à redução na expectativa de vida (Fontaine *et al.*, 2003).

A obesidade é considerada como uma condição inflamatória sistêmica que contribui para o desequilíbrio metabólico, implicando na liberação de diversos mediadores pelos adipócitos (Kyrou *et al.*, 2006; Tsigos & Chrousos, 2006; Hyman, 2007). Adicionalmente, a hiperativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) contribui com o acúmulo de tecido gorduroso e a obesidade, por si própria, constitui um estado crônico de estresse do organismo e pode causar disfunção no eixo HPA. A regulação do balanço energético no organismo depende de um mecanismo para perceber o nível das reservas de energia na gordura corporal e transmitir a informação aos locais de controle no hipotálamo, onde ocorre a integração da informação e consequente controle da ingestão e gasto de energia. O tecido adiposo é capaz de emitir sinais que regulam a ingesta alimentar e o gasto energético e, desta forma controlam as transformações no balanço energético, mantendo o “*status*” nutricional do organismo (Sethi & Vidal-Puig, 2007).

2. Epidemiologia

Dados epidemiológicos mostram que nos EUA, 50% dos adultos possuem sobrepeso, enquanto que 22% são considerados obesos. Diferentemente do que ocorre com outras doenças, vários dados epidemiológicos da obesidade em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, inclusive no Brasil, estão disponíveis. Uma recente revisão mostra que no Brasil existem 31,2% de indivíduos do sexo masculino com sobrepeso e 10,7% considerados obesos, e entre as mulheres, 29,2% apresentam sobrepeso e 13,8% são obesas (Ford & Mokdad, 2008). Em adição, a prevalência da obesidade no Brasil cresceu em 2,7% durante 1974-1975 e 8,8% durante 2002-2003 entre os homens e, 7,4% para 13,0% entre as mulheres (Monteiro *et al.*, 2007). Índices de prevalência entre crianças e adolescentes também têm crescido no Brasil, sendo que entre 1975 a 1997 este índice variou de 2,9% para 13,1% entre os homens e de 5,3% a 14,8% entre as mulheres (Wang *et al.*, 2002).

Os custos diretos e indiretos da obesidade nos EUA foram estimados em 117 bilhões de dólares no ano de 2000 (Ford & Mokdad, 2008). No Canadá, os custos diretos de tratamento foram da ordem de 1,6 bilhões de dólares e os indiretos de 2,7 bilhões de dólares, representando cerca de 2,2% do total de gastos em saúde no país (Katzmarzyk & Janssen, 2004). Embora no Brasil os custos da obesidade não são conhecidos, se estimou em 2001 que estes custos representaram 1,08% do total das hospitalizações entre homens e 3,07% entre as mulheres (Sichieri *et al.*, 2007).

3. Modelo Experimental

Como foi possível observar, a obesidade é uma doença que afeta a população mundial, independentemente do desenvolvimento econômico das nações, tornando-se necessário o desenvolvimento de modelos experimentais para estudos mais aprofundados sobre a doença. Os estudos com seres humanos obesos apresentam limitações éticas, metodológicas e financeiras (Hall *et al.*, 1993), por isso, outras alternativas devem ser desenvolvidas e validadas. Há modelos em que a obesidade é resultante de modelos genéticos (Ren *et al.*, 2000) ou manipulações dietéticas (Fitzgerald *et al.*, 2001; Carrol *et al.*, 2006) porém o modelo com maior semelhança à obesidade humana é a que resulta da

utilização de dietas com alta densidade energética, gorduras ou hidrato de carbonos (Pereira *et al.*, 2003).

A partir da análise de diversos estudos (Van Heek *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2003; Klaus *et al.*, 2005; Mak *et al.*, 2006; Pitombo *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Buettner *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2009; Hariri & Thibault, 2010; He *et al.*, 2010; Bruder-Nascimento, 2011, Lijnen, 2011) pudemos identificar os procedimentos mais adequados para a padronização do modelo, assim como buscar uma dieta que permitisse a indução da obesidade nos camundongos da linhagem Swiss disponíveis em nossa universidade.

Segundo Buettner (2007), o melhor método para induzir obesidade em animais é com dietas com mais de 40% de energia provinda da gordura, ricas em ácidos graxos linoléico (n-6) e oléico (n-9). A ração hipercalórica utilizada apresentava 49,2% da energia proveniente de gordura enquanto a ração normocalórica somente 12,3% (Bruder-Nascimento, 2011), sendo que a gordura era composta principalmente de n-6 e n-9. Adicionalmente, estudos indicam que ganho de peso entre 10-25% pode ser considerado como obesidade moderada (Harrold *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2003) e acima de 40% obesidade severa (Levin & Dunn-Meynell, 2002).

4. Abordagem Farmacológica

Atualmente há disponível no mercado dois medicamentos para o tratamento da obesidade, o Orlistate e a Sibutramina (Yun, 2010). O primeiro atua reduzindo a absorção de gordura no intestino pela inibição da lipase pancreática (Ballinger & Peikin, 2002; Hutton & Fergusson, 2004; Thuraiajah *et al.*, 2005; Drew *et al.*, 2007), e o segundo é anorético, aumentando a saciedade (Lean, 2001; Poston & Foreyt, 2004; Tziomalos *et al.*, 2009). No entanto, os dois medicamentos apresentam efeitos colaterais como aumento da pressão sanguínea, boca seca, constipação, dor de cabeça e insônia (Thuraiajah *et al.*, 2005; de Simone & D'Addeo, 2008; Slovacek *et al.*, 2008; Karamadoukis *et al.*, 2009).

Dessa forma, em busca de se evitar os efeitos colaterais, o desenvolvimento de novos medicamentos anti-obesidade é necessário. Atualmente as pesquisas mais promissoras foram as que estudaram as drogas de ação central (Radafaxina e Oleoil-estrona), os antagonistas para receptores CB1 (Rimonabanto), as drogas que bloqueiam a absorção de gordura (Cetilistate), e utilização de fragmentos de hormônio de crescimento humano

(Halford, 2006; Melnikova & Wages, 2006). Outra abordagem estuda os componentes bioativos provindos da natureza para o desenvolvimento de medicamentos seguros e efetivos no tratamento da obesidade (Mayer *et al.*, 2009), como exemplo os polifenóis que tem atividade anti obesidade, e são constituídas de apigenina, genisteína e catequinas (Wolfram *et al.*, 2006; Rayalam *et al.*, 2008; Thielecke & Boschmann, 2009).

Os produtos naturais com efeito anti obesidade são agrupados em 5 categorias conforme seu mecanismo de ação:

- diminuição da absorção de lipídios.
- diminuição da energia ingerida.
- aumento do gasto de energia.
- diminuição da diferenciação e proliferação de pré adipócitos.
- diminuição da lipogênese e aumento da lipólise.

5. Busca por novos compostos

Atualmente é incontestável que a nutrição desempenha papel predominante no gerenciamento da saúde, aspecto que permitiu a descoberta tanto da importância de certos nutrientes essenciais, como também das quantidades específicas de cada nutriente necessárias para a manutenção da saúde (Mutch *et al.*, 2005). Reconhece-se que a maioria das doenças que afetam a espécie humana, assim como seu processo de envelhecimento e respectivas manifestações estéticas, incluindo a obesidade, são minimizados por mudanças no estilo de vida, como alimentação balanceada, bem-estar, prática de atividades físicas, entre outros hábitos que reduzem o impacto do estresse. Estudos demonstram que dezenas de bilhões de dólares poderiam ser poupados anualmente se dietas saudáveis fossem adotadas, uma vez que reduziriam os gastos com despesas médicas e faltas ao trabalho (Milner, 2004). Recentemente, o uso de alimentos funcionais com apelo de promoção da saúde tem crescido consideravelmente, especialmente como produtos para a prevenção e tratamento de doenças crônicas. Muitos produtos encontrados no mercado alegam desde benefícios neurológicos e psicológicos, até aqueles envolvendo efeitos protetores para a função cardiovascular, gastrointestinal, imune, câncer, obesidade e envelhecimento.

O uso de plantas medicinais é baseado na premissa de que em sua complexa constituição estão presentes princípios ativos que promovam saúde e aliviem diferentes

sintomas associados a distintas doenças. Os suplementos a base de compostos vegetais freqüentemente oferecem uma mistura fitoquímica com interação aditiva e/ou sinérgica. Por milhares de anos, as plantas têm desempenhado um significativo papel na manutenção da saúde humana e melhora da qualidade de vida, sendo uma fonte valiosa de componentes para temperos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Vários estudos etnofarmacológicos indicam espécies vegetais para o tratamento de distúrbios relacionados à obesidade com o principal atrativo de que este esquema terapêutico é entendido como mais seguro e eficaz para a saúde do que o tratamento com anorexígenos tradicionais (Heber, 2003).

5.1 *Brassica campestris*

Os fitoesteróis de canola (*Brassica campestris* L.), estudados por nosso grupo, foram selecionados em razão de seus importantes efeitos em estimular significativamente a produção de colágeno e elastina em cultura de fibroblastos humanos (Pereda, 2009). São compostos com núcleo esteroidal encontrados em plantas, principalmente nozes, sementes oleaginosas e cereais como, por exemplo, a canola (Jekel *et al.*, 1998 *apud* Pereda, 2009). Os compostos mais comumente encontrados são o β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, e compreendem aproximadamente 80% do total de fitosteróis contidos na maioria dos óleos vegetais (Jekel *et al.*, 1998 *apud* Pereda, 2009).

Estes compostos apresentam estrutura análoga ao colesterol, mas diferem no tamanho da cadeia devido à presença de um grupo etil na posição C24. O colesterol, nas células animais, está envolvido na organização e permeabilidade da membrana e pode modelar atividades das proteínas de membrana (Mora *et al.*, 1999; Yasukazu & Etsuo, 2003).

Estudos mostram que os fitoesteróis são anti-oxidantes hábeis em modificar as propriedades estruturais e funcionais da dupla camada fosfolipídica das membranas celulares (Kostanje *et al.*, 1990; Yasukazu & Etsuo, 2003), favorecendo assim a ação e o transporte de compostos no interior das células (Mora *et al.*, 1999), úteis assim como coadjuvantes a outros produtos.

OBJETIVOS

Padronizar o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Estudar os efeitos do tratamento com o produto proposto:

- avaliando a influência do tratamento sobre o aumento ou redução da ingesta;
- avaliando a influência do tratamento sobre o aumento ou redução do peso corpóreo;
- determinando os efeitos tóxicos do extrato padronizado.

Obter amostras de tecidos e plasma para estudos posteriores da morfologia da pele, expressão gênica e determinação de níveis de diferentes mediadores envolvidos na obesidade e na homeostase da pele.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Compostos teste

O produto testado (CardioAid™ Plant Sterols) foi fornecido pela empresa ADM Nutrition para a Chemyunion Química Ltda (empresa parceira na realização desse projeto) e consistiu, principalmente de fitoesteróis de *Brassica campestris* (canola) (Tabela 1).

Tabela 1 - Especificações do CardioAid™ Plant Sterols

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.
<i>E. coli</i>	Neg.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Neg.

O extrato foi administrado via oral, para tanto, foi diluído em 92 partes de metilcelulose à 1% e 8 partes de tween 80. Os demais animais receberam somente o veículo.

2. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss obtidos do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo. Os animais foram alojados em estante ventilada com mini-isoladores de polissulfona (Alesco Ind. e Com. Ltda) e filtração de ar de entrada e de saída, mantido no interior de uma sala climatizada sob a temperatura constante de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Após período de adaptação de uma semana, receberam diferentes dietas, conforme descrito abaixo.

3. Indução de obesidade

Os animais foram divididos em dois grupos:

Dieta normocalórica (DN) - animais que receberam a ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere®) por um período de 8 semanas. A ração padrão RC Focus 1765 foi composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico.

Dieta hipercalórica (DH) - animais que receberam ração hipercalórica (RC Focus 2413 - chocolate, Agrocere®), por um período de 8 semanas. A ração hipercalórica RC Focus 2413 é constituída de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplementos mineral e vitamínico.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hipercalórica, mensurada pela empresa Agrocere®, está representada na Tabela 2. Os perfis de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, estão representados nas Tabelas 3, 4 e 5 respectivamente.

Tabela 2 - Macronutrientes e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7
Calorias (kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

Tabela 3 - Perfil de aminoácidos das rações (%)

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,39	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

Tabela 4 - Perfil de carboidratos das rações (%)

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Rafinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Ramnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%)

Ácidos Graxos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Capróico (c6:0)	0,00	0,02
Caprílico (c8:0)	0,03	0,03
Cáprico (c10:0)	0,02	0,05
Láurico (c12:0)	0,33	0,25
Mirístico (c14:0)	0,30	0,33
Palmítico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Esteárico (c18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (c16:1)	0,06	0,15
Oléico (c18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (c18:2n6c)	47,10	40,83
α -Linolênico (c18:3n3)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

Para ambos os grupos, a oferta de ração e água corrente foi *ad libitum*. Todos os animais foram pesados e o consumo de ração foi medido diariamente.

Após 8 semanas, os camundongos da ração hipercalórica com o ganho de peso (Δ_{peso}) maior ou igual a 13g foram classificados como obesos e utilizados nas etapas subsequentes do projeto.

4. Tratamento e delineamento experimental

O tratamento se iniciou apenas após o processo de indução de obesidade (8 semanas) e os animais receberam o tratamento durante 21 dias. A dose teste foi de 100mg/kg do extrato de *Brassica campestris*.

Os animais dos grupos não tratados com o extrato receberam somente o veículo por gavagem durante o mesmo período. Os grupos *pair feeding* sofreram restrição de 30% da dieta, que foi calculada pela média de consumo de ração dos animais controles respectivos, conforme discriminado abaixo. Os outros grupos receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 diferentes grupos:

Grupo 1 - animais Swiss não obesos (n=10);

Grupo 2 - animais Swiss obeso (n=22);

Grupo 3 (*Pair feeding*) - animais Swiss obeso com restrição de dieta (70% da média de consumo do grupo 2) e sem estresse (n=24);

Grupo 4 - animais Swiss obeso com tratamento com canola (n=24).

O protocolo experimental, foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Protocolo 147-CEEA.

5. Avaliação geral

A avaliação geral dos animais foi realizada em diferentes etapas:

1. Avaliação diária (durante os 21 dias de tratamento) de parâmetros como aumento ou redução da ingesta e do peso corpóreo de todos os animais.

2. Análise de toxicidade do produto, realizada após os 21 dias de tratamento por meio da avaliação comparativa da aparência geral, coloração e peso dos principais órgãos (testículos, fígado, baço, rins, coração, pulmão, cérebro e hipotálamo). A presença de características macroscópicas de toxicidade em qualquer dos tecidos avaliados, foi indicativo para a preparação de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE), com posterior e conseqüente avaliação microscópica.

6. Obtenção do soro dos animais e obtenção do tecido adiposo

Após os 21 dias, os animais foram decapitados e o sangue obtido foi coletado em eppendorf e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorresse a coagulação. Após esse período o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 4400rpm. O soro separado foi armazenado à -80° C para as análises bioquímicas.

Destes animais também foram retirados testículos, fígado, baço, rins, coração, pulmão, cérebro e hipotálamo. Estes órgãos foram pesados e armazenados em uma solução de Álcool 80%, Formaldeído e Ácido Acético (Alfac – 18:2:1).

Uma amostra de pele do dorso dos camundongos foi retirada para posterior análise histológica e armazenada em Alfac. Além disso, foram coletadas amostras de tecido adiposo visceral, armazenadas a -80°C em criotubos com 300µl de Trizol para futura extração do RNA total e avaliação da expressão gênica. Uma amostra do tecido adiposo também foi retirada e armazenada em Alfac para análise histológica.

7. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguidas pelo teste *a posteriori* de Dunnett. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a ambientação dos animais, houve uma separação entre os que receberam a ração normocalórica e os que receberam a ração hipercalórica, com o intuito de induzir a obesidade. Como podemos observar na figura 1, os grupos não diferiram significativamente no consumo porém foi possível observar um aumento no consumo da dieta hipercalórica, a partir da quarta semana, em relação à dieta normocalórica, fato inesperado considerando-se que segundo Stubbs e Whybrow *apud* Hariri e Thibault (2010) o esperado era uma diminuição no consumo devido à alta densidade de calorias presente na dieta.

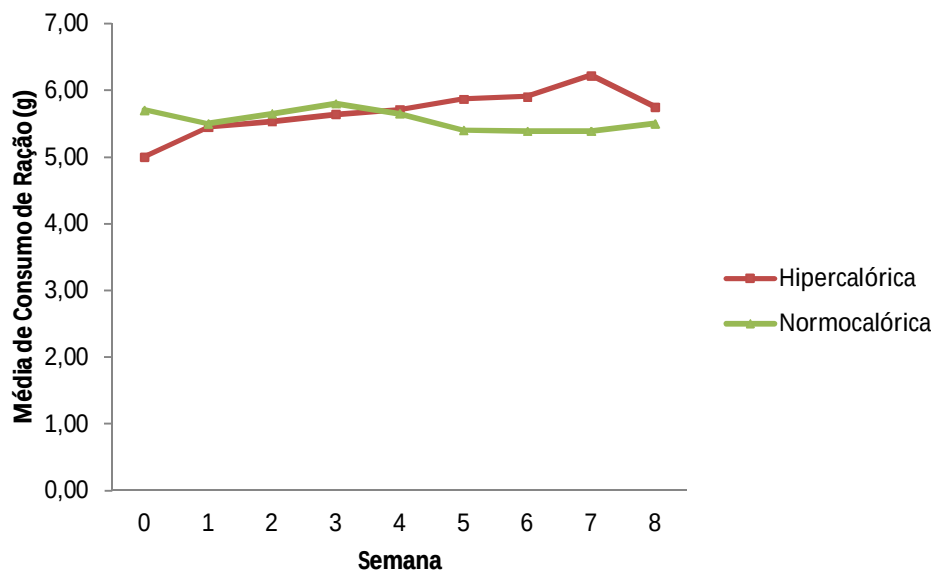


Figura 1 - Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento

Com o consumo da dieta hipercalórica por 8 semanas observamos um aumento significativo de peso corporal dos animais destes grupos quando em comparação aos que consumiram a dieta normocalórica (Figura 2), levando a uma diferença de peso de 16,2g (47,2%). Quando essa diferença é acima de 40% a obesidade pode ser considerada como severa (Levin & Dunn-Meynell, 2002), e se está entre 10-25% como obesidade moderada (Harrold *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2003). Dessa forma, a indução de obesidade através da dieta hipercalórica foi efetiva sendo a obesidade severa.

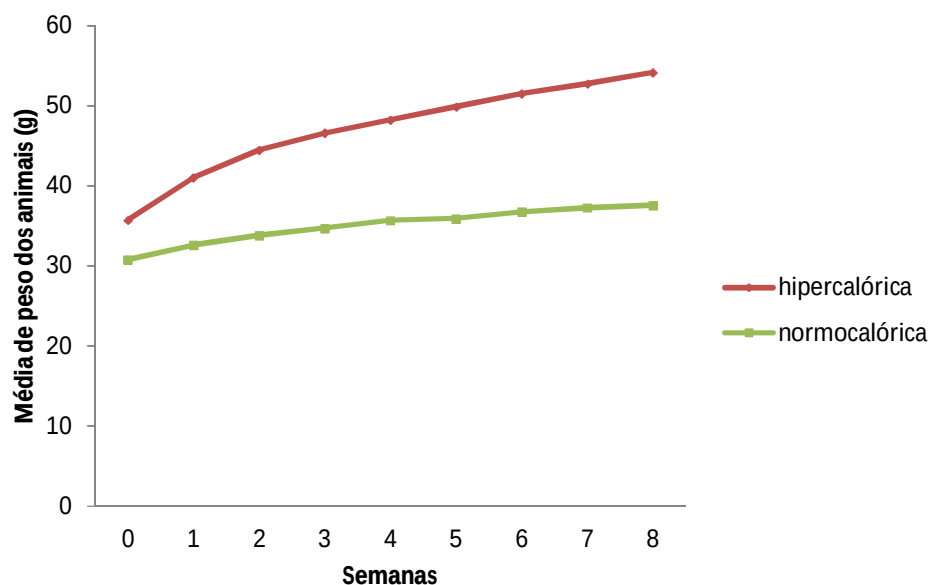


Figura 2 - Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas

Considerando os dados absolutos, nota-se que o ganho de peso dos animais que receberam a dieta normocalórica após as 8 semanas foi de apenas 6,8g (Δ peso), enquanto os que receberam a dieta hipercalórica ganharam 18,4g (Tabela 6). Esse ganho de peso confirma a indução da obesidade com o uso da dieta padronizada.

Tabela 6 - Variação do peso corpóreo dos animais de diferentes grupos experimentais

Grupos experimentais	Peso inicial	Após 8 semanas	Δ peso
Animais não obesos (dieta normocalórica)	30,8 $\pm$ 1,0	37,6 $\pm$ 1,4	6,8
Animais obesos (dieta hipercalórica)	34,2 $\pm$ 1,0	52,3 $\pm$ 1,4 **	18,1
<i>Pair feeding</i> (dieta hipercalórica)	35,1 $\pm$ 1,3	54,0 $\pm$ 1,3 **	18,9
Canola (dieta hipercalórica)	37,1 $\pm$ 1,0	55,2 $\pm$ 1,5**	18,1

Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (**p<0,01 em relação aos animais não obesos)

Após a indução da obesidade, os animais foram separados em seus respectivos grupos experimentais. Todos passaram a receber a ração normocalórica, uma vez que Huang *et al.* (2008) demonstraram que o aumento da razão de proteína e carboidrato não reduz o grau de obesidade quando esta foi induzida por dieta hipercalórica em camundongos, sendo assim, a troca da ração não interfere numa possível redução de peso. Os animais foram

tratados por 21 dias, podendo se observar que houve uma diferença no consumo de ração pelos animais do grupo *pair feeding*, mas isso foi devido à restrição forçada de ração. Os animais do grupo controle, comparado com os obesos, também ingeriram significativamente menos ração, o que pode ter ocorrido devido à menor necessidade de nutrientes para a sua saciedade (Figura 3).

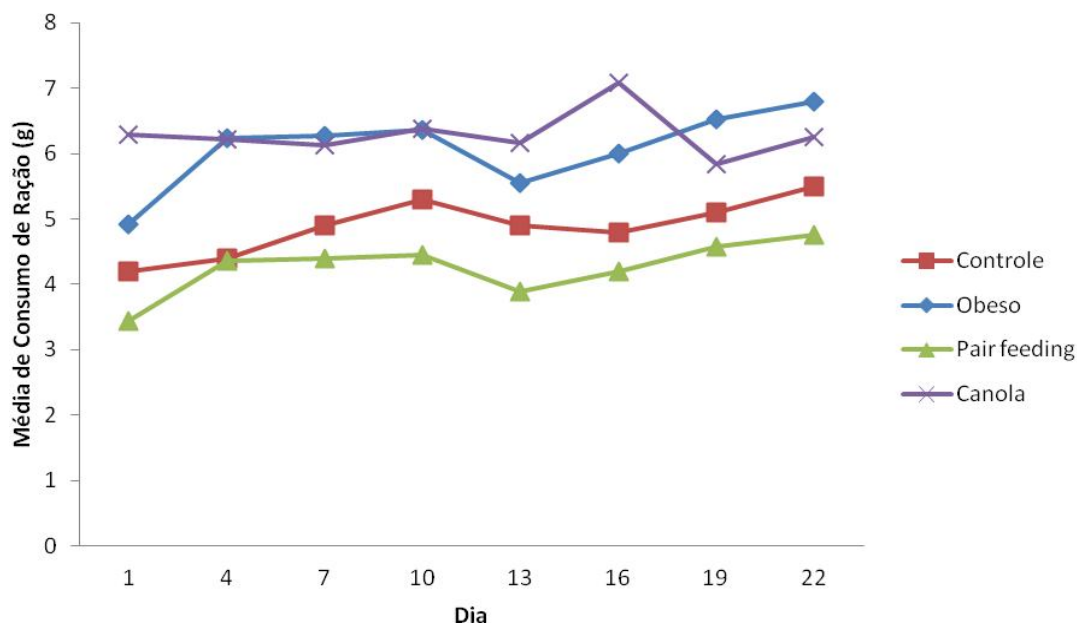


Figura 3 - Média de consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo/número de animais

Com relação à redução do peso corpóreo, os resultados mostraram que não ocorreu uma diminuição significativa no peso corpóreo dos animais que foram tratados com *Brassica campestris* em relação aos animais obesos sem tratamento. Já o grupo *pair feeding* apresentou redução significativa no peso, como mostrado na figura 4. Também pode-se notar essa diferença quando observamos a variação do peso corporal na tabela 7.

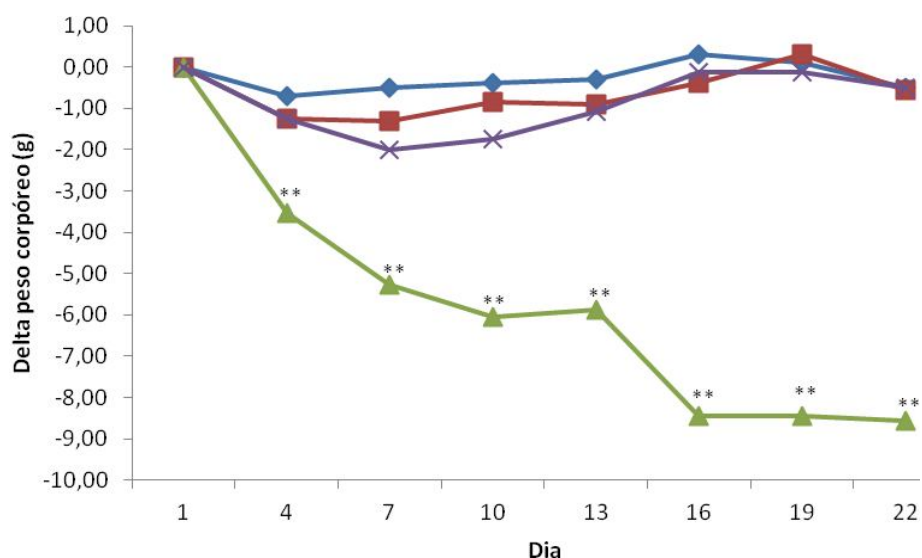


Figura 4 - Avaliação da evolução do peso corporal dos animais. Dados expressos em Δ peso corporal

Tabela 7 - Variação do peso dos animais de diferentes grupos experimentais após 8 semanas de dieta após tratamento com os diferentes produtos-teste

Grupos experimentais	Peso inicial	Após 8 semanas	Δ peso dieta	Após tratamento	Δ peso tratamento
Animais normais	30,8 $\pm$ 1,0	37,6 $\pm$ 1,4	6,8	36,8 $\pm$ 1,6	-0,8
Animais obesos	34,2 $\pm$ 1,0	52,3 $\pm$ 1,4 **	18,1	51,5 $\pm$ 1,4	-0,8
<i>Pair feeding</i>	35,1 $\pm$ 1,3	54,0 $\pm$ 1,3 **	18,9	43,0 $\pm$ 1,5 *	-11,0
Canola	37,1 $\pm$ 1,0	55,2 $\pm$ 1,5 **	18,1	55,3 $\pm$ 1,6	0,1

Resultados apresentados na forma de média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

Após os 21 dias, os animais foram mortos e seus principais órgãos retirados e pesados, conforme apresentado na Tabela 8. Através da média dos pesos pode-se concluir que a administração do extrato de canola não alterou o peso dos órgãos, indicando não haver indícios de toxicidade por parte desta substância.

Tabela 8 - Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais

	Grupos			
	Controle	Obeso	Pair-feeding	Canola
Fígado (g)	12,92 ± 0,09	12,36 ± 0,12	11,60 ± 0,09	12,58 ± 0,12
Baço (g)	3,48 ± 0,13	3,12 ± 0,12	2,80 ± 0,11	3,02 ± 0,06
Rins (g)	7,11 ± 0,46	6,00 ± 0,08	5,97 ± 0,06	6,05 ± 0,08
Coração (g)	3,87 ± 0,19	3,60 ± 0,07	3,85 ± 0,08	3,59 ± 0,06
Pulmão (g)	4,95 ± 0,38	4,83 ± 0,28	5,28 ± 0,18	4,82 ± 0,16
Testículo (g)	4,35 ± 0,11	4,20 ± 0,08	4,44 ± 0,09	4,10 ± 0,08
Cérebro (g)	6,00 ± 0,11	5,21 ± 0,11	5,67 ± 0,09	5,12 ± 0,06
Hipotálamo (mg)	1,10 ± 0,04	0,93 ± 0,03	0,94 ± 0,04	0,88 ± 0,02

Resultados apresentados na forma de média ± E.P.M.

CONCLUSÃO

Através da realização dos experimentos no presente projeto podemos concluir que:

- A indução da obesidade pela dieta hipercalórica foi efetiva,
- Os fitoesteróis de *Brassica campestris* não atuaram na redução da ingesta alimentar e do peso corporal, além de não demonstrar indícios de toxicidade.

BIBLIOGRAFIA

- Araújo EP, Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinol* 148(12):5991-5997, 2007.
- Ballinger A, Peikin SR. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol* 440:109–117, 2002.
- Bruder-Nascimento T. Alterações cardiovasculares e desenvolvimento de obesidade em animais submetidos à dieta hipercalórica e estresse crônico. 2011. Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High fat diets: modeling the metabolic disorder of human obesity in rodents. *Obesity* 15:798-808, 2007.
- Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 48:65-72, 2006.
- Dai, JX, Han HL, Tian M, Cao J, Xiu JB, Song NN, Huang Y, Xu TL, Ding YQ, Xu L. Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. *PNAS* 105(33):11981-11986, 2008.
- de Simone G, D'Addeo G. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:337–341, 2008.
- Dean JT, Tran L, Beaven S, Tontonoz P, Reue K, Dipple KM, Liao JC. Resistance to diet-induced obesity in mice with synthetic glyoxylate shunt. *Cell Metabol* 9:525-536, 2009.
- Drew BS, Dixon AF, Dixon JB. Obesity management: update on orlistat. *Vasc Health Risk Manag* 3:817–821, 2007.
- Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation*, v. 105, s. 24, p.2923-8, 2002.
- Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:h547-h552, 2001.
- Fontaine KR; Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 289:187-193, 2003.
- Ford ES, Mokdad AH. Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):S1-S8, 2008.
- Golub Y, Kaltwasser SF, Mauch CP, Herrmann L, Schmidt U, Holsboer F, Czisch M, Wotjak CT. Reduced hippocampus volume in the mouse model of post traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 45(5):650-659, 2011.

- Halford JC. Obesity drugs in clinical development. *Curr Opin Invest Drugs* 7:312–318, 2006.
- Hall JE, Brands MW, Dixon WN. Obesity-induced hypertension: renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension* 22:292-299, 1993.
- Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23:270-299, 2010.
- Harris RBS, Bowen HM, Mitchell TD. Leptin resistance in mice is determined by gender and duration of exposure to high-fat diet. *Physiol Behav* 78:543-555, 2003.
- Harrold JA, Willians G, Widdowson PS. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurochem* 74:1224-1228, 2000.
- He, M., Su, H., Gao, W., Johansson, S.M., Liu, Q., Wu, X., Liao, J., Young, A.A., Bartfai, T., Wang, M.W. Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. *PLoS One* 5(12):e14205, 2010.
- Heber D. Herbal preparations for obesity: are they useful? *Prim Care* 30: 441-463, 2003.
- Huang XF, Liu Y, Rahardjo GL, McLennan PT, Tapsell LC, Buttemer WA. Effects of diet high in whey, soy, red meat and Milk protein on body weight maintenance in diet-induced obesity mice. *Nutr Diet* 65:53-59, 2008.
- Hutton B, Fergusson D. Changes in body weight and serum lipid profile in obese patients treated with orlistat in addition to a hypocaloric diet: a systematic review of randomized clinical trials. *Am J Clin Nutr* 80:1461–1468, 2004.
- Hyman M. Ultrametabolismo. GMT Editores. P.135-153, 2007.
- Jekel AA, Vaessen HAMG, Schotthorst RC. Capillary gas-chromatographic method for determining non-derivatized sterols - some results for duplicate 24h diet samples collected in 1994. *Fresenius J Anal Chem* 360:595-600, 1998.
- Karamadoukis L, Shivashankar GH, Ludeman L, Williams AJ. An unusual complication of treatment with orlistat. *Clin Nephrol* 71:430–432, 2009.
- Katayama M, Aoki E, Suzuki H, Kawana S. Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a non-depilated mouse model. *Exp Dermatol* 16(7):553-560, 2007.
- Katzmarzyk PT, Janssen I. The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update. *Can J Appl Physiol* 29:90–115, 2004.

- Klaus S, Pültz C, Thöne-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obesity* 29:615-623, 2005.
- Korstanje LJ, van Ginkel G, Levine YK. Effects of steroid molecules on the dynamical structure of dioleoyl phosphatidyl choline and digalactosyl diacylglycerol bilayers. *Biochim Biohys Acta* 1022:155-162, 1990.
- Kyrou I, Chrousos GP, Tsygos C. Stress, visceral obesity and metabolic complications. *Ann NY Acad Sci* 1083: 77-110, 2006.
- Lean ME. How does sibutramine work? *Int J Obes Relat Metab Disord* 4:8–11, 2001.
- Levin BE, Dunn-Meynell AA. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:46-54, 2002.
- Lijnen HR. Murine models of obesity and hormonal therapy. *Tromb Res* 127(3):S17-S20, 2011.
- Mak RH, Kuo HJ, Cheung WW. Animal models of obesity-associated chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 13(4):374-385, 2006.
- Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villarreal D. Obesity-Hypertension: Emerging Concepts in Pathophysiology and Treatment. *Am J Med Sci.*, 334(1): 23-30, 2007.
- Mayer MA, Hocht C, Puyo A, Taira C.A. Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Curr Clin Pharmacol* 4:53–61, 2009.
- Melnikova I, Wages D. Anti-obesity therapies. *Nat Rev Drug Discov* 5, 369–370, 2006.
- Milner JA. Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr* 134(9):2492S-2498S, 2004.
- Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. *Am J Public Health* 97:1808-1812, 2007.
- Mora MP, Tourne-Peteilh C, Chavercon M, Fabre B, Milon A, Muller I. Optimization of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity. *Chem Phys Lip* 101:255-265, 1999.
- Mutch DM, Wahl W, Williamsom G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of Nutrition. *FASEB J* 19(12):1602-1616, 2005.
- O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg* 184:4S-8S, 2002.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em: 31 out. 2011.

- Pereda MCV. Avaliação dos efeitos do óleo extraído dos grãos verdes de *Coffea arabica* L. e dos fitoesteróis de *Brassica campestris* L. na melhora da celulite e da gordura localizada. Tese de doutorado, Unicamp, 191p, 2009.
- Pereira LO, de Franscisci RP, Lancha Jr AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(2):111-127, 2003.
- Pitombo C, Araújo EP, Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol* 191:699-706, 2006.
- Poston WS, Foreyt JP. Sibutramine and the management of obesity. *Expert Opin Pharmacother* 5:633–642, 2004.
- Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19:717–726, 2008.
- Ren J, Walsh MF, Jefferson L, Natavio M, Ilg KJ, Sowers JR, Brown RA. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese Zucker rat hearts. *J of Biomed Sci* 7(5):390-400, 2000.
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lip Res* 48: 1253-1262, 2007.
- Shanks N, Griffiths J, Zalcman S, Zacharko RM, Anisman H. Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 36(3):515-519, 1990.
- Sichieri R, do Nascimento S, Coutinho W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad Saude Publica* 23:1721–1727, 2007.
- Sim YB, Park SH, Kang YJ, Kim SM, Lee JK, Jung JS, Suh HW. The regulation of blood glucose level in physical and emotional stress models: Possible Involvement of adrenergic and glucocorticoid systems. *Arch Pharm Res* 33(10):1679-1683, 2010.
- Slovacek L, Pavlik V, Slovackova B. The effect of sibutramine therapy on occurrence of depression symptoms among obese patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:43–44, 2008.
- Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – a review. *Phytochemistry* 70:11–24, 2009.
- Thurairajah PH, Syn WK, Neil DA, Stell D, Haydon G. Orlistat (xenical)- induced subacute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17:1437–1438, 2005.
- Tsigos C, Chrousos GP. Stress, Obesity, and the Metabolic Syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1083: xi–xiii, 2006.

- Tziomalos K, Krassas GE, Tzotzas T. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update. *Vasc Health Risk Manag* 5:441–452, 2009.
- Van Heek M, Comptom DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Stradeer CD, Davis Jr HR. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99:385-390, 1997.
- Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in United States, Brazil, China and Russia. *Am J Clin Nutr* 75:971-977, 2002.
- Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* 50:176–187, 2006.
- Wong CY, O’Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation* 110(19): 3081-3087, 2004.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D’Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 133:1081-1087, 2003.
- Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry* 71:1625–1641, 2010.