

Uso de sibutramina e epigalocatequina-3-galato em ratos com excesso de peso corporal

Use of sibutramine and epigallocatechin-3-gallate in rats with excess body weight

Ribeiro LL¹; Nascimento E²; Maia LMSS³; Melo NCO²; Silva IPLI¹; Lira FJX⁴; Lima GM²; Evêncio LB³

1 Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2 Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3 Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4 Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFPE).

Recibido: 7/agosto/2018. Aceptado: 30/diciembre/2018.

RESUMO

Introdução: Potenciais compostos fitoterápicos extraídos de plantas, sem toxicidade comprovada ou de baixa toxicidade, podem impactar no controle e tratamento da obesidade. Neste contexto, destaca-se a *Camellia sinensis*, que, devido a quantidade de polifenóis, com destaque para a Epigalocatequina-3-galato, tem se tornado alvo de investigação devido a seus possíveis efeitos sobre o emagrecimento.

Objetivo: Avaliar o efeito tóxico do uso da Epigalocatequina-3-galato e comparar seu poder de emagrecimento com a sibutramina em ratos *Wistar* obesos.

Métodos: 57 filhotes oriundos de 13 ratas *Wistar* foram divididos em 2 grupos de acordo com as condições nutricionais: grupo controle, com 9 filhotes por ninhada, e, grupo ocidentalizado, com 3 filhotes por ninhada. Da gestação ao 12º dia de lactação todos os animais receberam dieta padrão comercial. Do 13º dia de vida até o final do experimento, o grupo ocidentalizado recebeu alimentação com maior teor de açúcar, sódio e gordura. Foram avaliados o crescimento somático, consumo alimentar, peso de órgãos, histologia hepática e pa-

râmetros bioquímicos. Após se tornarem obesos, 4 meses após desmame, os animais do grupo ocidentalizado receberam por gavagem, durante 8 dias, solução salina (NaCl 0,9%) ou sibutramina (7,5mg/kg/dia) ou epigalocatequina-3-galato (50mg/kg/dia).

Resultados: As drogas não demonstraram toxicidade, mas promoveram significativa redução do consumo alimentar e de peso corporal. A dieta ocidentalizada repercutiu em alterações bioquímicas, esteatose hepática e infiltrado de linfócitos, mas que não foram observadas no grupo que recebeu a Epigalocatequina-3-galato.

Discussão: As catequinas do chá verde parecem estar envolvidas na regulação da expressão de diversos compostos metabólicos como PPAR- γ , LPL e FAS, entre outros, levando a sua redução no tecido adiposo branco. Adicionalmente, a EGCG tem importante papel na apoptose de adipócitos maduros, podendo essas vias estarem envolvidas, isoladamente ou associadas, nas repercussões observadas.

Conclusão: A Epigalocatequina-3-galato parece exercer efeito protetor contra os efeitos do consumo da dieta ocidentalizada e obesidade, podendo ser utilizada como via alternativa ao uso de sibutramina no controle do excesso de peso corporal.

PALAVRAS CHAVE

Chá verde, *Camellia sinensis*, Dieta hiperlipídica, Obesidade.

Correspondencia:
Elizabeth do Nascimento
nlizabeth@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Potential phytotherapeutic compounds extracted from plants, without proven toxicity or low toxicity, may have an impact on the control and treatment of obesity. In this context, we highlight *Camellia sinensis*, which, due to the amount of polyphenols, especially Epigallocatechin-3-gallate, has become the target of investigation due to its possible effects on weight loss.

Objective: To evaluate the toxic effect of Epigallocatechin-3-gallate and to compare its weight-loss power with sibutramine in obese *Wistar* rats.

Methods: 57 pups from 13 *Wistar* rats were divided into 2 groups according to nutritional conditions: control group, with 9 pups per litter, and westernized group with 3 pups per litter. From gestation to the 12th day of lactation, all animals received commercial standard diet. From the 13th day of life until the end of the experiment, the Westernized group received food with higher sugar, sodium and fat content. Somatic growth, food consumption, organ weight, liver histology and biochemical parameters were evaluated. After the animals became obese, 4 months after weaning, animals from the Westernized group received saline (NaCl 0.9%) or sibutramine (7.5mg / kg / day) or epigallocatechin-3-gallate 50mg / kg / day).

Results: The drugs did not demonstrate toxicity, but they promoted significant reduction of food consumption and body weight. The Westernized diet had repercussions on biochemical changes, hepatic steatosis and lymphocyte infiltrate, which were not observed in the group receiving epigallocatechin-3-gallate.

Discussion: Green tea catechins appear to be involved in regulating the expression of various metabolic compounds such as PPAR- γ , LPL and FAS, among others, leading to their reduction in white adipose tissue. In addition, EGCG plays an important role in the apoptosis of mature adipocytes, and these pathways may be involved, either alone or in association, with the observed repercussions.

Conclusion: Epigallocatechin-3-gallate seems to exert a protective effect against the effects of westernized diet and obesity, and maybe used as an alternative route to the use of sibutramine in the control of excess body weight.

KEY WORDS

Green tea, *Camellia sinensis*, Catechins, High-Fat Diet; Obesity.

LISTA DE ABREVIATURA

OMS: Organização Mundial de Saúde.

ABESO: Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

SBCBM: Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica.

EGCG: Epigallocatequina 3 Galato.

COMT: Catecol-O-Metiltransferase.

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco.

GC: Grupo Controle.

GO: Grupo Ocidentalizado.

CSAL: Grupo Controle Salina.

OSAL: Grupo Ocidentalizado Salina.

OSIB: Grupo Ocidentalizado Sibutramina.

OEGCG: Grupo Ocidentalizado Epigallocatequina 3 Galato.

IMC: Índice de Massa Corporal.

TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética.

TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica.

LDL: *LowDensityLipoprotein*.

HDL: *High DensityLipoprotein*.

VLDL: *VeryLowDensityLipoprotein*.

HE: Hematoxilina e Eosina.

PPAR- γ : *PeroxisomeProliferator- Activated Receptor Gamma*.

C/EBP-ALFA – CCAAT: *EnhancerBindingProtein Alpha*.

LPL: Lipoproteína Lipase.

FAS: *FattyAcidSynthase*.

mRNA: Ácido Ribonucleico mensageiro.

CTP-1: *CytidineTriphosphate 1*.

UCP-2: *UncouplingProtein 2*.

HSL: *HormoneSensitive Lipase*.

ATGL: *Adipose Triglyceride Lipase*.

DNT: Dietilnitrosamina.

INTRODUÇÃO

A obesidade constitui assunto de crescente interesse na comunidade científica em função de sua prevalência mundial e comorbidades correlatas¹. Tem como causa primária o desequilíbrio entre a quantidade de energia ingerida e a utilizada pelo organismo, sendo uma doença multifatorial secundária à estímulos ambientais como os nutricionais, metabólicos, neurais, comportamentais e genéticos, que tem como consequência a hipertrofia e hiperplasia das células gordurosas².

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública por estar associada a 2/3 das mortes no mundo³. No Brasil, em conjunto, a obesidade e o sobrepeso já atingiram metade da população, estando também presente em 15% das crianças, onde seu crescimento é preocupante em função do aparecimento precoce de doenças crônicas (diabetes mellitus, hipertensão e dislipidemia), anteriormente observadas apenas em indivíduos adultos/idoso⁴.

Métodos de tratamento ou controle da obesidade são diversos, porém, por sua característica crônica e recidivante, seu controle permanente se torna frágil¹. Atualmente, há poucos medicamentos para controle da obesidade sendo utilizados no Brasil. As substâncias comumente utilizadas, derivadas das anfetaminas (Fenproporex, afepromona e Mazindol), tiveram sua comercialização suspensa pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁵ em função de seus efeitos colaterais. No entanto, o fármaco sibutramina permanece como um dos medicamentos mais utilizado para a redução do peso, apesar de ter sofrido restrições por ter sido associado ao surgimento da hipertensão arterial e aumento da frequência cardíaca³.

Por outro lado, a cirurgia bariátrica, indicada para obesos em condições extremas, e suas variantes vem obtendo muitos adeptos. Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM), o Brasil ocupa 2º lugar no ranking em número de realização de tal procedimento⁶.

Potenciais agentes terapêuticos, especialmente os com baixa toxicidade, poderiam apresentar importante impacto para o controle e tratamento da obesidade⁷. Neste contexto, vale salientar a existência da *Camelliasinensis*. Esta, é uma planta originária da Ásia e muito cultivada por países como China e Japão, cujas folhas jovens, sem processo de fermentação, dão origem ao chá verde, como é comercialmente conhecido⁸.

O chá verde, por sua grande quantidade de polifenóis possui potente ação antioxidante, onde destaca-se o grupo de catequinas, em especial a Epigalocatequina-3-galato (EGCG), que é a principal responsável pelas suas ações benéficas, com possíveis efeitos sobre o emagrecimento⁷⁻⁹. Em ratos, verificou-se que a suplementação de catequinas foi capaz de reduzir o peso corporal, o colesterol e os níveis glicêmicos¹⁰. Em humanos demonstrou-se que as catequinas podem atuar inibindo a ação da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), levando a ação prolongada da noradrenalina nas junções sinápticas, aumentando, assim, a termogênese^{10,11}.

Diante do exposto, observa-se que o controle da obesidade é um grande desafio para a ciência, assim como eleva a demanda pela busca de novos tratamentos e meios de controle. Logo, o presente estudo objetiva avaliar a ação anti-obesidade da *Camelliasinensis* a partir do uso isolado de sua principal catequina, a EGCG, quando comparada a ação farmacológica da Sibutramina.

MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob nº 23076.053073/2014-20. Inicialmente, foram utilizados 57 filhotes machos, provenientes da colônia do Biotério de Nutrição da UFPE, oriundos de 13 ratas *Wistarprimíparas* (\pm 250-320g). Desde o 1º dia da gestação até o 12º dia de lactação as ratas receberam água e ração comercial (Presence®) *ad libitum*.

Após o 12º dia de lactação, as fêmeas foram divididas em 2 grupos [Grupo controle (GC) e Grupo ocidentalizado (GO)], onde o GC recebeu dieta comercial padrão (23% de proteína, 49% de carboidrato e 28% de lipídios com 3,24kcal/g) e o GO dieta ocidentalizada, elaborada no Departamento de Nutrição da UFPE (15% de proteína, 50% de carboidratos e 35% de lipídios com 4,0 Kcal/g), adaptada do estudo de Cavalcante et al. (2013)¹² de acordo com as fases de crescimento e manutenção, até o final do experimento.

Afim de potencializar a obesidade induzida pela dieta o número de filhotes, por ninhada do GO foram reduzidas a 3 filhotes/matriz durante a lactação. A seguir, ao desmame, nas primeiras 5 semanas, foi ofertada solução de sacarose a 10% com intuito de mimetizar o consumo de bebidas industrializadas açucaradas durante a fase juvenil, situação comum ao hábito alimentar ocidental. E, com finalidade de preservar o consumo alimentar, foi intercalado aleatoriamente, durante 3 dias da semana, a oferta de dieta comercial e ocidentalizada. Os animais foram mantidos a 22°C (\pm 1°C) e sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas (claro: das 20h00 às 08h00).

Em função do tratamento farmacológico e após exclusão dos animais oriundos da redução das ninhadas e de alguns animais *outliers*, o número final de animais analisados foi 32. O GC, após o desmame, passou a ser chamado de controle salina (CSAL) e o GO de obeso salina (OSAL), e, os que receberam tratamento formaram o grupo obeso sibutramina (OSIB) e obeso epigalocatequina-3-galato (OEGCG). Assim, 4 grupos foram formados: grupo controle (CSAL), alimentados com ração comercial padrão e que após 4 meses do desmame recebeu 2ml de solução de NaCl 0,9% (n=8); grupo obeso salina (OSAL), cujos filhotes foram alimentados com dieta ocidentalizada e, após a obtenção da obesidade, receberam 2ml de NaCl 0,9% (n=8); grupo obeso sibutramina (OSIB), cujos filhotes foram alimentados com dieta ocidentalizada e após a obtenção da obesidade receberam 2 ml de solução de Cloridrato de Sibutramina Monoidratado (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.®) na dose de 7,5 mg/Kg (n=8) e grupo obeso epigalocatequina-3-galato (OEGCG), onde os filhotes foram alimentados com dieta ocidentalizada e tratados com 2ml de solução de epigalocatequina-3-galato (AktinChemicals, China®) na dose de 50mg/Kg/dia (n=8). As soluções foram administradas por gavagem, pela manhã, uma vez ao dia, durante 8 dias consecutivos.

Durante o período de oferta de água com sacarose também foi analisado o consumo alimentar e hídrico, onde seus cálculos foram obtidos através da subtração das cotas de água e dieta oferecidas diariamente. A mensuração do peso foi realizada através de balança digital (Kmach®), após o terceiro dia de vida, com intervalos de três em três dias até o desmame, e, após desmame, realizada semanalmente.

Medidas de crescimento somático e perímetros corporais foram realizados através da obtenção do peso, comprimento naso-anal e perímetros abdominal e torácico. Estes permitiram o cálculo do IMC, que foi realizado antes e após o tratamento (quatro meses após desmame e imediatamente antes da eutanásia), visto que, em ratos, o IMC tem sido referenciado como uma medida associada ao aumento da gordura corporal e doenças decorrentes do excesso de tecido adiposo¹³.

Os animais foram anestesiados com Ketamina, (45mg/kg) e Xilazina (7mg/kg), via intramuscular, na pata traseira, 24 horas após o término dos 8 dias de tratamento para obtenção do sangue e retirada de órgãos. Após obtenção do soro foram realizadas as dosagens séricas de glicemia, ureia, transaminases (TGO, TGP), creatinina, triglicerídeos, fosfatase alcalina, ácido úrico, colesterol total e suas frações (HDL, LDL e VLDL). Os soros foram imediatamente enviados para análise no laboratório Central do Hospital das Clínicas- UFPE, através do aparelho AU680 ChemistryAnalyzer, analisador de dosagens bioquímicas que utiliza sistema analítico químico totalmente automatizado.

Para retirada dos órgãos, os animais foram submetidos a laparotomia mediana, onde foram coletados o fígado, rins, coração, gordura retroperitoneal/gonadal/abdominal e estômago para serem pesados em balança eletrônica digital, marca Marte (modelo ASF11). Coração, fígado e rins foram fixados em formol tamponado a 10%, desidratados em etanol, diafanizados em xilos e processados convencionalmente para estudo em microscopia de luz (campo aberto). Os cortes foram obtidos na espessura de aproximadamente 4 µm, corados pela hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori, montados em Entellan e fotografados em Microscópio Olympus BX-50.

Os dados foram registrados em planilhas do programa excel para subsequente análise. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de KolmogorovSmirnov. Com a finalidade de verificar diferenças nos valores médios e entre grupos, foram utilizados os testes estatísticos, segundo o efeito dos fatores testados, *Oneway* ou *Two-Way* de medidas repetitivas (ANOVA RM), seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni quando detectada diferença entre os grupos. O teste "t" de student pareado foi realizado para verificar diferenças quando cada grupo era controle de si próprio. Utilizou-se o programa estatístico GraphpadPrism 6.0 (GraphPad Software inc., La Jolla, CA, USA). Todos os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$.

RESULTADOS

O acompanhamento do peso corporal em função da redução da ninhada e da dieta mostrou que a partir do 15º dia de vida o GO apresentou maior peso corporal e este foi mantido até o desmame (Figura 1A). Ao continuar com a dieta, a diferença observada ao desmame, decorrente da ninhada reduzida, não permaneceu; mas, voltou a ser significativa nos grupos da dieta ocidentalizada a partir da 11ª semana de acompanhamento, com manutenção da diferença até antes de iniciar os tratamentos com os respectivos compostos, sibutramina e EGCG. A diferença de peso corporal observada entre os grupos ocidentalizados comparados ao controle foi em torno de 20%, revelando a eficácia a do modelo dietético na indução da obesidade (Figura 1B, $p < 0,05$). E nos dias de uso da EGCG (OEGCG) e Sibutramina (OSIB), os pesos corporais foram reduzidos significativamente comparados ao OSAL e se igualando ao CSAL (Figura 3A).

Diferenças de medidas murinométricas entre os grupos com dieta ocidentalizada não foram observadas antes do tratamento. Porém, a administração por oito dias das drogas sibutramina e EGCG revelou significativa redução de peso nos grupos tratados (OSIB e OEGCG) (Figura 1C). Quanto ao IMC, os resultados demonstram que antes dos tratamentos os grupos ocidentalizados (OSAL, OSIB e OEGCG) tinham IMC significativamente maior que o CSAL e, após o tratamento, os grupos OSIB e OEGCG, apresentaram IMC significativamente menor que o controle obeso OSAL. Além disso, foi observada redução no perímetro torácico do grupo OEGCG quando comparado ao OSAL e redução na circunferência abdominal. No entanto, apesar das reduções observadas, a razão entre as circunferências abdominal e torácica não diferiram entre os grupos após o tratamento (CSAL=1,07±0,03; OSAL=1,09±0,03; OSIB=1,07±0,06 e OEGCG=1,05±0,03, $P=0,28$) provavelmente decorrente de ambas as medidas terem reduzidas ou terem permanecido elevadas, como no grupo OSAL. O controle da ingestão alimentar mostrou-se bastante irregular nos grupos com dieta ocidentalizada durante todo o período, provavelmente decorrente da diversidade de dietas oferecidas.

Na semana do tratamento ocorreu acentuada redução da ingestão alimentar nos animais que fizeram uso de sibutramina e EGCG em relação aos seus respectivos controles salina (CSAL e OSAL) (Figuras 2D e 2B) e, o consumo acumulado revelou que o grupo CSAL ingeriu maior quantidade de alimentos do que os grupos com dieta ocidentalizada (Figura 2C).

A diminuição da ingestão alimentar foi vista logo nos primeiros dias de tratamento e mantida até o oitavo dia. A comparação no mesmo grupo antes e depois da intervenção com salina ou fármaco demonstra a acentuada redução da ingestão média semanal nos grupos tratados. Os valores se situaram em torno de 62% para OSIB e 68% para OEGCG, mas,

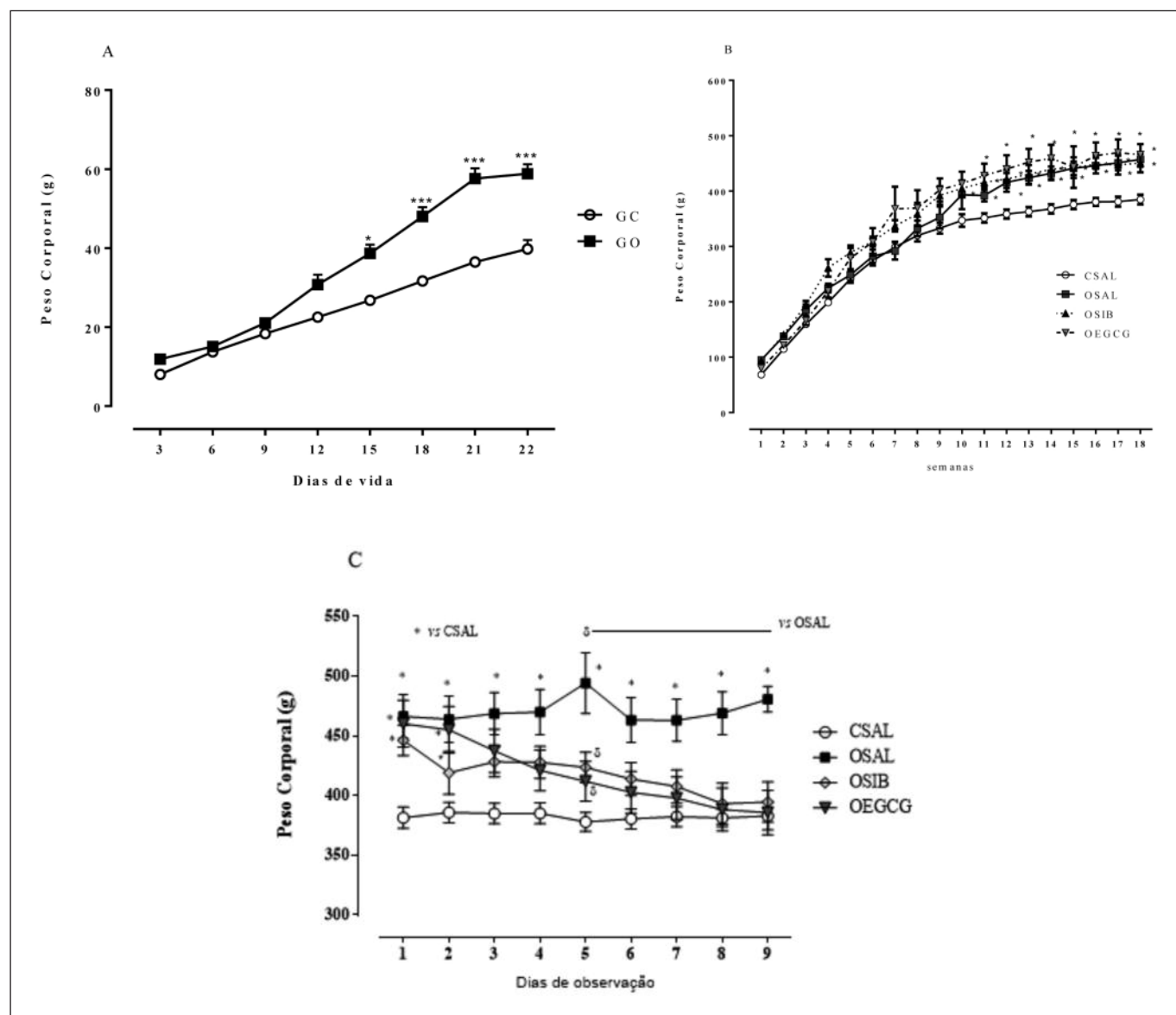
sem diferenças entre os grupos salinas (CSAL e OSAL). Assim a ingestão alimentar durante os 8 dias de tratamento mostrou-se bastante reduzida nos grupos tratados comparados aos controles salinas (CSAL_{antes}=357,0±51,8g; CSAL_{depois}=322,0±26,1g; OSAL_{antes}=278,0±26,9g, OSAL_{depois}=237,5±74,0g; OSIB_{antes}=260,2±28,9, OSIB_{depois}=98,3±28,7g; OEGCG_{antes}=310,8±26,1, OEGCG_{depois}=99,3±19,3g).

Em função de não serem observadas alterações nas dosagens de ALT, AST, uréia e creatinina entre os grupos, sugere-se que não houve alterações nem na função hepática

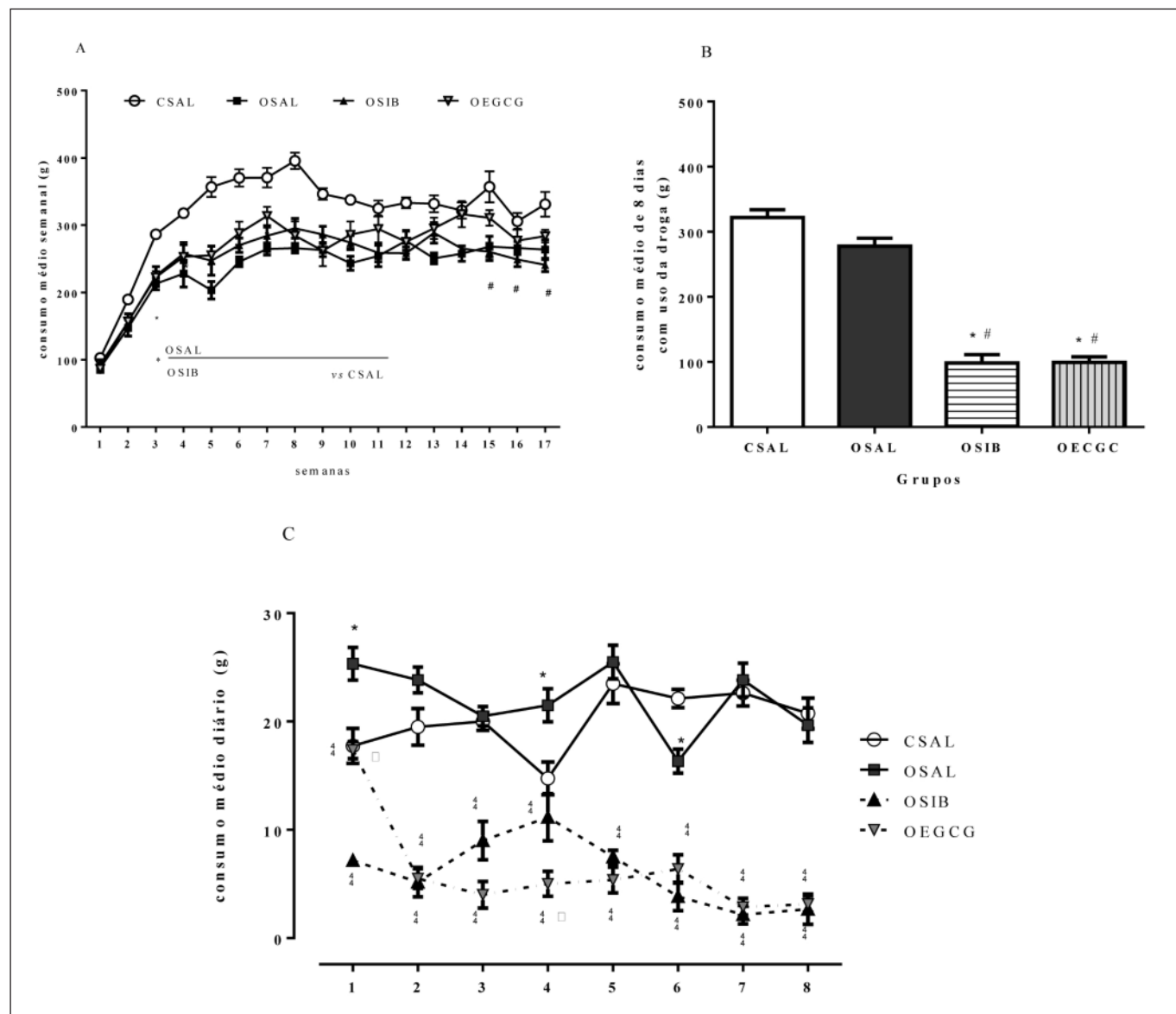
renal em nenhum grupo do estudo. Porém, ocorreu aumento nas dosagens de triglicerídeos e VLDL-c no grupo OEGCG, assim como aumento de depósito de gordura em região gonadal, retroperitoneal e abdominal (Tabela 1). Nos demais grupos, apenas a gonadal ou a retroperitoneal mostraram-se elevadas de modo que no total não diferiu do controle (CSAL).

O estudo histológico não mostrou diferenças estruturais entre os cortes de coração e rins em todos os grupos analisados (dados não mostrados). Entretanto, nos animais do grupo CSAL, o fígado, apesar de mostrar estrutura hepática

Figura 1. Peso corporal dos animais submetidos à manipulação de ninhada e dietética, durante a lactação.



(A), do desmame até a 18ª semana (B) e durante o tratamento com as duas drogas (C): Grupos: CSAL dieta controle salina (n=8 animais); OSAL, dieta ocidentalizada salina (n=8 animais); OSIB, dieta ocidentalizada e sibutramina (n= 8 animais) e OEGCG, dieta ocidentalizada e epigallocatequina-3-galato (n=8 animais). Valores expressos em média ±EPM Para comparação dos grupos foi usada *twowayRM* ANOVA (A,B,C,) seguido do pós teste de Bonferroni. * vs GC/CSAL; δ vs OSIB; (* δ p<0,05).

Figura 2. Ingestão alimentar segundo os tratamentos: durante 17 semanas de seguimento.

(A) ingestão média de alimento ingerido nos 8 dias de tratamento (B) e o acompanhamento diário da ingestão alimentar na semana de tratamento (C). Grupos: CSAL, dieta controle salina (n=8 animais); OSAL, dieta ocidentalizada salina (n=8 animais); OSIB, dieta ocidentalizada e sibutramina (n= 8 animais) e OEGCG, dieta ocidentalizada e epialocatequina-3-galato (n=8 animais). Valores expressos em média \pm EPM. Para comparação dos grupos foi usada *oneway*ANOVA (E) ou *twoway*RM ANOVA (AD,F) seguido do pós teste de Bonferroni. *vsCSAL; #vs OSAL δ vs OSIB; (* δ #p<0,05).

bem conservada, revelou leve grau de esteatose (Figura 3A). Nos animais dos grupos OSAL e OSIB observou-se maior grau de esteatose que no grupo CSAL e presença de infiltrado inflamatório entre os cordões hepáticos e nos espaços portais (Figuras 3B e 3C). Já no grupo OEGCG, a esteatose mostrou-se pouco evidente e houve ausência de infiltrado inflamatório (Figura 3D). As observações dos espécimes corados com o tricrômico de Gomori não revelou alteração na organização do tecido estromal, com distribuição homogênea na vascularização e na matriz colágena interlobular.

DISCUSSÃO

A redução da ninhada na lactação promoveu significativo aumento de peso nos animais até o desmame, concordando com trabalhos prévios^{14,15}. Em animais de experimentação, diferentemente da população humana, a gênese da obesidade está diretamente implicada com uma variedade de mutações genéticas, determinando a predominância dessas sobre os fatores ambientais¹⁶⁻¹⁸, dificultando a obtenção da obesidade em laboratório. Diante disso, utilizamos uma combinação de modelos de indução de obesidade desde o início

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos e peso de órgãos úmidos de ratos submetidos à manipulação de ninhada e dietética, após tratamento (salina ou farmacológica) durante 8 dias consecutivos.

Parâmetros Bioquímicos e peso de órgãos	CSAL (n=8)	OSAL (n=8)	OSIB (n=8)	OEGCG (n=8)	P Valor
Glicose	170,3 ± 9,2	166,1±12,4	171,1±12,4	158,1 ± 8,2	=0,802
Ureia	33,4 ± 1,5	37,2 ± 2,3	34,3 ± 1,9	31,18 ± 2,1	=0,199
Creatinina	0,3± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	=0,111
TGP/ALT	51,7±2,7	43,4±1,7	44,7± 2,2	46,3± 4,5	=0,282
TGO/AST	152,0±10,1	142,3±10,4	174,1±13,2	175,2±12,0	=0,134
Fosfatase Alcalina	180,5±18,2	164,6±18,7	121,5±13,8	169,3±14,8	=0,122
Triglicerídeos	39,8 ± 5,3	33,8 ± 2,7	39,0 ± 2,9	80,9±9,0*	<0,000
Colesterol Total	58,6 ± 5,9	63,1 ± 3,2	50,4 ± 4,4	58,8 ± 5,6	=0,396
HDL- Colesterol	37,5 ± 2,2	36,5 ± 2,0	30,4±3,3	36,9 ± 3,7	=0,307
LDL- Colesterol	18,0 ± 5,42	22,0± 3,3	11,4 ± 2,1	13,9 ± 1,4	=0,219
VLDL – Colesterol	7,37 ± 1,1	6,4 ± 0,2	7,3 ± 0,3	16,1±1,8*	<0,000
Fígado	2,5±0,1	2,6 ± 0,1	2,7 ±0,0	2,8 ± 0,2	=0,35
Coração	0,4±0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ±0,0	0,4 ± 0,0	=0,34
Estômago	0,4±0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ±0,0	0,4 ± 0,0	=0,37
Rim direito	0,4±0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ±0,0	0,4 ± 0,0	=0,76
Gordura gonadal	1,4±0,3	2,7 ±0,0*	2,7 ±0,2	2,0± 0,4*	<0,00
Gordura Retroperitoneal	2,0±0,4	2,6 ± 0,4	3,3 ±0,4*	3,2 ± 0,6*	<0,05

Grupos: com dieta controle salina (CSAL, n=8) dieta ocidentalizada salina (OSAL, n=8) dieta ocidentalizada e sibutramina (OSIB, n=8) e dieta ocidentalizada e epialocatequina-3-galato (OEGCG, n=8). Valores expressos em média ±EPM. Os parâmetros bioquímicos foram expressos em mg/dl e o peso de órgãos úmidos analisados em g/100g de peso corporal. Para comparação entre os grupos foi usado o teste *oneway* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. *vs CSAL.

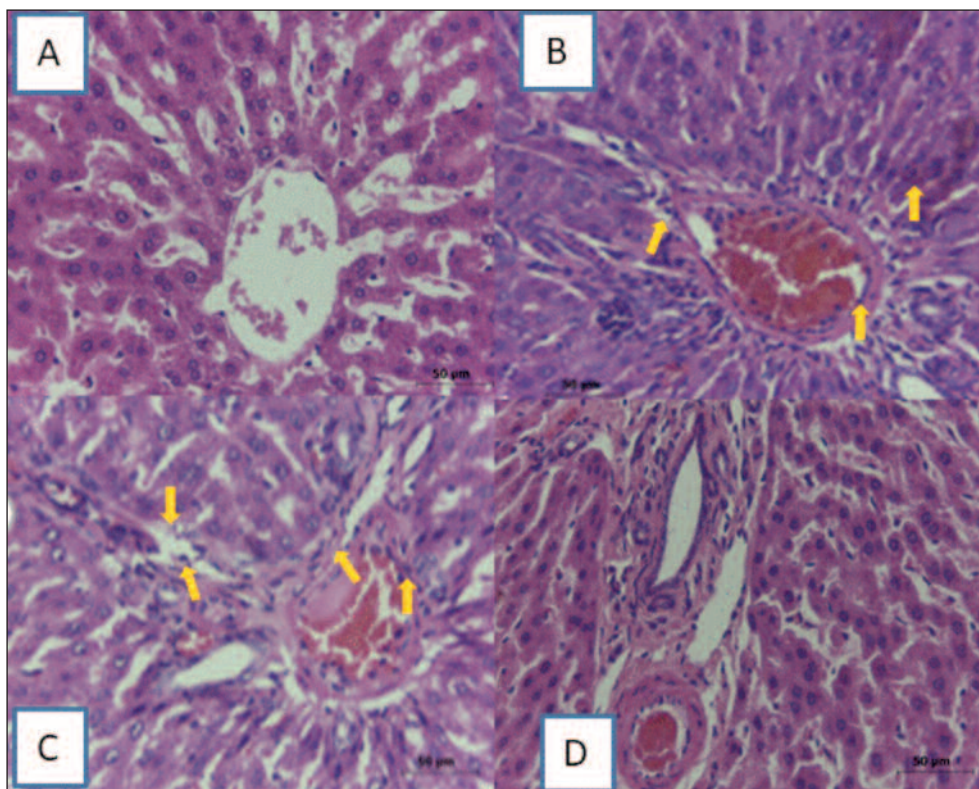
da vida. Ao final, conseguiu-se reproduzir uma relevante diferença de peso em todos os grupos alimentados com dieta ocidentalizada comparada ao controle, quando analisados a quantidade de gordura gonadal, nível de triglicerídeos séricos, presença de esteatose e análise do infiltrado hepático.

A indução de obesidade persistente pelos modelos de redução da ninhada gera controvérsias entre os estudos. Xiao et al. (2007)¹⁹, estudando o efeito de superalimentação sob o tecido adiposo, no período perinatal de ninhada normal e reduzida, submetidas ao frio, encontraram menor termogênese na gordura marrom e que este mecanismo pode aumentar a susceptibilidade de obesidade na idade adulta. Por outro lado, Nery et al.(2011)²⁰, com o mesmo modelo de promoção de obesidade por redução da ninhada, também não encontraram persistên-

cia da obesidade com o avanço da idade. Alguns motivos que explicam a não manutenção do ganho de peso após o desmame podem ser sugeridos pela redução na taxa específica ou velocidade de ganho de peso com o avançar da idade¹⁹, a retirada do leite materno e/ou a ocorrência da maturidade hipotalâmica levando à saciedade fisiológica do animal adulto. Contudo, mais estudos são necessários para responder as dúvidas quanto aos possíveis mecanismos envolvidos.

No entanto, mesmo após um período de ausência de diferença de peso corporal, o modelo combinado após o desmame (dieta ocidentalizada alternada com a dieta padrão, mais o uso de sacarose a 10% na água de hidratação) causou nos grupos OSAL, OSIB e OEGCG maior peso corporal, e, ao final das 16 semanas, alterações nos perímetros corporais.

Figura 3. Fotomicrografias do fígado de animais submetidos a manipulação de ninhada e dietética após tratamento com solução salina ou droga.



A = GC salina; B = GO salina; C = GO sibutramina e D = GO epiallocatequina-3-galato. Presença de infiltrado gorduroso intenso nos grupos OSAL e OSIB. Os grupos CSAL e OEGCG com esteatose insipiente e sem nichos linfocitários. Setas apontam esteatose hepática e locais de infiltrado linfocitário. Todos os grupos apresentaram arquitetura hepática conservada. Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), observados pela objetiva de 40x.

A elevação do peso foi o parâmetro elegível para compararmos a eficiência do fármaco testado (EGCG) em relação ao uso de sibutramina.

No presente estudo, tanto a sibutramina quanto a EGCG foram eficientes em reduzir o peso em 12 e 16% respectivamente ao peso inicial dos grupos, em apenas 1 semana. O estudo de Kao et al. (2000)²¹ mostrou resultados semelhantes com o uso de EGCG, na dose de 15mg de 2 a 7 dias por via intraperitoneal, em ratos da raça *Sprague Dawley*, com e sem obesidade. Houve extrema perda de peso, com valores próximos a 50% do peso inicial, e queda no consumo alimentar, que se aproximou de 60%. Os resultados obtidos se assemelham ao estudo citado visto que o fármaco reduziu o apetite em cerca de 60% para o grupo OSIB e de 70% para o grupo OEGCG comparando com a ingestão dos mesmos grupos antes do período de uso dos fármacos. Estudo prévio mostrou que o uso de extrato da planta *Camellia sinensis* em ratos causa redução no consumo alimentar com consequente perda de peso²¹. Porém, no extrato encontram-se vários princípios ativos associados o que dificulta a comparação com os possíveis mecanismos que possam ter ocorrido em

virtude de termos utilizado a substância pura (EGCG) e não o extrato da planta.

Contrário a esses achados, Choo (2003)²² defende que a perda de peso, nos animais tratados com EGCG, decorre de outros mecanismos metabólicos, não sendo a redução de ingestão alimentar algo preponderante. Os mecanismos moleculares comprometidos na atuação da EGCG no combate a obesidade incluem a redução da lipogênese através de possível envolvimento com modulação mitótica da proteína quinase (MAP), principalmente através de sinais regulatórios^{21,23}. Esses sinais atuariam o fator de crescimento envolvido em processos mitogênicos, suprimindo, assim, a proliferação de pré-adipócitos^{21,22}. Ademais, o fármaco teria participação na inibição da catecol-O-metiltransferase (COMT), complexo enzimático responsável pela gradação de noradrenalina, o que levaria a um aumento da estimulação simpática em receptores beta

adrenérgicos presentes nos adipócitos, com aumento da termogênese^{23,24}. Além disso, atribui-se a ela uma ação na regulação da absorção de gorduras e açúcares através de bloqueio de algumas enzimas a nível intestinal, como a amilase e lipase pancreática²⁵.

Uma limitação desse estudo foi a não realização de estudos moleculares, visto que a maioria dos estudos com EGCG purificada são realizados em nível de metabolismo celular com análise biomolecular de proteínas envolvidas em processos de lipogênese¹¹, o que dificulta uma discussão mais incisiva com o presente trabalho. No entanto, a regulação do apetite, com diminuição da ingestão alimentar, nos ratos após ingestão da EGCG pode sugerir um mecanismo indireto. A oxidação de ácidos graxos no fígado e produção de ATP influenciam diretamente o apetite por regular os centros cerebrais envolvidos no controle alimentar¹⁴. As catequinas do chá verde parecem estar envolvidas na regulação da expressão de diversos compostos metabólicos como PPAR- γ , C/EBP- α , SREBP-1c, aP2, LPL e FAS levando a sua redução no tecido adiposo branco e aumentando os níveis de expressão de mRNA da CPT-1, UCP2, HSL E ATGL²⁶. Em

adendo, a EGCG parece ter importante papel na apoptose de adipócitos maduros, podendo esses serem os mecanismos envolvidos, isoladamente ou associados, que repercutem nos achados observados.

A presença de maior gordura gonadal no grupo EGCG indica um aumento da gordura visceral geralmente mais resistente à redução que a gordura subcutânea²⁴. Esse achado leva a crer que talvez tenha ocorrido remoção primária da gordura subcutânea em detrimento da visceral. Há quem defenda que a massa gorda em animais obesos pode ser removida, durante o emagrecimento, de maneira diferenciada nos variados tecidos²⁸. Este fato corrobora com a redução das medidas do perímetro torácico observado no grupo tratado, priorizando a subcutânea em detrimento da visceral. O grupo OEGCG também apresentou aumento de triglicerídeos e VLDL-c, onde tais achados divergem do relatado na literatura, tendo em vista que as catequinas, em especial a EGCG, tem sido descrita como capaz de reduzir substancialmente os níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol LDL, tanto em modelo animal como em humanos obesos²⁹. Contudo, é relevante lembrar que esses parâmetros não se mostram alterados no grupo não tratado. Um motivo para essa não modificação no grupo ocidentalizado sem tratamento pode ter sido em função dos animais se alimentarem alguns dias da semana com a dieta padrão que possui um teor nutricional mais adequado para manutenção de taxas sanguíneas normais em roedores.

Há relatos de que o chá verde provoca alterações hepáticas, porém, possivelmente, isto ocorre com o uso de chás ou extrato da planta, diferindo do presente estudo que utilizou a substância pura. Um resultado de destaque desse estudo refere-se ao efeito da EGCG na manutenção com preservação da função hepática e renal. Foi observado um padrão histológico pouco evidente de esteatose no grupo EGCG e ausência de processo inflamatório, não ocorrendo o mesmo com os demais grupos obesos. A EGCG poderia ter promovido redução de danos hepáticos, decorrente do acúmulo de gordura, pelo seu poder antioxidante, ou mesmo ter impedido o acúmulo dos mesmos. Nossos achados corroboram com os de Schmitz e colaboradores (2005)³⁰ que demonstraram atividade hepatoprotetora do extrato alcoólico da *Camelliasinensis* em fígados de ratos lesados pelo dietilnitrosamina (DNT), em diferentes momentos, mostrando sua importante ação, principalmente de forma preventiva da ocorrência de lesões hepáticas. Achados de normalidade renal e cardíaca sugerem neutralidade para os dois fármacos em nível histológico.

CONCLUSÃO

A EGCG foi capaz de promover redução do consumo alimentar e do peso corporal em ratos e o fez na mesma intensidade da sibutramina. Estudos histológicos não deixaram dúvidas quanto a sua ação benéfica na não ocorrência de esteatose hepática e esteato-hepatite produzida pelo modelo

dietético utilizado. Estudos bioquímicos e histológicos não refletiram toxicidade com o uso da substância. Contudo, o aumento das concentrações de triglicerídeos e VLDL-c, não eram esperados, necessitando de investigações adicionais. Em suma, conclui-se que a EGCG pode ser usada como via natural alternativa ao uso de fármacos na tentativa da perda ponderal, visto que mostrou ser eficaz no emagrecimento de ratos. No entanto, mais estudos, que elucidem mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos sobre a perda de peso corporal, são necessários.

BIBLIOGRAFIA

- Rodrigo-Cano S, Soriano del Castillo JM, Merino-Torres JF. Causas y Tratamiento de La obesidad. Nutr. Clín. Diet. Hosp. (2017); 37(4):87-92.
- Lamarão RC, Fialho E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e suas relações. Rev Nutr. (2009); 22(2): 257-69.
- Associação Brasileira Para o Estudo Da Obesidade e Da Síndrome Metabólica. Anvisa Retira Anorexígenos e Mantém Sibutramina. 2011. [Acesso em: 28 jan. 2017] Disponível em: <http://www.abe-so.org.br/noticia/anvisa-retira-anorexigenos-e-mantem-sibutramina>.
- Pergher RNQ, Melo ME, Halpern A, Mancini MC. Liga da Obesidade Infantil. O diagnóstico de síndrome metabólica é aplicável às crianças? J Pediatr. (2010); 86 (2): 101-8.
- Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Nova regulamentação técnica de anorexígenos. Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC). 2011. [Acesso em 28 jan. 2017]. Disponível: http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3137431.
- Sociedade Brasileira De Cirurgia Bariátrica e Metabologia. Cirurgia de redução de estômago cresce junto com peso do brasileiro. 2011. [Acesso em: 11 dez. 2017]. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/noticia/saude/cirurgia-de-reducao-de-estomago-cresce-junto-com-peso-do-brasileiro>.
- Morillas-Ruiz JM, Delgado-Alarcón. Análisis nutricional de alimentos vegetales com orígenes: evaluación de capacidad antioxidante e compuestos fenólicos totales. Nutr. Clín. Diet. Hosp. (2012); 32 (2): 8-20.
- Leão MFM, Duarte JÁ, Schmitt EG, Quintana LD, Zambrano LAB, Rocha MB. et al. Avaliação da eficiência de extração dos polifenóis de amostras de chá através de métodos domésticos. (Eletronic) J Pharm. (2016); 13(2):82-8.
- Han DW, Park YH, Kim KK, Lee KY, Hyon SH, Suh H. et al. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. J Biotechnol. (2004); 110:109-17.
- Ahmad RS, Butt MS, Sultan MT, Mushtaq Z, Ahmad S, Dewanjee S. et al. Preventive role of green tea catechins from obesity and related disorders especially hypercholesterolemia and hyperglycemia. J Transl Med. (2015); 13:79.

11. Chen D, Wang CY, Lambert JD, Ai N, Weish WJ, Yang CS. Inhibition of human liver catechol-o- methyl transferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and molecular-modeling studies. *BiochemPharmacol.* (2005); 69 (1): 523-31.
12. Cavalcante TCF, Silva JML, Silva AAM, Muniz GS, Neto LMN, Souza SL. et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids.* (2013); 48 (11):1157-68.
13. Novelli L, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, ManiF. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* (2007); 41 (1):111-19.
14. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* (1999); 836 (31): 146-55.
15. Mcmillen IC, Adam CL, Muhlhauser BS. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol.* (2005); 5(565): 9-17.
16. Malafaia AB, Nassif PAN, Ribas CAPM, Arieide BL, Sue KN, Cruz MA. Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arq Bras Cir Digest.* (2013); 26 (1):17-21.
17. Pereira LO, Francischi RP, Lancha-Jr AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *ArqBras-Endocrinol&Metabol.* (2003); 47 (2):111-27.
18. Souza SL, Castro RM, Nogueira MI. Comportamento alimentar neonatal. *RevBrasSaúdMatern Infant.* (2003); 3:241-6.
19. Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smiths MS. et al. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinol.* (2007); 148 (9):4150-9.
20. Nery CS, Pinheiro IL, Muniz GS, Vasconcelos DAA, França SP, Nascimento E. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhada reduzida na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Rev Bras Med Esp.* (2011);17 (1):49-55.
21. Kao YH, Hiipakkara RA, Liao S. Modulation of Endocrine Systems and Food Intake by Green Tea Epigallocatechin Gallate. *Endocrinol.* (2000); 141 (3): 980-7.
22. Choo JJ. Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through beta-adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue. *J NutrBiochem.* (2003); 14 (11): 671-6.
23. Dullo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin polyphenols caffeine and sympathetic activity. *Intern J ObesMetabol Dis.* (2000); 24 (2):252-58.
24. Lin J, Della-Fera MA, Bayle CA. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes Res.* (2005); 13 (6): 982-90.
25. Hung PF, Wu BT, Chen HC, Chen YH, Chen CL, Wu MH. et al. Antimitogenic effect of green tea - epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways. *Am J Physiol Cell.* (2005); 288:1094-108.
26. Kamphuis MM, Mela DJ, Westerterp-Plantenga MS. Diacylglycerols affect substrate oxidation and appetite in humans. *Am J Clin Nutr.* (2003); 77:1133-9.
27. Lee MS, Kim CT, Kim Y. Green tea - epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet - induced obese mice. *Ann NutrMetabol.* (2009); 54 (2):151-7.
28. Nakazato K, Song H, Waga T. Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in Wistar rats. *Exp Anim.* (2006); 55(4):383-9.
29. Souza AFM. Hepatotoxicidade por chás. *GED.* (2011); 30 (1): 06-47.
30. Schmitz OS, Cecchini R, Eestevão D, Sardirakis HO. Atividade hepatoprotetora do extrato alcoólico da *Camelliasinensis* (chá-verde) em ratos Wistar tratados com dietilnitrosamina. *RevBrasFarmacog.* (2005); 19 (3):702-9.