Doctor
José Luis Salazar López
Director de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-153451- -00010-0000
Fecha: 2015-01-14 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 105-109

Asunto:	**Radicación No.:**	**13-153451**
	Trámite:	**11**
	Evento:	**379**
	Actuación:	**519**
	Oficio No.:	**10831**
	Referencia:	**Respuesta Oficio de Fondo**

MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO, abogado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 80.421.942 de Bogotá y con la tarjeta profesional No. 74.555 del Consejo Superior de la Judicatura, en calidad de apoderado del solicitante **LABORATORIOS SENOSIAIN S.A DE C.V.**, doy respuesta al **Oficio No. 10831,** de conformidad con el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y de acuerdo con los siguientes argumentos:

1. **<u>Reivindicaciones:</u>**

Antes de abordar las objeciones elevadas en el Informe Técnico que se contesta, me permito aclarar que en este acto se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio, en donde hemos delimitado el alcance de las reivindicaciones presentadas en la solicitud, tal como se explica a continuación:

a) Se ha eliminado la reivindicación 1, con lo cual toda referencia a un método de tratamiento ha quedado eliminada del capítulo reivindicatorio;
b) Se han eliminado las reivindicaciones 3-8;
c) Se modifica la anterior reivindicación 2 (ahora reivindicación 1) sustituyendo el término "combinación" por "composición" y se indica la proporción de orlistat y resveratrol que proporciona un efecto técnico inesperado;
d) Se agrega una nueva reivindicación 2 que especifica la conformación de la composición reclamada y los diferentes excipientes;

2

2

e) Se modifica la anterior reivindicación 9 (ahora reivindicación 3) a fin de especificar con mayor detalle cada una de las etapas del proceso; y
f) Se modifica la dependencia de las reivindicaciones.

Vale la pena anotar que las enmiendas al capítulo reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión de la Comunidad Andina de Naciones, ya que estas no implican de ninguna manera una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial, ni se pretende proteger materia distinta de la reivindicada originalmente.

El Examinador señala en el numeral 5 del Informe Técnico, que el objeto de las reivindicaciones 1, 2, 7 y 8 no es patentable de acuerdo con el Art 20 literal (d) de la Decisión 486 de la Comunidad Andina debido a que el término "combinación" abarca la administración secuencial de los agentes (activos) los cuales pueden encontrarse en composiciones independientes (reivindicación 8), y que esto se encuentra relacionado con un método de tratamiento, lo cual es ratificado por la solicitante en la caracterización de la reivindicación 1 al momento de indicar que es para el tratamiento de padecimientos de sobrepeso, obesidad y problemas de la salud.

Con el ánimo de superar las objeciones planteadas, mi mandante ha eliminado del capítulo reivindicatorio cualquier expresión relativa a métodos de tratamiento y "combinación farmacéutica". Cabe agregar que Examinador únicamente ha objetado las reivindicaciones 1, 2, 7 y 8 como excluidas de patentabilidad, por lo tanto la materia objeto de las reivindicaciones 3-6, a saber, una composición farmacéutica, no debe considerarse como excluida de patentabilidad. Por lo tanto, mi mandante considera que se las objeciones elevadas en el numeral 5 del Informe Técnico, han quedado superadas.

2. <u>Título:</u>

Con respecto a la objeción elevada por el Examinador en el numeral 6 del Informe Técnico, sobre la falta de claridad del título de la solicitud, mi

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

mandante desea modificar el título para quedar como: "COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE ORLISTAT Y RESVERATROL".

3. <u>Examen de patentabilidad: Novedad y Actividad Inventiva</u>

El Examinador menciona en el numeral 6 del Informe Técnico, que la reivindicación 3 es dependiente de la 1 lo cual no es aceptable toda vez que pertenecen a clasificaciones diferentes. Al respecto, me permito aclarar que, puesto que la reivindicación 3 se ha eliminado y la reivindicación 1 se ha modificado para quedar en la categoría de composición, la objeción resulta improcedente.

El Examinador menciona en el numeral 8 que la presente solicitud se encuentra anticipada por los documentos WO2007008548 (en lo sucesivo D1); US20100196464 (en lo sucesivo D2); y US20060153889 (en lo sucesivo D3).

Asimismo, en el numeral 9 del Informe Técnico el Examinador agrega que la reivindicación 3 carece de nivel inventivo a la luz del arte previo arriba citado, identificando al documento D1 como el estado de la técnica más cercano. Este documento enseña una composición farmacéutica que comprende un agente activador de sirtuina el cual es preferiblemente resveratrol y sugiere la posibilidad de que la composición comprenda un agente antiobesidad o hipolipemiante, proponiendo como una posibilidad al orlistat.

El Examinador menciona, además, que la diferencia entre la invención definida en la anterior reivindicación 3 y la composición de D1 consiste en que la anterioridad no presenta un ejemplo específico que comprenda orlistat y resveratrol de manera conjunta, concluyendo que esta diferencia no parece conceder un efecto técnico inesperado o una ventaja a la composición reclamada.

Al respecto, nos permitimos aclarar que la invención reclamada presenta diversos efectos técnicos inesperados o sorprendentes, a saber, un efecto

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

sinérgico para reducción de peso, un efecto sobre la presión sanguínea y un efecto sobre las transaminasas hepáticas. Todos estos se explican con detalle a continuación.

A. Efecto Sinérgico

El estudio preclínico se realizó en ratas a las cuales se les indujo el estado de obesidad y posteriormente recibieron diversos tratamientos. El Grupo 3 recibió solamente orlistat; el Grupo 4 recibió solamente resveratrol; los grupos 5 y 6 recibieron la combinación reclamada orlistat-resveratrol en diferentes proporciones (1mg/5mg y 1.7mg/10mg, respectivamente). Se evaluó la reducción de peso a las tres semanas. En la figura 2 de la presente solicitud se muestran los resultados comparativos, demostrando que la combinación orlistat-resveratrol en proporción 1.7/10 es eficaz en la reducción de peso, en comparación con la administración por separado de orlistat y resveratrol. Existe una menor ganancia de peso (35.03%) con la combinación 1.7/10 que con la combinación 1/5 (40.74%).

El Examinador considera que los resultados presentados por la solicitante no permiten evidenciar un efecto sinérgico, ya que las figuras 2 y 3 no representan resultados estadísticamente válidos que sustenten dicha afirmación. El Examinador agrega que la evaluación de sinergismo debe basarse en diseños experimentales, siendo los isobologramas la metodología más utilizada.

El solicitante considera que no se requiere de análisis isobolográfico para sustentar estos resultados, debiendo ser suficiente la evidencia obtenida del estudio preclínico, ofreciendo para ello la siguiente explicación:

Existen diversos abordajes que se pueden emplear para demostrar la interacción positiva (sinergismo o potenciación) entre dos fármacos (ver Anexo I, de Chen et al., "The Evaluation of Drug Combinations", Horizon Precision Genome Editing).

Un primer abordaje asume que un fármaco teóricamente no activo es capaz de potenciar o sinergizar el efecto de otro activo en el modelo experimental. Bajo esa perspectiva, se espera que la presencia del producto "inactivo" desplace a la izquierda la curva dosis-respuesta del producto activo. Una forma simplificada de ese abordaje es evaluar a una sola dosis el efecto del producto activo en ausencia (control) y presencia del producto inactivo; entonces un

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

resultado significativamente mayor en el efecto de la combinación se interpreta como una potenciación o sinergismo. Los Anexos II y III (Unal et al., Korean J Physiol Pharmacol, Vol. 17:417-422, 2013 y Galeotti et al., J Pharmacol Sci 124, 409-417, 2014) presentan ejemplos de tal abordaje y son publicados en revistas científicas de circulación internacional. Este tipo de abordaje fue el empleado en la investigación presente, ya que para el tiempo en que se realizó no se conocía que el resveratrol por sí mismo pudiese tener efecto en la reducción de peso, mientras que el orlistat sí.

El otro abordaje está basado en el análisis isobolográfico, que asume que ambos fármacos son activos, y está limitado a que las curvas dosis-respuesta presenten paralelismo, por lo cual no se consideró apropiado para investigar la interacción entre orlistat y resveratrol.

B. Disminución de la Presión

Se observa en las figuras 4A a 4C de la presente solicitud que ocurre una disminución de la presión arterial de los animales tratados con la combinación orlistat-resveratrol, particularmente la combinación orlistat 1.7 mg/Kg y resveratrol 10 mg/Kg (ver página 19, líneas 16-19 de la descripción). Este efecto resulta definitivamente sorprendente para una persona versada en la materia, ya que es sabido que uno de los efectos adversos de orlistat es el aumento de la presión sanguínea (ver por ejemplo el documento Yun, J .W. et al., "Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review", Phytochemistry, pp. 1625-1641.) En particular, las páginas 1625 y 1626 de Yun et al. indican que existen dos diferentes tipos de fármacos para tratar la obesidad, uno de ellos es orlistat y el otro sibutramina, agregando que ambos fármacos tienen efectos secundarios incluyendo el aumento de la presión sanguínea. Con base en esta divulgación, la persona versada en la materia definitivamente no esperaría con una expectativa razonable de éxito el obtener una composición que reduzca la presión sanguínea al incluir orlistat dentro de la composición. Sorprendentemente, el efecto indeseable sobre el incremento de la presión que tiene orlistat se evita cuando se administra una composición con orlistat y resveratrol. Cabe aclarar que este efecto inesperado sobre la presión sanguínea no necesariamente corresponde a un efecto sinérgico o de potenciación. De manera que el solicitante considera que no se requiere de

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

análisis isobolográfico para sustentar estos resultados, debiendo ser suficiente la evidencia obtenida del estudio preclínico.

C. Efecto sobre las transaminasas hepáticas

Otro efecto terapéutico inesperado positivo de la composición que contiene los dos principios activos orlistat y resveratrol. En particular, respetuosamente se solicita al Examinador referirse a la Figura 6 y a la página 20 de la descripción, en donde se comprueba que una dieta alta en caloría no alteró la actividad de la transaminasa glutamica oxaloacética (TGO) y la transaminasa glutámico pirúvica (TGP), pero los tratamientos sí incrementaron los niveles de transaminasa. Las transaminasas hepáticas constituyen un indicador de efecto hepático adverso. La Figura 6 muestra niveles de transaminasa hepática elevados para las ratas del Grupo 4 (resveratrol, 10 mg/kg), pero los niveles de transaminasa fueron menores con la combinación orlistat-resveratrol en las dos dosis (1/5 mg/Kg y 1.7/10 mg/Kg). Este efecto benéfico hepatoprotector de la invención reclamada es inesperado y definitivamente no podría inferirse del arte previo. Cabe aclarar que este efecto hepatoprotector inesperado no necesariamente corresponde a un efecto sinérgico. De manera que el solicitante considera que no se requiere de análisis isobolográfico para sustentar estos resultados, debiendo ser suficiente la evidencia obtenida del estudio preclínico.

En resumen, el solicitante ha demostrado fehacientemente que existe una menor ganancia de peso (35.03%) con una composición que contiene la proporción orlistat/resveratrol 1.7/10 que con la combinación 1/5 (40.74%). La proporción de orlistat/resveratrol 1.7/10 también proporciona otros efectos inesperados (efecto hepatoprotector y disminución de la presión sanguínea). Las reivindicaciones actuales contienen las características técnicas que permiten lograr los efectos inesperados antes descritos debido a que reclaman una composición con la proporción orlistat/resveratrol 1.7/10.

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

El Examinador añade que la actividad de orlistat como agente capaz de inhibir la absorción de grasa era ampliamente conocida y que la motivación para que la persona versada en la materia seleccionara orlistat como el agente antiobesidad en combinación con el resveratrol surge de las enseñanzas contenidas en D2. A este respecto deseamos aclarar que en el arte previo existen documentos que señalan los efectos secundarios adversos del orlistat (ver Anexo IV, Yun, J .W. et al., "Possible anti-obesity therapeutics from nature - A review", Phytochemistry, pp. 1625-1641). De acuerdo con el documento Yun et al., el orlistat tiene efectos secundarios peligrosos, incluyendo aumento de la presión sanguínea. Una persona versada en la materia tendría que considerar no sólo los documentos D1 a D3 sino todo el arte previo antes de diseñar una composición con determinados principios activos. Aunque los documentos D1 y D2 pudieran motivar a una persona a diseñar una composición de orlistat y resveratrol con el objetivo de tratar la obesidad, también es cierto que la persona versada en la materia esperaría un efecto adverso sobre la presión sanguínea por el uso del orlistat. Sin embargo, sorprendentemente, dicho efecto adverso se ve atenuado por la presencia de resveratrol.

De manera que existe un indicio importante que nos permite identificar la existencia de nivel inventivo, que consiste en el hecho de haber superado un prejuicio técnico anterior. En este caso, la invención supera el prejuicio técnico del documento Yun et al., ya que dicho documento llevaría a la persona con experiencia media en la materia en sentido contrario a la invención.

Ahora bien, suponiendo que la persona versada en la materia no tomara importancia a la divulgación de Yun et al., considerando los documentos citados, probablemente esperaría que la reducción en la ganancia de peso se logre con cualquier dosis de la combinación orlistat-resveratrol, pero en realidad, solamente la dosis 1.7/10 presenta efecto sinérgico. De hecho, el incremento en peso con esta dosis no fue significativamente distinto de la ganancia en peso observada con las ratas bajo una dieta estándar (dieta sana). No existe nada en los documentos del arte previo que permita a la persona versada en la materia a detectar las dosis eficaces para lograr el efecto técnico en la reducción de peso.

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

Otro indicio de la existencia de nivel inventivo radica en el carácter inesperado de los resultados obtenidos. Tanto el efecto sobre las transaminasas hepáticas, como la acción conjunta de ambos fármacos para evitar el incremento en la presión sanguínea, son efectos que la persona versada en la materia no podría elucidar. Un técnico con conocimientos medios en la materia no estaría en condiciones de prever estos resultados a la luz del arte previo.

Con respecto a la objeción de nivel inventivo elevada al proceso reclamado, mi mandante desea emplear el método problema-solución.

En la descripción de la solicitud se menciona que los dos principios activos orlistat y resveratrol implican problemas técnicos ya que el orlistat tiene consistencia cerosa y funde a temperaturas entre 40 y 44°C mientras que el resveratrol es un polvo. El bajo punto de fusión de orlistat complica considerablemente la elaboración de una forma farmacéutica oral con los dos ingredientes, ya que durante el proceso de fabricación se alcanzan temperaturas superiores a los 40°, lo que provoca la fusión del orlistat. Para resolver este problema técnico, la presente invención propone mezclar orlistat con excipientes seleccionados de derivados de celulosa, celulosa microcristalina, lactosa y almidón de maíz, calentar la mezcla, extruir dicha mezcla y formar esferas que comprenden orlistat, para después recubrirlas con una dispersión de resveratrol y un polímero seleccionado de hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona y hidroxipropilcelulosa.

Esta solución al problema técnico no había sido antes descrita o sugerida en los documentos del arte previo. El documento D2 divulga composiciones que comprenden orlistat en una cantidad de 120 mg y con un tamaño de partícula menor a 250 micras. En los párrafos [0084] 7 [0085] del documento D2 se menciona que se pueden preparar formas de dosificación sólidas en forma de tabletas, minitabletas, cápsulas, píldoras, gránulos, agregando que los excipientes pueden incluir diluentes, aglutinantes, desintegrantes, colorantes, lubricantes, solventes, deslizantes y humectantes. Los párrafos [0086] a [0096] proporcionan una lista sumamente extensa de excipientes que pueden emplearse para formar composiciones, sin embargo no es claro cómo una

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

persona versada en la materia podría seleccionar específicamente derivados de celulosa, celulosa microcristalina, lactosa o almidón de maíz, para mezclarse con orlistat y así formar las esferas de este principio activo.

Por su parte, el documento D3 en el párrafo [0029] señala un ejemplo de partículas con un primer depósito hidrofílico y un terminado polimérico hidrofóbico. El recubrimiento de la fase II contiene agua, resveratrol, extracto de levadura y una pluralidad de extractos de productos naturales (extracto de soya, extracto de semilla de café, etc.). El recubrimiento de resveratrol divulgado en D3 no contiene un polímero seleccionado de hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona y hidroxipropilcelulosa. En ninguna parte del documento D3 se sugiere el uso de estos excipientes para formar la capa de resveratrol.

En virtud de las nuevas reivindicaciones y lo argumentado arriba se solicita al Examinador la reconsideración de sus objeciones.

Notificaciones

Recibiré notificaciones en la secretaría de su Despacho; en mis oficinas de abogado ubicadas en la Calle 67 No. 7 – 35, oficina 1204, teléfono 3192900, fax 3210295, Bogotá D.C., Colombia, o; al correo electrónico apenaranda@gpzlegal.com.

Atentamente,

MAURICIO JARAMILLO C.
C.C. 80.421.942 de Bogotá
T.P. 74.555 del C.S.Jra.

apu
Adjunto: Lo anunciado

Gómez Pinzón Zuleta Abogados
Teléfono: (571) 319 2900 • Fax: (571) 321 0295
Calle 67 # 7-35 Of.1204• Bogotá, Colombia
Cra. 43A # 1-50 Of. 301-303 San Fernando Plaza, Torre Hotel • Teléfono: (574) 444 3815 Medellín, Colombia
www.gpzlegal.com

MIEMBRO DE
AFFINITAS
www.affinitaslegal.com

REIVINDICACIONES

1.- Una composición farmacéuticaoral, caracterizada porque comprende de 30mg a 360mg de orlistat, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y de 100mg a 2000mg resveratrol, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la proporción en peso de orlistat/resveratrol es igual a 1.7/10.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque consiste en esferas formadas por una mezcla de orlistat con excipientes seleccionados de derivados de celulosa, celulosa microcristalina o almidón de maíz, y un recubrimiento sobre dichas esferas formado por resveratrol y un polímero seleccionado de hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona y hidroxipropilcelulosa.

3.- Un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende orlistat, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y resveratrol, o sus sales farmacéuticamente aceptables, caracterizado porque comprende mezclar orlistat con excipientes

farmacéuticamente aceptables seleccionados de derivados de celulosa, celulosa microcristalina, lactosa y almidón de maíz; calentarla mezcla a una temperatura de 50 a 70°C, extruir la mezcla, formar esferas que comprenden orlistat, enfriar y recubrir las esferas con una dispersión de resveratrol y un polímero seleccionado de hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona y hidroxipropilcelulosa.

HORIZON

NOTA DE APLICACIÓN

EDICIÓN GENÓMICA DE PRECISIÓN

Zhiqiang Chen, Suzanne Mead y John Goodall

INTRODUCCIÓN

La combinación de fármacos para amentar el efecto terapéutico, para reducir la toxicidad y para minimizar la resistencia a fármacos está siendo cada vez más importante en el tratamiento de cáncer y puede ofrecer un resultado favorable para terapia. Sin embargo, existen retos en el diseño de estudios de combinaciones in vitro que sean no sólo apropiadas para el mecanismo de acción de los compuestos, sino que puedan cuantificar de forma precisa la interacción de fármacos.

En Horizon Discovery, tenemos capacidades internas amplias para llevar a cabo estudios de combinación para identificar proporciones de combinaciones de fármacos. Comúnmente empleamos dos métodos diferentes cuando estudiamos las combinaciones de fármacos in vitro:

- Veces de potenciación
- Índice de combinación (CI).

El método de veces de potenciación mide el desplazamiento en IC50 para mostrar claramente la mejora de un efecto de un fármaco por otro fármaco que no tiene efecto por sí solo. Sin embargo, este método no puede ser usado cuando ambos fármacos despliegan citotoxicidad como únicos agentes. En este caso el método CI es más apropiado. Este método permite distinguir antagonismo, aditividad y sinergismo entre fármacos.

Aquí ilustramos cómo estos dos métodos puede usarse para evaluar combinaciones de fármacos con mecanismos diferentes. Estos datos ilustran cómo la identificación de combinaciones racionales pueden significar mejoras en los efectos de compuestos individuales. La comprensión de estas interacciones entre fármacos es crítica si deseamos mejorar los resultados en el paciente en la clínica, particularmente en el caso de enfermedades multivariadas complejas tales como el cáncer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método 1: Evaluación de las Veces de Potenciación

La potenciación del agente citotóxico SN38 por el inhibidor de Chk1 UCN01 fue evaluado en células HT29. Las células HT29 carecen de un punto de revisión funcional G1/S debido a la expresión de mutante p53 (R273H). Por lo tanto, la reparación del daño en el ADN recae solamente en el punto de revisión G2/M. La inhibición de Chk1, una quinasa crucial en la regulación del punto de revisión G2/M, sensibiliza a las células HT29 hacia los efectos de agentes citotóxicos, tales como SN38.

Figura 1. UCN01 potencia el efecto citotóxico de SN38 en células HT29

Las células HT29 fueron tratadas con SN38 por 72h en presencia o ausencia de UCN01 2nM, el cual por sí solo no tuvo efecto sobre la viabilidad de las células HT20 (Figura 1). UCN01 potencia el efecto citotóxico de SN38 por desplazamiento de IC50 de SN38 20 veces a partir de 160 nM como un solo agente, a 8nM en presencia de UCN01.

Método 2: Índice de Combinación

Las células HCT116 reciben tanto a PI3kα (H1047R) como a K-Ras (G13D) activando mutaciones, y los inhibidores MEK y P13K PD325901 y GDC-0941 respectivamente, causan efectos antiproliferativos en células como únicos agentes (Figura 2).

Figura 2. Curvas dosis-respuesta de un solo agente de GDC-0941 y PD0325901 en células HCT116.

El desarrollo concomitante de estas mutaciones es un mecanismo de resistencia conocido para estos agentes, debido a que la activación de una vía de crecimiento reduce el requerimiento para la otra. Al combinar estos fármacos se predice por lo tanto que es beneficioso.

Las células HCT116 fueron tratadas con PD032901 y GDC-0941 ya sea solos o en una matriz de concentraciones combinadas por 72 h, y los efectos antiproliferativos se determinaron. En este caso, debido a que ambos fármacos son citotóxicos como únicos agentes, el método CI es necesario para estudiar el efecto de la combinación. Los valores CI se calculan usando la ecuación posterior y un valor de CI menor a 1 indica sinergismo, 1 indica aditividad y mayor a 1 indica antagonismo.

$$CI = C(A) / EC50(A) + C(B)/EC50(B)$$

Donde: C(A) y C(B) son las concentraciones de los fármacos A y B que en combinación causan el 50% de inhibición.

14

EC50(A) y EC50(B) son las concentraciones de fármacos A y B que individualmente causan el 50% de inhibición.

Los datos CI han sido analizados y desplegados en dos diferentes formas. El primero es una gráfica de CI-efecto (Figura 3), la cual es una gráfica orientada al efecto y despliega el efecto de la combinación a través de un amplio rango de niveles de efecto. El segundo es un isobolograma (Figura 4) que es una gráfica orientada a la dosis que puede generarse por cualquier nivel de efecto único (en este caso, es el 50% de inhibición).

Figura 3. Gráfica CI-efecto para PD0325901 y GDC-0941 en células HCT116. Un valor menor a 1 indica sinergismo, 1 indica aditividad y mayor a 1 indica antagonismo.

Figura 4. Isobolograma a concentraciones EC50. La línea punteada une las concentraciones requeridas como únicos agentes y muestra el punto en el cual la aditividad ocurriría (es decir CI=1).

Ambos diagramas ilustran que PD0325901 y GDC-0941 están actuando sinérgicamente, con un valor CI menor a 1 en todos los niveles del % de inhibición.

CONCLUSIÓN

Cuando se estudian combinaciones de fármacos es importante escoger el método apropiado basado en el mecanismo de acción de los fármacos de estudio. Hemos empleado dos ejemplos de combinaciones para ilustrar los diferentes enfoques que pueden emplearse para describir y definir el efecto in vitro de la combinación de agentes.

Mostramos que cuando un compuesto tiene poco efecto como un único agente, como en el caso de UCN01, su actividad en combinación es mejor descrita usando el método de veces de potenciación. En contraste, cuando ambos compuestos muestran actividad como únicos agentes, como con PD0325901 y GDC-0941, el enfoque de índice de combinación debe emplearse para describir de manera no ambigua el efecto combinatorio de estos agentes. Al aplicar estos diferentes enfoques puede ayudar en el diseño racional y el desarrollo de combinaciones de agentes terapéuticos.

SOPORTE HORIZON

Horizon ofrece un amplio rango de Servicios de Ensayo estándar y diseñados a la medida tanto en líneas celulares del cáncer estándar y líneas celulares isogénicas X-MAN®.

Los servicios de ensayo disponibles relacionados con esta Nota de Aplicación incluyen:

Ensayos de crecimiento (2D)

Ensayos de combinación

Todas las Líneas Celulares X-MAN® están disponibles "fuera del mostrador" en términos de licencia simples y el Desarrollo de Línea Celular a la Medida también está disponible

REFERENCIAS

1. Chou, Pharmacological Reviews 2006 (58) p621

2. Zabludoff et al., Mol Cancer Ther 2008 (7) p2955

3. Engelman et al., Nature Medicine 2008 (14) p1351

The Evaluation of Drug Combinations

Zhiqiang Chen, Suzanne Mead and John Goodall

INTRODUCTION

Combining drugs to increase therapeutic effect, to reduce toxicity and to minimize drug resistance is becoming increasingly important in the treatment of cancer and can offer a favorable outcome for therapy. However, challenges exist in the design of *in vitro* combination studies that are not only appropriate to the mechanism of action of the compounds, but that can accurately quantify the drug interaction.

At Horizon Discovery, we have extensive in house capabilities for carrying out combination studies to identify ration drug combinations. We commonly employ two different methods when studying drug combinations *in vitro*:

- Fold of potentiation
- Combination index (CI).[1]

The fold of potentiation method measures the shift in IC_{50} to clearly show the enhancement of one drug's effect by another drug that has no effect alone. However, this method cannot be used when both drugs display cytotoxicity as single agents. In this case the CI method is more appropriate. This method allows antagonism, additivity and synergism between drugs to be distinguished.

Here we illustrate how these two methods can be used to assess drug combinations with differing mechanisms. These data illustrate how the identification of rational drug combinations can significantly enhance the effects of individual compounds. Understanding these drug interactions is critical if we wish to improve patient outcomes in the clinic, particularly in the case of complex multivariate diseases such as cancer.

RESULTS AND DISCUSSION

Method 1: Assessing Fold of Potentiation

The potentiation of the cytotoxic agent SN38 by the Chk1 inhibitor UCN01 was evaluated in HT29 cells. HT29 cells lack a functional G1/S checkpoint due to the expression of mutant p53 (R273H). Therefore, the repair of DNA damage relies solely on the G2/M checkpoint. Inhibition of Chk1, a kinase crucial in the regulation of the G2/M checkpoint, sensitizes HT29 cells to the effects of cytotoxic agents, such as SN38[2].

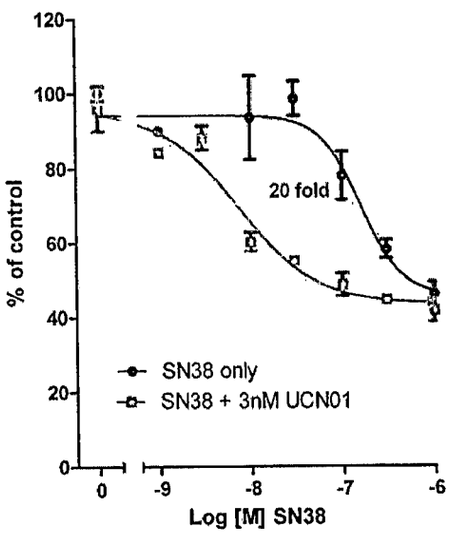


Figure 1. UCN01 potentiates the cytotoxic effect of SN38 in HT29 cells

HT29 cells were treated with SN38 for 72h in the presence or absence of 3nM UCN01, which alone has no effect on HT29 cell viability (Figure 1). UCN01 potentiates the cytotoxic effect of SN38 by shifting the IC_{50} of SN38 20-fold from 160nM as a single agent, to 8nM in the presence of UCN01.

Method 2: Combination Index

HCT116 cells harbor both PI3Kα (H1047R) and K-Ras (G13D) activating mutations and the MEK and PI3K inhibitors PD0325901 and GDC-0941 respectively, cause anti-proliferative effects in cells as single agents (Figure 2).

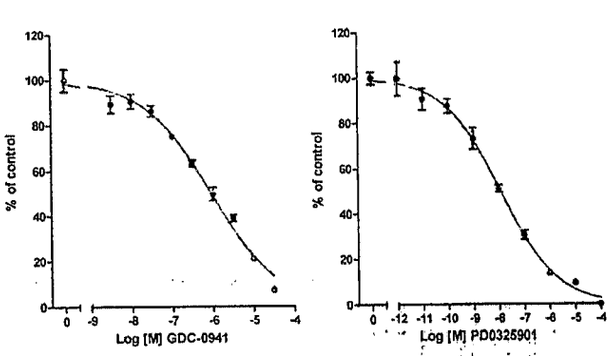


Figure 2. Single agent dose-response curves of GDC-0941 and PD0325901 in HCT116 cells

Concomitant development of these mutations is a known resistance mechanism to these agents, because activation of one growth pathway reduces the requirement for the other. Combining these drugs is therefore predicted to be beneficial[3].

HCT116 cells were treated with PD0325901 and GDC-0941 either alone or in a matrix of combined concentrations for 72h, and the anti-proliferative effects determined. In this instance, because both drugs are cytotoxic as single agents, the CI method is required to study the combination effect. CI values are calculated using the equation below and a CI value of less than 1 indicates synergy, 1 indicates additivity and greater than 1 indicates antagonism.

$$CI = \frac{C(A)}{EC_{50}(A)} + \frac{C(B)}{EC_{50}(B)}$$

Where:

- **C(A)** and **C(B)** are the concentrations of drug A and B that in combination cause 50% inhibition
- **EC_{50}(A)** and **EC_{50}(B)** are the concentrations of drug A and B that individually cause 50% inhibition

The CI data has been analyzed and displayed in two different ways. The first is as a CI-effect plot (Figure 3), which is an effect-orientated graphic and displays the combination effect across a wide range of effect levels. The second is as an isobologram (Figure 4), which is a dose-orientated graphic that can be generated for any single effect level (in this case, it is 50% inhibition).

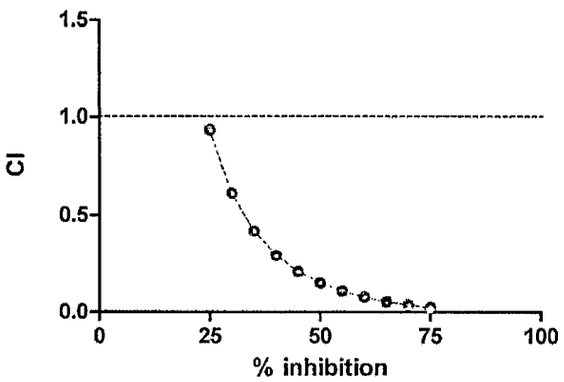


Figure 3. CI-effect plot for PD0325901 and GDC-0941 in HCT116 cells. A CI value of less than 1 indicates synergy, 1 indicates additivity and greater than 1 indicates antagonism.

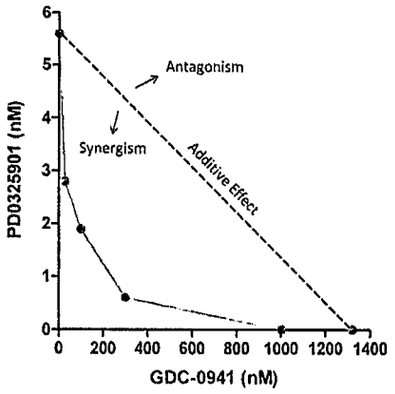


Figure 4. Isobologram at EC_{50} concentrations. The dashed line joins the concentrations required as single agents and shows the point at which additivity would occur (i.e. CI = 1).

Both diagrams illustrate that PD0325901 and GDC-0941 are acting synergistically, with a CI value less than 1 at all levels of % inhibition.

CONCLUSION

When studying drug combinations it is important to choose the appropriate method based on the mechanism of action of the test drugs. We have used two example combinations to illustrate the different approaches that can be employed to describe and define the *in vitro* effect of combining agents.

We show that when a compound has little effect as a single agent, as in the case of UCN01, its activity in combination is best described using the fold of potentiation method. By contrast, when both compounds show single agent activity, as with PD0325901 and GDC-0941, the combination index approach must be employed to unambiguously describe the combinatorial effect of these agents. Applying these different approaches can aid the rational design and development of combinations of therapeutic agents.

HORIZON SUPPORT

Horizon offers a broad range of standard and custom-designed **Assay Services** in both standard cancer cell lines and **X-MAN™** isogenic cell lines.

Available assay services relating to this Application Note include:

Growth assays (2D)
Combination assays

All **X-MAN™ Cell Lines** are available 'off the shelf' on simple licensing terms and **Custom Cell Line Development** is also available

REFERENCES

1. Chou, Pharmacological Reviews 2006 (58) p621
2. Zabludoff *et al.*, Mol Cancer Ther 2008 (7) p2955
3. Engelman *et al.*, Nature Medicine 2008 (14) p1351

PHYTOCHEMISTRY

Página de inicio de la revista: www.elsevier.com/locate/phytochem

Revisión

Posibles terapéuticas antiobesidad – Una revisión

Jong Won Yun*

Departamento de Biotecnología, Universidad de Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, República de Corea

RESUMEN

La obesidad está asociada con muchas enfermedades, particularmente diabetes, hipertensión, osteoartritis y enfermedades del corazón. La incidencia de la obesidad se ha incrementado a una velocidad alarmante en años recientes, convirtiéndose en un problema de salud mundial, con costos incalculables. Dos diferentes fármacos para el tratamiento de obesidad están actualmente en el mercado: orlistat, que reduce la absorción de grasa intestinal vía la inhibición de la lipasa pancreática; y sibutramina, un anoréctico o supresor del apetito. Ambos fármacos tienen efectos secundarios adversos, incluyendo aumento de la presión, boca seca, constipación, dolor de cabeza e insomnio. Por esta razón, una amplia variedad de materiales naturales han sido explorados en su potencial de tratamiento de la obesidad. Estos son principalmente productos complejos que tienen diversos componentes con diferentes características químicas y farmacológicas. Esta revisión intentó sondear la literatura que cubre productos naturales con actividad antiobesidad y revisar datos científicos, incluyendo metodologías experimentales, componentes activos, y mecanismos de acción en contra de la obesidad

© 2010 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.

Contenido

1. Introducción 1625
2. Materiales naturales para el tratamiento de obesidad 1626
   2.1 Efecto inhibitorio de lipasas 1626
   2.2 Efecto supresor en la ingesta de alimento 1628
   2.3 Efectos estimulatorios de gasto de energía 1629
   2.4 Efecto inhibitorio en diferenciación de adipocitos 1630
   2.5 Efecto regulatorio en metabolismo de lípidos 1632
   2.6 Efecto combinado para el tratamiento de obesidad 1635
3. Conclusiones 1636
   Reconocimientos 1636
   Referencias 1636

Abreviaturas: AAC, acetil-CoA carboxilasa; AMPK, quinasa proteica activada por adenosin 5'-monofosfato; BAT, tejido de adipocitos café; C/EBP, proteína de unión mejoradora de CCAAT; CNS, sistema nervioso central; CPT, carnitin palmitoil-transferasa-1; DHA, ácido docosahexaenoico; ECG, (-)-epicatin-3-galato; EGG, (-)-epigalocate3quina; EGCG, (-)-epigalocatequin-3-galato; EPA, ácido eicosapentaenoico; ERK, quinasas reguladas por señales extracelulares; FA, ácido graso; GLUT, transportador de glucosa; GPDH, glicerol-3-fosfato desidrogenasa; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A; HFD, dieta alta en grasas; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; IC50, la concentración inhibitoria máxima media (con trioleina como sustrato de lipasa); MAPK, quinasa de proteína activada por mitógeno; MCH, hormona concentradora de melanina; PPAR, receptor activado por proleferador de peroxisoma; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; RQ, cociente respiratorio; TG, triglicérido; TNF, factor de necrosis tumoral; UCP, proteína no acoplada; WAT, tejido de adipocitos blancos.

1. Introducción

En una escala global, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas y es un principal contribuyente en la carga global de enfermedad crónica y discapacidad. Actualmente, más de un billón de adultos en todo el mundo tienen sobrepeso y al menos 300 millones de ellos son clínicamente obesos (OMS, 2009).

Dos diferentes tipos de fármacos para tratar la obesidad están actualmente disponibles en el mercado (Chaput et al., 2007). Uno de estos es orlistat (Xenical), que reduce la absorción de grasa intestinal a través de la inhibición de la lipasa pancreática (Ballinger y Peikin, 2002; Drew et al., 2007; Hutton y Fergusson, 2004; Thurairajah et al., 2005). El otro es sibutramina (Reductil) que es un anoréctico, o supresor del apetito(Lean, 2001; Poston y Foreyt, 2004; Tziomalos et al., 2009). Ambos fármacos tienen efectos secundarios, incluyendo aumento de la presión sanguínea, boca seca, constipación, dolor de cabeza e insomnio (de Simone y D'Addeo, 2008; Karamadoukis et al., 2009; Slovacek et al., 2008; Thurairajah et al., 2005). Una variedad de fármacos antiobesidad están actualmente en desarrollo clínico, incluyendo fármacos de actuación centralizada (por ejemplo, radafaxina y oleoil-estrona), fármacos dirigidos a la señales de saciedad periférica episódica (por ejemplo rimonabant y APD256), fármacos que bloquean la absorción de grasa (por ejemplo cetilistat y AOD6304), y fragmentos de hormona de crecimiento humana (Halford, 2006; Meinikova y Wages, 2006).

Actualmente, debido a la insatisfacción y altos costos y efectos secundarios potencialmente peligrosos, el potencial de los materiales naturales para tratar obesidad está siendo explorado, y esto puede ser una excelente estrategia alternativa para desarrollar fármacos futuros seguros, efectivos antiobesidad (Mayer et al., 2009; Nakayama et al., 2007; Park et al., 2005). Una pluralidad de productos naturales, incluyendo extractos crudos y compuestos aislados de plantas, pueden inducir la reducción de peso corporal y prevenir la obesidad inducida por dieta. Por lo tanto, han sido usados ampliamente para reducir la obesidad. (Han et al., 2005ª; Moro y Basile, 2000; Rayalam et al, 2008) enfocados en la regulación del ciclo de vida de adipocitos. Sin embargo, estas revisiones no proporcionan actualizaciones de la literatura respecto a varios productos naturales con efecto antiobesidad.

Por lo tanto, en esta revisión, hemos sondeado productos naturales con potencial antiobesidad y revisado datos científicos incluyendo metodologías experimentales, componentes activos, y mecanismos de acción en contra de la obesidad. Un grupo de evidencia en crecimiento indica que los productos naturales que tienen efectos antiobesidad pueden agruparse en cinco categorías basado en sus mecanismos: estos producen (1) absorción disminuida de lípidos, (2) ingestá energética disminuida, (3) gasto aumentado de energía, (4) diferenciación y proliferación preadipocitaria disminuida, o (5) lipogénesis disminuida y lipólisis aumentada. Por tanto, en esta revisión, hemos abordado los compuestos naturales que poseen actividad antiobesidad abordándolos por categorización por estos mecanismos.

2. Materiales naturales para tratamiento de obesidad

2.1 Efecto inhibitorio de lipasas

Entre los tratamientos para la obesidad, uno de las estrategias más promisorias en el esfuerzo para reducir la entrada de energía a través de mecanismos gastrointestinales sin alterar los mecanismos centrales es el desarrollo de inhibidores de absorción y digestión de nutrientes (Birari y Bhutani, 2007). La grasa dietética no es directamente absorbida por el intestino a menos que la grasa haya sido sujeta a la acción de la lipasa pancreática. Por lo tanto, la lipasa pancreática es uno de los mecanismos más estudiados para determinar la eficacia potencial de productos naturales como agentes antiobesidad. (Birari y Bhutani, 2007).

La lipasa pancreática es una enzima clave en la absorción de triacilglicerol dietético, hidrolizando triacilgliceroles a monoacilgliceroles y ácidos grasos. Sólo pocas sustancias interactúan directamente con las lipasas. Un ejemplo es tetrahidrolipstatina (orlistat) un derivado de la lipasa natural producida de Streptomyces toxytricini (Ballinger y Peikin, 2002). Los mecanismos de inhibición de la lipasa de orlistat actúan a través de enlaces covalente para la serina del sitio activo de la lipasa (Hadvary, et al., 1099, 1991; Tsujita et al., 2006). Aunque este inhibidor de la lipasa pancreática está clínicamente autorizado para el tratamiento de la obesidad, orlistat tiene efectos gastrointestinales desagradables (Karamadoukis et al. ,2009; Thurairajah et al., 2005). Estos efectos secundarios resultan del modo de acción de orlistat e incluyen manchas oleosas, evacuaciones líquidas, urgencia fecal o incontinencia, flatulencia y dolor abdominal (Chaput et al., 2007). Por tanto los investigadores están rastreando nuevos inhibidores derivados de plantas u otra fuente natural, que carezcan de algunos de estos efectos secundarios desagradables (Birari y Bhutani, 2007).

Los productos naturales proporcionan un grupo vasto de inhibidores de la lipasa pancreática con potencial para ser desarrollados en productos clínicos. Birari y Bhutani, 2007 revisaron varios extractos y metabolitos secundarios, derivados de plantas y microorganismos, que tienen actividad inhibitoria de lipasa pancreática. Los programas de desarrollo de fármacos deberían enfocarse en estos extractos y metabolitos.

Una amplia variedad de plantas poseen efectos inhibitorios de lipasa pancreática, incluyendo Panax japonicus (Han et al., 2005b), Platycodi radix (Han et al., 2000), Salacia reticulata (Kishino et al., 2006), Nelumbo nucifera (Ono et al., 2006), y así sucesivamente (ver Tabla 1 para detalles). Estos fitoquímicos inhibitorios de la lipasa pancreática incluyen principalmente saponinas, polifenoles, flavonoides y cafeína (Kim y Kang, 2005; Han et al., 2006; Moreno et al, 2006; Shimoda et al., 2006).

21

Diversos carbohidratos también poseen efectos inhibitorios de la lipasa pancreática (Takao et al., 2006). Por ejemplo, cuando los investigadores alimentaron animales experimentales con dieta alta en grasas que contenía 7-15% de quitina/quitosano, la excreción de grasa en las heces se incrementó, resultando en peso corporal reducido (Han et al., 2005ª). Sin embargo, los efectos de estos carbohidratos sobre la reducción del peso corporal en animales y humanos son controvertidos. (Bondioloti et al., 2007; Gades y Stern, 2003, 2005; Galaher et al., 2002; Han et al., 1999ª; Hayashi e Ito, 2006). Hemos descubierto recientemente una reducción de peso corporal distinta en ratones ob/ob alimentadas con oligosacáridos de quitosano; el análisis de proteomas del plasma de ratón antes y después de los tratamientos sugiere acciones moleculares de los oligosacáridos de quitosano (Kumar et al., 2009). La expresión de muchos genes se altera significativamente durante el efecto antiobesidad en respuesta al oligosacárido de quitosano en la dieta (Kumar et al, 2009).

Muchos metabolitos de microorganismos, incluyendo lipstatina de Streptomyces toxytricini (Weibel et al., 1987), panciclinas de Streptomyces sp NR0619 (Mutoh et al, 1994; Yoshinari et al., 1994), valilactona y ebelactonas de Streptomyces albolongus (Kitahara et al, 1987; Umezawa et al., 1980), esterastina de Streptomyces lavendulae (Umezawa et al., 1978), caulerpenina de Caulerpa taxifolia (Tomoda et al., 2002), vibralactona de Boreostereum virans (Liu et al, 2006) y perciquinina de Basidiomycete stereum complicatum (Bitou et al., 1999) también poseen actividad inhibitoria de la lipasa pancreática. Más aún, ciertos cuerpos frutales o micelios de macrohongos poseen actividad inhibitoria de la lipasa (Ahn et al., 2007b, Slanc et al., 2004).

Tabla 1. Compuestos biomateriales antiobesidad que muestran inhibición de la lipasa pancreática

Fuente	Componente activo	Métodos experimentales (dosis tratada, sujetos, duración del tratamiento)	Actividad principal	Referencias
Juniperus communis (corteza) y Illicium religiosum (madera)	Extracto crudo de etanol/agua	Actividad inhibitoria de la lipasa pancreática	IC50=2004 y 21.9 µg/ml, respectivamente	Kim y Kang (2005)
Panax japonicus (rizomas)	Chikusetsusaponinas	3%, ICR ratones con HFD, 9 semanas	22% disminución de ganancia de peso corporal	Han et al., (2005b)
Platycodi radix	Saponinas platicodinas	70 mg/kg, SD en ratones con HFD, 4 semanas	13% de disminución en ganancia de peso corporal	Zhao et al (2005), Zhao y Kim (2004), Han et al (2002) Xu et al (2005)
Platycodi radix	Extracto crudo acuoso/extracto	5%, ICR en ratones con HFD,	12% de disminución en	Han et al (2000).

22

	etanólico (saponina)	8 semanas	ganancia de peso corporal	
Acanthopanax senticosus (corteza de tallo)	10.6% de ácido elágico	800 mg/kgm ICR en ratones con HFD, 5 semanas	54% de disminución en ganancia de peso corporal	Lei et al. (2007); Han et al. (2000)
Tea sinensis (té oolong)	Extracto acuoso crudo (cafeína)	5%, ICR en ratones con HFD, 10 semanas	10% de disminución en ganancia de peso corporal	Han et al (2000)
Cassia mimosoides	Proantocianidina	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática; 2.5%, SD en ratas con HFD, semanas	IC50=0.11 mg/ml; 60% de disminución en ganancia de peso corporal	Yamamoto et al (2000)
Kochia scoparia (frutos)	Extracto crudo acuoso (saponinas)	3%, ICR en ratones con HFD, 9 semanas	19% de disminución en ganancia de peso corporal	Han et al (2000)
Afromomum meleguetta, Spilanthes acmella	Extracto crudo etanólico	2 mg/ml, actividad inhibitoria de lipasa pancreática	90%, 40% de inhibición de lipasa, respectivamente	Ekanem et al (2007)
Salacia reticulate (mezclada con ciclodextrina)	Extracto crudo acuoso	0.5%, SD en ratas con HFD, 8 semanas	27% de disminución en ganancia de peso corporal	Kishino et al (2006)
Thea sinensis (hoja)	Saponina	0.5%, ICR en ratones con HFD, 11 semanas	17% de disminución en ganancia de peso corporal	Han et al (1999b, 2001)
Nelumbo nucifera (hoja)	Extracto crudo etanólico	5%, ICR en ratones con HFD, 5 semanas	28% de disminución en ganancia de peso corporal	Ono et al (2006)
Trigonella foenum graecum l. (semilla)	Extracto crudo etanólico	0.3%, ddY en ratones obesos, 22 días	14% de disminución en ganancia de peso corporal	Handa et al (2005)
Salix matsudana (hoja)	Polifenol (PP)	5% PP, ratas Wistar King con HFD, 9 semanas	20% de disminución en ganancia de peso corporal	Han et al (2003a,b)
	Glucósido	5%, ratas de	19% de	Han et al.

	flavonoide	cepa ICR con HFD, 9 semanas	disminución en ganancia de peso corporal	(2003b)
Vitis vinifera	Extracto crudo etanólico	1 mg/ml, 3T3-L1 adipocito, 8 días	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 80%	Moreno et al (2003)
Eriochloa villosa	Extracto crudo metanólico	0.2 mg/ml, actividad inhibitoria de lipasa pancreática	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 83%	Sharma et al (2005)
Orixa japonica	Extracto crudo metanólico	0.2 mg/ml, actividad inhibitoria de lipasa pancreática	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 81%	Sharma et al (2005)
Salvia officinalis I. (hoja)	Extracto metanólico (ácido carnósico)	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 36 µg/ml	Ninomiya et al (2004)
Setaria italic	Extracto crudo metanólico	0.2 mg/ml, actividad inhibitoria de lipasa pancreática	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 80%	Sharma et al (2005)
Scabiosa tschilensis Grun.	Saponinas triterpenoides	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	Máxima actividad: casi del 100% con prosapogenina 1B (1mg/ml)	Zheng et al (2004)
Acanthopanax sessiliflorous	Saponinas de tipo lupano	0.5%, ICR en ratones con HFD, 4 semanas	40% de disminución en ganancia de peso corporal	Yoshizumi et al (2006)
Aesculus turbinate (semilla)	Escina	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 14 µg/ml con escina IIb	Kimura et al (2006)
Cyclocarya paliurus (Batal) Iljinskaja	Extracto acuoso crudo	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 9.1 µg/ml	Kurihara et al (2003)
Cassia nomame	Dímeros de flavano	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 5.5 µM con (2S)-3',4'7-trihidroxiflavan-(4α-8)-catequina	Hatano et al (1997)

Gardenia jasminoides (fructus)	Crocina, crocetina	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática 50 mg/kg/d, ratones hiperlipidémicos inducidos por Triton WR-1339 5 semanas	IC50= 2.1 mg/ml con crocetina; 25% de disminución de ganancia de peso corporal con crocina	Lee et al (2005), Sheng et al. (2006)
Dioscorea nipponica	Extracto metanólico crudo	5%, SD en ratas, con HFD, 8 semanas	IC50= 5-10 µg/ml, 37% de disminución de ganancia de peso corporal	Kwon et al (2003)
Coffea canephora	Cafeína, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ácidos feruloquínicos	0.5%, ddy ratones con dieta estándar, 14 días	157% de disminución de ganancia de peso corporal	Shimoda et al. (2006)
Péptido	ε-polilisina	0.4%, ratones C57BL/6 con HFD, 60 días	29% de disminución de ganancia de peso corporal	Tsujita et al (2006)
Glycyrrhiza uralensis	Licochalcona A	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50 = 35 mg/ml, Ki=11.2 ug/ml	Won et al. (2007)
Quitosano	No especificado	3 g/día, adultos humanos con sobrepeso, 8 semanas	22% de disminución de ganancia de peso corporal	Kaats et al (2006)
	MW 125-145 KD	2%, Ratas Wistar, 4 semanas	9% de disminución de ganancia de peso corporal	Bondiolotti et al (2007)
	MW 46 KDa	300 mg/kg, ratas C57BL/6J con HFD, 10 semanas	14% de disminución de ganancia de peso corporal	Sumiyoshi y Kimura (2006)
Quitosano-quitina	Quitosano (80%), quitina (20%)	15%, ratones ICR con HFD, 9 semanas	143% de disminución de ganancia de peso corporal	Han et al. (1999a), Gades y Stern (2003, 2005), Gallaher et al. (2002)
Manno-oligosacáridos		1%, ratones ICR con HFD, 12	40% de disminución de	Takao et al. (2006)

		semanas	triglicéridos hepáticos, no hay cambios de peso corporal	
Levano		10%, ratas SD con HFD, 4 semanas	160% de disminución de ganancia de peso corporal	Kang et al. (2006)
Hongo, Laetiporus sulphureus	Extracto de micelios	2 mg/ml de extracto fúngico, actividad de lipasa	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 83%	Slanc et al. (2004)
Hongo, Tylopilus felleus	Extracto de micelios	2 mg/ml de extracto fúngico, actividad de lipasa	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 96%	Slanc et al. (2004)
Hongo, Hygrocybe conica	Extracto de micelios	2 mg/ml de extracto fúngico, actividad de lipasa	Efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa = 97%	Slanc et al. (2004)
Basidiomiceto, Boreoseterum vibrans	Vibralactona	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.14 ug/ml	Weibel t al. (1987) Hochuli et al. (1987)
Streptomyces toxytricini	Lipstatina	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.4 mM	Liu et al. (2006)
Streptomyces sp. NR0619	Panclicinas	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.89 uM	Mutoh et al. (1994), Yoshinari et al. (1994)
Actinomycetes sp. MG147-CF2	Valilactona	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.00014 uM	Kitahara et al. (1987)
	Esterastina	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.2 ug/ml	Umezawa et al. (1978)
	Ebelactona B	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.001 ug/ml	Umezawa et al. (1980)
	Ebelactona A	Actividad inhibitoria de lipasa	IC50= 0.003 ug/ml	Umezawa et al. (1980)

		pancreática		
Citrus unshiu	Hesperidina	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 0.32 ug/ml	Kawaguchi et al. (1997)
Algas marinas (Caulerpa taxifolia)	Caulerpenyne	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática	IC50= 2 mM	Tomoda et al. (2002)

[a] mg/kg indica una dosis (mg) basada en el peso corporal experimental del animal (kg) y % se refiere a la proporción de la dieta.

[b] El autor recalculó los valores con un asterisco (*) a partir de los datos originales (mostrados como figuras) en cada referencia.

[c] Datos a partir de la primera referencia citada.

Algunos de los materiales más ampliamente usados entre las fuentes naturales de inhibidores de lipasa pancreática son los diferentes tipos de té (por ejemplo, verde, oolong y negro). Un tipo significativamente diferente de polifenoles (por ejemplo, L-epicatequina, ECG, EGG y EGCG), aisladas de hojas de té, mostraron fuerte actividad inhibitorioa contra la lipasa pancreática (Han et al, 1999b, Thielecke y Boschmann, 2009). Estos polifenoles requieren entidades de galoilo dentro de sus estructuras químicas y/o polimerización de sus flavan-3-oles para inhibición de lipasa pancreática mejorada.

En su búsqueda de inhibidores de lipasa pancreática Bitou et al, (1999) evaluaron 54 algas marinas, interesantemente, casi todas mostraron actividad inhibitoria de lipasa, ya sea extractos de metanol o etilacetato (ver Tabla 1 de Bitou et al., 1999).

En reportes, el valor IC50 de orlistat, un inhibidor de lipasa clínicamente aprobado, es 0.75 microgramos /mililitro. Puesto que los extractos crudos incluyen no solo sustancias activas, sino componentes no activos, las potencias inhibitorias de extractos crudos de plantas y otras fuentes naturales son significativamente débiles (Kim y Kang, 2005).

Numerosos compuestos naturales y decocciones preparadas de plantas se parecen a orlistat, en que inhiben las reacciones de la lipasa gastrointestinal. No obstante, sus mecanismos inhibitorios difieren de orlistat; algunos son inhibidores de reacciones reversibles, mientras que otros, como orlistat, son inhibidores irreversibles (Tsujita et al., 2006; Birari y Bhutani, 2007). Los inhibidores irreversibles interactúan con la lipasa y la inactivan al formar un intermediario covalente estable (Bitou et al., 1999).

2.2 Efecto supresor en la ingesta de alimento

La regulación de peso corporal a través del control de apetito es un evento multifactorial que resulta de interrelaciones hormonales y neurológicas. Una línea de evidencia indica que la serotinina, la histamina y la dopamina, y sus actividades receptoras asociadas, están asociadas cercanamente con la regulación de la saciedad. Estos receptores pueden habilitar a los

investigadores para dirigir mejor sus investigaciones sobre fármacos que tratan la obesidad a través de reducción de entrada de energía (Chantre y Lairon, 2002).

Los agentes que actúan a través de los sistemas de péptidos de la saciedad periférica que alteran los diversos niveles del CNS de los neuropéptidos hipotalámicos, o que alteran los niveles clave de los neurotransmisores monoamina del apetito del CNS, pueden ser candidatos adecuados para fármacos que suprimen el apetito (Halford y Blundell, 2000; Wynne et al., 2005).

Cualquier cambio que el supresor potencial del apetito induzca, deberá ser considerado en términos de: (1) la experiencia psicológica y expresión conductual del apetito, (2) la fisiología periférica y el metabolismo; y (3) el funcionamiento de las vías neurales del CNS (Halford y Blundell, 2000). En general, los supresores naturales del apetito son suplementos dietéticos que ayudan en el control del apetito. Los mecanismos de acción de la supresión del apetito comúnmente afectan los centros del control de hambre en el cerebro, resultando en una sensación de saciedad. Sin embargo, en animales y humanos, la secreción de grelina en el estómago puede aumentar con la disminución de ingesta de alimento, estimulando la ingesta de alimento. Por tanto, en antagonismo de grelina puede disminuir o entorpecer el apetito aumentado que puede ocurrir con alimentación disminuida, y así, puede ser un tratamiento potencial adyuvante para la obesidad (Bays, 2004). El antagonismo del receptor de MCH puede proporcionar también un objetivo importante para tratamiento de obesidad a través de la regulación del apetito.

La sibutramina es el primer fármaco nuevo para tratar obesidad a través de supresión del apetito, que fue aprobado por la FDA dentro de los últimos 30 años (Tziomnalos et al., 2009). Su mecanismo principal causa un incremento en la sensación de saciedad al controlar la noradrenalina, serotionina, 5-hidroxitriptamina y dopamina (Lean, 2001; Poston y Foreyt, 2004). Sin embargo, la sibutramina tiene un efecto conocido adverso, incluyendo boca seca, constipación e insomnio (Chaput et al, 2007).

Un claro ejemplo de supresor natural del apetito es Hoodia gordonii, una planta sin hojas, espinosa y suculenta en algunos condados de África del Sur (van Heerden, 2008). A pesar de su popularidad, no existe información clínica suficiente de H. gordonii para probar su eficacia. Sin embargo, el consenso actual es que H. gordonii regula el apetito y puede reducir significativamente la ingesta calórica e impulsar la pérdida de peso (Lee y Balick, 2007; MacLean y Luo, 2004; van Heerden et al., 2007; van Heerden, 2008). Existe actualmente más de 20 patentes internacionales sobre compuestos que se originan de H. gordonii y muchas preparaciones comerciales que contienen hoodia están disponibles comercialmente (van Heerden, 2008). Sin embargo, no existe alguna confirmación de que estas preparaciones realmente contengan hoodia. Un problema común y notable con la comercialización de botánicos es que los productos comercialmente disponibles frecuentemente carecen del botánico o del agente activo.

El ácido (-)-hidroxicítrico (HCA) natural preparado de Garcinia cambosia, es otro supresor potencial natural del apetito. Actualmente está disponible bbajo los nombres HCA-SX y Super CitriMax ® Ohia et al, 2002; Life Extension Vitamin Supplies and Life Extension Institute, Inc., Place Scottsdale, AZ, EEUU). Este fitoquímico actúa incrementando la liberación/disponibilidad de 5-hidroxitriptamina y/o serotonina; la última es un neurotransmisor implicado en la regulación del comportamiento alimenticio y control del apetito (Ohia et al., 2002). Otro supresor del apetito

natural similar en el mercado es CQR-300, un extracto de Cissus quadrangularis (Oben et al., 2007; Wellcrops International, LLC, San Francisco, CA, EEUU).

En reportes, otros extractos vegetales y suplementos herbolarios incluyen el ginseng rojo de Corea (Kim et al., 2005), Camellia sinensis (Kao et al., 2000; Moon et al, 2007; Dulloo et al., 2000; Nagao et al., 2005; Wolfram et al., 2006), Caralluma fimbriata /Kuriyan et al., 2007), ephedra (Fleming, 2007), Citrus aurantium (Klontz et al., 2006), Phaseolus vulgaris (Baintner et al., 2003); Celleno et al., 2007), Phaseolus Vulgaris (Baintner et al., 2003); Celleno et al, 2007), Robinia psudoaccacia (Baintner et al, 2004) y aceite de girasol (Ferrer-Lorente et al., 2007; Remesar et al., 2000); Romero et al., 2007; Salas et al, 2007), poseen propiedades supresoras del apetito. Aunque la investigación ha identificado diversos constituyentes activos en estas sustancias con capacidad supresora de alimento (por ejemplo, glicósidos, saponina y flavonoides), las vías en las cuales trabajan para suprimir el apetito no están claras; se cree que aumentan la señalización en la función de sensación de energía en el hipotálamo basal.

Los mecanismos endógenos de regulación del apetito por estos materiales dependen del tipo de planta. Por ejemplo, el extracto de H. gordonii incrementó el contenido de ATP en las neuronas del hipotálamo que regulan la ingesta de alimento en el cerebro de rata (McLean y Luo, 2004) (Tabla 2). Como es bien sabido, el metabolismo central de la glucosa suprime la ingesta de alimento, regulada por el sistema de señaliación de la AMPK/malonil-CoA hipotalámica (Lane y Cha, 2009). La administración central de glucosa aumenta la malonil-CoA hipotalámica, disminuye la expresión de neuropéptidos orexigénicos, y suprime la ingesta de alimento. La fructosa administrada centralmente provoca alimentación, a través de la vía de señalización de la AMPK/malonil-CoA. Por tanto, se las decocciones preparadas de fuentes naturales que contienen niveles de fructosa excesivamente altos pueden suprimir la vía de señalización de la AMPK/malonil-CoA, por lo tanto ejerciendo efecto orexigénico (Cha et al., 2008; Lane y Cha, 2009).

Muchos otros supresores naturales del apetito regulan la expresión reducida de neuropéptido hipotalámico Y (NPY) o niveles de leptina sérica (Kim et al., 2005; Weigle, 2003). Por ejemplo, Kim et al (2005) probaron que en obesidad inducida por HFD en ratas, una saponina cruda del ginseng coreano regulaba eficazmente los niveles de leptina y la expresión de NPY en el hipotálamo de la rata.

Algunos investigadores han encontrado que la suplementación con ciertas grasas dietéticas (por ejemplo ácido linoleico conjugado, ácido láurico, y salatrim) tienen efectos supresores en la ingesta de energía. Sin embargo, sus efectos sobre la reducción de peso corporal no fueron significativos (Feltrin et al., 2008; Kamhuis et al., 2003; Sorensen et al., 2008). Los efectos gastrointestinales de los lípidos dependen de las longitudes de acilo de los ácidos grasos. Los ácidos grasos de más de 12 átomos de carbono desaceleran el vaciado gástrico, modulan la secreción de hormona gastrointestinal y suprimen la ingesta de energía (Feltrin et al., 2008).

Tabla 2. Biomateriales antiobesidad que muestran actividad en la represión del apetito

Fuente	Componente activo	Métodos experimentales [a] (dosis tratada, sujetos, duración del tratamiento)	Actividad principal [b]	Referencias [c]
Panax ginseng (raíz)	Saponinas crudas	200 mg/kg, ratas SD con HFD, 3 semanas	37% de disminución en la ganancia de peso corporal	Kim et al. (2005)
Garcina cambogia	Ácido (-)-hidroxicítrico (HCA)	254 nmol HCA/kg de ratas Zucker obesas, 92 días	8% disminución de ganancia de peso corporal	Saito et al., (2005), Heymsfield et al. (1998), Ohia et al. (2002)
Camelia sinensis (hoja)	(-)-epigalo-catequin calato (EGCG)	(1) 82 mg/kg ratas SD (7 días) (2) 81 mg/kg ratas Zucker esbeltas (8 días) (3) 92 mg/kg obesas ratas Zucker (4 días)	(1) 53% de disminución en ganancia de peso corporal (2) 32% de disminución en ganancia de peso corporal (3) 11% de disminución en ganancia de peso corporal	Kao et al (2000), Moon et al. (2007), Dulloo et al. (1999), Nagao et al. (2005), Wolfram et al. (2006)
Carulluma fimbriata (cactus)	Extracto crudo etanólico (glucósidos de pregnano))	1 g/día, hombres y mujeres indios adultos con sobrepeso, 60 días	2.5% de disminución en ganancia de peso corporal	Kuriyan et al (2007)
Coix lachrymajobi var. Mayneum (Semilla)	Extracto crudo acuoso	500 mg/kg, ratas SD con HFD, 4 semanas	36% de disminución en ganancia de peso corporal	Kim et al. (2004b)
Hoodia gordonii y H. pilifera	Glucósido esteroidal (P57AS3)	Inyección intracerebroventricular, 24 horas	40-60% de reducción en la ingesta de alimento	Maclean y Luo (2004), van hereden (2008), Lee y Balick (2007)
No especificado	Oleoil-estrona	4.4 µmol/g/día, ratas Zucker esbeltas con HFD, 12 días	30% de disminución en ganancia de peso corporal	Remesar et al (2000), Salas et al. (2007), Ferrer-Lorente et al.

				(2007), Romero et al (2007)
Phaseolus vulgaris y Robinia pseudoaccacia	Lectinas	100 mg/kg, ratas Harlan-Wistar, 16 h	8.25 veces* disminución en ingesta de aliment	Baintner et al (2000)
Pinus koraiensis (nuez de pino)	Acidos grasos de nuex de pino	3 g, mujeres obesas, 4h	60% de incremento en secreción de colecistoquinina-8 (hormona de la saciedad)	Pasman et al (2008), Hughes et al. (2008)

[a] mg/kg indica una dosis (mg) basada en el peso corporal experimental del animal (kg) y % se refiere a la proporción de la dieta.

[b] El autor recalculó los valores con un asterisco (*) a partir de los datos originales (mostrados como figuras) en cada referencia.

[c] Datos a partir de la primera referencia citada.

Tabla 3. Biomateriales antiobesidad que promueven el gasto de energía

Fuente	Componente activo	Métodos experimentales[a] (dosis tratada, sujetos, duración del tratamiento)	Actividad principal [b]	Mecanismo de acción	Referencias [c]
Pinellia ternata	Extracto crudo acuoso	400 mg/kg, ratas Zucker obesas, 6 semanas	Ligera disminución en la ganancia de peso corporal (datos no mostrados)	Expresión de UCP1 incrementada en BAT y PPARγ en WAT	Kim et al. (2006d)
Nelumbo nucífera (hoja)	Extracto crudo etanólico (flavonoide)	1%, Ratpmes A/J con HFD, 12 semanas	15% de disminución en la ganancia de peso corporal	Activación de receptor beta-adrenérgico	Ohkoshi et al. (2007)
Camelia sinensis	EGCG	300 mg/d, hombres obesos, 2 días	8% de disminución en RQ	Disminución en RQ	Boschmann y Thielecke (2007), Chantre y Lairon (2002), Boschmann y Thielecke

					(2009)
Panax ginseng (mora)	Extracto crudo etanólico	150 mg/kg, ratones ob/ob, 12 días	13% de disminución en ganancia de peso corporal	Gasto de energía y temperatura corporal incrementada	Atele et al. (2002)
Glycine max (frijol de soya)	Beta-conglicinina, glicinina (globulinas)	23.7% de beta-conglicinina y 21.9% de glicinina, ratones obesos KK-A^y, 4 semanas	10% de disminución en ganancia de peso corporal	Aceleración de beta-oxidación, supresión de síntesis de ácido graso	Ishihara et al (2003)
Undaria pinnatífida (alga marina)	Fucoxantina	2%, KK-A^y con dieta de frijol de soya, 4 semanas	17% de disminución en ganancia de peso corporal	Expresión UCP1 en WAT	Maeda et al. (2005, 2007a,b)
No especificado	Triglicéridos de caedna media (MCT)	Dieta que contiene 64.7% MCT, 24 hombres obesos, 28 días	1.3% de reducción en ganancia de peso corporal	Gasto de energía incrementada	St-Onge et al. (2003a,b), St-Onge y Jones (2002), Papamandjaris et al (1998), Bourque et al. (2003), Geliebter et al. (1983)
Aceite de pescado	EPA y DHA	Ratones C57BL/6 J con 60% de dieta de aceite de pescado que contiene 7% de EPA y 24% de DHA, 5 meses	58% de disminución en la ganancia de peso corporal	Sobrerregulación de UCP2 en hígado	Tsuboyama-Kasaoka et al. (1999)

[a] mg/kg indica una dosis (mg) basada en el peso corporal experimental del animal (kg) y % se refiere a la proporción de la dieta.

[b] El autor recalculó los valores con un asterisco (*) a partir de los datos originales (mostrados como figuras) en cada referencia.

[c] Datos a partir de la primera referencia citada.

2.3 Efectos Estimulantes sobre gasto de energía

Evidencia abundante indica que muchos modelos de roedor sobre obesidad muestran gastos energéticos reducidos, que contribuyen a desarrollar obesidad, mientras que el papel de gasto de energía reducido en la promoción de la obesidad humana es mucho menos claro. Una excesiva adiposidad resulta de un desbalance en la homeostasis energética, en la cual las consecuencias de ingesta de alimento excesiva no están balanceadas con el gasto de energía aumentada (Flatt, 2007; Redinger, 2009). El gasto de energía tiene muchos componentes. Puede separarse en una variedad de diferentes categorías. El esquema más simple divide el gasto de energía en tres categorías: (1) actividad física; (2) gasto energético obligatorio; y (3) termogénesis adaptativa.

Para regular el peso corporal y el gasto energético, el BAT de mamíferos estalece la termogénesis no tamblorosa a través de disipación de exceso de energía como calor (Cannon y Nedergaard, 2004). BAT juega un papel importante en el control de la obesidad al controlar el balance de energía. El jugador clave en este proceso es UCP1, que descarga el gradiente de protones generado en fosforilación oxidativa, disipando así energía como calor. Así, la investigación de sustancias que sobrerregulan la expresión del gen UCP1 puede ser una estrategia notable para lograr el control de obesidad a través de gasto de energía aumentada (Kumar et al., 1999). Un análogo de UCP1, UCP3, es también un potente agente antiobesidad potencial, ya que regula la termogénesis regulada por la hormona tiroidea, antagonistas adrenérgicos beta 3, y/o leptina en algunos órganos Gong et al., 1997). Un ejemplo es el extracto etanólico de Solanum tuberosum, que activa la expresión de UCP3 en BAT y el hígado y reduce significativamente el peso de lípidos en ratas alimentadas con HFD /Yoon et al., 2008).

BAT puede ser reclutado bajo ciertas condiciones. Por ejemplo estudios anteriores han descrito remodelar WAT maduro en células ricas en mitocondria con alta capacidad para oxidación de ácidos grasos (Cinti, 2002; Mercader et al., 2006). Diversos agentes que se encuentran naturalmente, incluyendo ácidos grasos n-3 poliinsaturados y fucoxantina, que es de origen marino, estimulan la termogénesis en BAT y promueven depósitos de WAT in vivo ante la adquisición de características de BAT en roedores (Cabrero et al., 2001; Orci et al., 2004; Flachs et al., 2005; Maeda et al., 2007a). Así, encontrar compuestos naturales que puedan reclutar BAT dentro de WAT puede ser una estrategia útil para el tratamiento de obesidad.

Diversos compuestos naturales han sido propuestos como tratamiento para pérdida de peso a través del gasto de energía incrementado, incluyendo la cafeína (Dulloo, 1993; RAcotta et al., 1994) y capsaicina (Kawada, et al., 1986; Rayalam et al., 2008). Sin embargo, los investigadores atribuyen muchos de estos efectos putativos sobre el gasto de energía al té verde y su extracto, donde las catequinas, tales como EGC y EGCG, han recibido atención importante (Wolfram et al., 2006; Moon et al, 2007). Diversas líneas de evidencia sugieren que EGCG también estimula la termogénesis a través de la inhibición de catecol O-metiltransferasa involucrada en la degradación de norepinefrina (Borchardt y Huber, 1975; Boschmann y Thielecke, 2007; Chante y Lairon, 2002; Rayalam et al., 2008; Thielecke y Boschmann, 2009). Extractos de Pinellia ternate (Kim et al., 2006d) y Panax ginseng (mora) (Attele et al., 2002) también muestran actividad para incrementar gasto de energía (Tabla 3).

El Extracto etanólico de Ilex paraguariensis mejoró la obesidad inducida por HFD a través de la oxidación beta mejorada de ácidos grasos, incrementando la activación de AMPK en tejido adiposo visceral y posteriormente reduciendo la actididad ACC (Pang et al., 2008). La AMPK activa fosforila (inactiva) a ACC y disminuye los niveles de malonil-CoA intracelular, que es el sustrato de

síntesis de ácidos grasos. Al mismo tiempo, la malonil-CoA inhibe la CPT-1, la enzima limitante de la velocidad en la oxidación de ácidos grados por la mitocondria. De acuerdo con esto, estos procesos llevan a la promoción de oxidación de ácidos grasos (Pang et al., 2008).

Fuente	Componente activo	Métodos experimentales[a] (dosis de tratamiento, sujetos, duración del tratamiento)	Actividad principal[b]	Referencias[c]
Garcina cambogia	(-)-ácido hidroxicítrico (HCA)	4 µg/ml, 3T3-L1 adipocito, 8 días	35% eb disminución de la acumulación de lípidos	Kim et al. (2004a)
Pinus densiflora	Extracto acuoso crudo	10 g/kg ratas SD con HFD, 6 semanas	12% de disminución en la ganancia de peso corporal	Jeon y Kim (2006)
Cortidis rhizome	Berberina	5 mg/kg ratones db/bd, 26 días	13% de disminución en el cuerpo corporal	Lee et al. (2006b), Huang et al. (2006a), Hu y Davies (2009)
No especificado (producto de Sigma)	Esculetina	200-800 µM, 3T3-L1 adipocito, 48 h	(1) 200 µM, la apoptosis del preadipocito (2) 800 µM, inhibición de adipogénesis	Yang et al. 2006a
Glycine max (producto de GIBCO)	Genisteína	100 µM 3T3-L1 adipocito, 48 h	Inhibición de la diferenciación preadipocitaria por 60%	Harmon y Harp´(2001), Harmon et al. (2002), Zhang et al. (2009), Kim et al. (2006b), Naaz et al. (2003), Kandulska et al. (1999), Szkudelska et al. (2000)
No especificado (producto de GIBCO)	Naringenina	100 µM, 3T3-L1 adipocito, 48 h	Inhibición de la diferenciación de preadipocitaria por -40%	Harmon y Harp (2001)
No especificado (producto de Sigma)	Quercetina	250 µM, 3T3-L1 adipocito 48 h.	Inhibición de la diferenciación de preadipocitaria por 71.5%,	Hsu y Yan (2006)

Chile (Capsicum)	Capsaicina	3T3-L1 adipocito, 72 h.	(1) inhibición de población IC_{50}= 45 µM (2) Porcentaje de apoptosis: 26.7% a 250 µM	Hsu y Yen (2007)
Agua profunda de mar	Minerales (principalmente Ca y Mg)	Dureza 1000, 3T3-L1 adipocito 72h	27% disminución en la acumulación de lípidos	Hwang et al. (2009b)
Oligosacáridos Chitosan	MW 1-3 kDa	3T3-L1 adipocito 72 h	90% disminución en la acumulación de lípidos	Cho et al. (2008), Rahman et al. (2008a,b), Kim et al. (2006c)
Kochujang (pasta de pimiento rojo fermentado)	No identificado	1mg/ml, 3T3-L1 adipocito, 24h	70-75% disminución en factores de transcripción adipogénica	Ahn et al. (2006)
Aceite de pescado	ácido docosahexaenoico	200 µM, 3T3-L1 adipocito, 4h	90% aumento en la lipólisis	Kim et al. (1999, 2006), Parrish et al. (1990), Flachs et al. (2005)
Aceite de perilla (producto de Ajinomoto. Co. Japón)	Rico en ácido α-linolénico	12% grasa alimenticia, ratas SD, 12 semanas	94% disminución en la acumulación de TG	Okuno et al. (1997)
Aceite de palma	γ-tocotrienol	24 µM, 3T3-L1 adipocito, 21 días	48% disminución en la acumulación de TG	Uto-Kondo et al. (2009)
Sterol (producto de Sigma)	β-sitosterol	16 µM, 3T3-L1 adipocito, 72 h	65% disminución en la diferenciación preadipocitaria	Awad et al. (2000)
Scutellaria belcalensia (producto de Sigma)	Balcaleina	100 µM, 3T3-L1 adipocito, 48h	1.86-vez en la disminución de la acumulación de lípidos	Cha et al. (2006)
Logerstroemia Speciosa L (hoja de plátano)	Extracto de agua caliente (ácido tánico)	0.1-0.25 extracto (20 mg/l ácido tánico), 3T3-L1 adipocito, 48h	No hay diferenciación	Liu et al. (2001, 2005), Bai et al. (2008), Klein et al. (2007)
Undaria pinnalifida (alga	Fucoxantina	15 µM, 3T3-L1 adipocito, 120h	Inhibición de la diferenciación	Maeda et al. (2006)

café)			preadipocitaria por 70%	
Ácidos linoléicos conjugados (CLA)	trans-10, cis-12 CLA	100 µM, 3T3-L1 adipocito, 3 días	36% disminución en la acumulación de TG	Evans et al. (2000), Joseph et al. (2009)
Camelia sinesis (té verde)	(-) epigalocatecina galato	20 µM, 3T3-L1 adipocito, 48 h	Inhibición de diferenciación preadipocitaria por 7-veces*	Ku et al. (2009), Lee et al. (2008b), Sakurai et al. (2009)
Lithospermum erythrortizon	Shikonina	20 µM, 3T3-L1 adipocito, 48h	Inhibición de diferenciación preadipocitaria IC_{50}= 1.1 µM	Lee et al. (2009a)
Panax gingseng	Ginsenosidas	40 µM, 3T3-L1 adipocito, 6 días	40% disminución en la acumulación de TG con ginsenosidas Rg3	Hwang et al. (2009c), Park et al. (2008b), Kim et al (2009a,c)
Alga café	Fucoldán	100 µM, 3T3-L1 adipocito, 24 h	Inhibición de la diferenciación preadipocitaria por 33%	Kim et al. (2009b)
Zizyphus jujuba (fruta)	Extracto de fracción de cloroformo	50 µM, 3T3-L1 adipocito 24 h	Inhibición de actividad GPDH por 80%	Kubota et al. (2009)
Silybum marianum	Silibinina	30 µM, 2 días	60% disminución en la acumulación de TG	Ka et al. (2009)
Compuestos naturales combinados	Genesteína (G), quercentina (Q), resveratrol (R)	50 µM G, 100 µMQ, 100 µM R, 3T3-L1 adipocito, 3 días	92% disminución en la acumulación de lípidos	Park et al. (2008a)
Ajo	Ajoeno	100 µM, 3T3-L1 adipocito, 24h	Inhibición de diferenciación preadipocitaria por 86%	Ambati et al (2009)
Humulus Hupulus	Xantohumol	75 µM, 3T3-L1 adipocito, 24 h	Inhibición de la diferenciación preadipocitaria por 51%	Yang et al. (2007), Mendes et al. (2008)
Langerstroemia speciosa (hoja)	Ellagitannis	0.04-0.5 mg/ml, 3T3-L1 adipocito 24h	Inhibición de la diferenciación preadipocitaria por máx. 100%	Bai et al. (2008)
Ascophyllum	Extracto metanólico	75 µg extracto,	Inhibición de la	Uto-Kondo et

nodosum	acuoso	3T3-L1 adipocito, 8 días	actividad GPDH por 20%	al. (2009)
Espino amarillo	Isorhamnetina	50 µM, 3T3-L1 adipocito, 3 días	2.75 veces disminuido en la acumulación de TG	Lee et al. (2009b)
No especificado	Ácido retinóico	10 µM, preadipocitarios porcinos cultivados, 24 h	Inhibición de la actividad de GPDH por 80%	Suryawan y Hu, 1997
Levadura roja de arroz fermentada por Monoscus ruber	No identificado	2 mg/ml, 3T3-L1 adipocito, 8días	86% disminución en la acumulación de TG	Jeon et al. (2004)
Wasabia japonica (hoja)	No identificado	667 µg/ml, 3T3-L1 adipocito, 6días	Inhibición de la actividad de GPDH por 36%	Ogawa et al. (2009)
Coriolus versicolor (cuerpo de fruta de hongo)	(-)-Ternatina	1.3 µM, 3T3-L1 adipocito, 9 días	87% disminución en la acumulación de TG	Ito et al. (2009)
Cordyceps militaris	Extracto de micelial	0.2%, 3T3-L1 adipocito, 12 días	93.7% disminución en la acumulación de lipidos	Shimada et al. (2008)
Ipomoea batatas (raíz)	Esporamina	0.5 mg/ml, 3T3-L1 adipocito, 5 días	Inhibición de la diferenciación preadipocitaria por 84%	Xiong et al. (2009)
Rosmarinus officinalies	Ácido carnósico	0-10 µM, 3T3-L1 adipocito, 2 días	Inhibición de diferenciación preadipocitaria: IC_{50}= 0.86 µM	Takahashi et al. (2009)
Curcuma longa	Curcumina	50 µM, 3T3-L1 adipocito, 8 días	2-4 veces disminución en la acumulación de TG	Lee et al. (2009c), Ejaz et al. (2009), Miller et al (2008), Wang et al (2009)
Linum usitatissimum (semilla de lino)	(-) Secoisolariciresinol	0.15 µM, 3T3-L1 adipocito, 14 días	Casi 100% disminución en la acumulación de TG	Torminaga et al (2009)
Hibiscus sabdariffa	Extracto de flor	100 µg/ml, 3T3-L1 adipocito, 4 días	50% disminución en la acumulación de TG	Kim et al. (2003)

Solanum tuberasum	Extracto etanólico	0-200 µg/ml, 3T3-L1 adipocito, 24 h	Inhibición de la diferenciación preadipocitaria: IC_{50}= 46.2 µg/ml	Yoon et al. (2008)
Isoflavona de soya	Genisteína	200 µM, 3T3-L1 adipocito	90% inhibición de diferenciación adipocitaria, 43% disminución en la viabilidad adipocito celular	Hwang et al. (2005)
Undaria pinnatifida	Neoxantina	20 µM, 3T3-L1 adipocito	64% reducción en la acumulación de lípidos, 40% reducción en la actividad de GPDH	Okada et al. (2008)
Commiphora mukul	Cis-guggulesterona	200 µM, 3T3-L1 adipocito, 24h	90% disminución en diferenciación adipocito	Yang et al. (2008a)
Rehmannia glutinosa	Extracto etanólico crudo	1 mg/ml, 3T3-L1 adipocito, 48h	2-veces disminución en diferenciación de adipocito	Hang et al. (2008)
Eriobatita japonica	Ácido corosólico	45 µM, 3T3-L1 adipocito	4.17 veces disminución en diferenciación adipocito	Zong y Zhao (2007)
Irvingia gabonesis (semilla)	Extracto	250 µM, 3T3-L1 adipocito, 72 h	81% disminución en la acumulación de TG	Oben et al. (2008)

[a] mg/kg indica una dosis (mg) basada en el peso corporal experimental del animal (kg) y % se refiere a la proporción de la dieta.

[b] El autor recalculó los valores con un asterisco (*) a partir de los datos originales (mostrados como figuras) en cada referencia.

[c] Datos a partir de la primera referencia citada

2.4 Efecto inhibitorio sobre la diferenciación de adipocitos

Los adipocitos juegan un papel central en el mantenimiento de homeostasis de lípidos y balance de energía, al almacenar triglicéridos y liberar ácidos grasos libres en respuesta a demandas cambiantes de energía. Puesto que el crecimiento del tejido de adipocitos puede ser debido tanto a hiperplasia como hipertrofia de adipocitos, diversos estudios que evalúan materiales antiobesidad se han enfocado en procesos de proliferación y diferenciación de

adipocitos (Kim et al., 2006a). En esta búsqueda, las células pre-adipocitarias 3T3-L1 son actualmente usadas como modelo in vitro para el estudio de la obesidad, ya que dichas células acumulan triglicéridos al diferenciarse en el cultivo (Cowhert et al., 1999; Green y Kehinde, 1975). Esto se debe a la expresión de genes específicos para adipocitos, tales como PPARγ y C/EBPα (Wu et al, 1999; Lefterova y Lazar, 200). Por esta razón los productos naturales que específicamente se dirigen a la inhibición de adipogénesis han sido considerados prometedores con respecto a su potencial para el tratamiento de obesidad. Sin embargo, la investigación actual sugiere que la inhibición de adipogénesis o expansión de tejido adiposo no es saludable, llevando a diabetes tipo 2 y otras enfermedades metabólicas como aterosclerosis (Lefterova y Lazar, 2009).

Los ácidos grasos, especialmente poliinsaturados (PUFA) actúan como moléculas transductoras de señal en la diferenciación de adipocitos. En el tejido de adipocitos, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son más fácilmente acilados en triglicéridos que los PUFA (Awad et al., 2000; Evans et al, 2000; Okuno et al., 1997). Reportes recientes han demostrado otro mecanismo interesante, en el extracto del macrohongo micelios de Cordyceps militaris, que suprime la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 a través de activación del receptor de hidrocarburo arilo (Shimada et al., 2008). La Tabla 4 enlista la variedad amplia de productos naturales que inhiben proliferación de pre-adipocitos y/o el efecto apoptótico.

Además de mostrar actividad inhibitoria contra diferenciación de adipocitos, diversos compuestos naturales han mostrado efectos apoptóticos en preadipocitos en maduración. Por ejemplo, algunos fitoquímicos, como esculetina, resveratrol, quercetina, genisteina, EGCG, capsaicina y ácidos linoleicos conjungados indujeron apoptosis de pre-adipocitos 3T3-L1 en maduración a través de la supresión de fosforilación ERK1/2, activación de la vía mitocondrial, activación de AMPK o actividad anti-oxidante Hargrave et al., 2002; Hwang et al., 2005; Hsu y Yen 2006; Yang et al, 2006a, 2008b). Así, el inducir apopotosis en adipocitos maduros puede ser importante para tratar la obesidad con compuestos que ocurren naturalmente.

El ciclo celular está estrechamente asociado con crecimimiento y proliferación de adipocitos y por eso es un factor importante a considerar al enfocarse en productos naturales anti-obesidad. Evidencia reciente ha indicado que ciertos compuestos fenólicos llevan a arrestar el ciclo celular en la fase G1 durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 (ver revisión de Hsu y Yen (2008)). Reportes recientes han mostrado que los compuestos fenólicos también inducen eficientemente la apoptosis en adipocitos 3T3-L1 a través del incremento sinérgico de la expresión en diversos factores proapotóticos (Hwang et al., 2005; Lin et al., 2005). Un tratamiento combinado de ajoeno y ácido linoleico conjugado, incrementó la apoptosis en adipocitos 3T3-L1 maduros a través del aumento sinérgico de la expresión en diversos factores proapotóticos (Rayalam et al, 2008). La sirtuina 1 es otra molécula objetivo para tratamiento de obesidad. La adipogénesis disminuida debido a resveratrol correlacionó con la expresión incrementada de situina 1, que promueve la movilización de grasa al reprimir PPARγ (Picard et al., 2004; Rayalam et al., 2008).

Tabla 5. Biomateriales antiobesidad que promueven el metabolismo de lípidos

Fuente	Componente activo	Métodos experimentales[a] (dosis tratada,	Actividad principal [b]	Mecanismo de acción	Referencias [c]

		sujetos, duración del tratamiento)			
Salacia oblonga (raíz)	Mangiferin	900 mg/kg, ratas ZDF, 28 días	40% de disminución en la proporción de peso hígado/ cuerpo	Activador PPARα hepático	Rong et al. (2006d)
Ilex paraguariensis	Extracto crudo acuoso	0.24%, Ratas SD con HFD, 60 días	11% de disminución en la ganancia de peso corporal	Subregulación de genes de tejido adiposo	Pang et al. (2008)
Mezcla de Morus alba, Melissa officinalis, Artemisia capilaris (hoja)	Extracto crudo acuoso	0.2%, Ratones C57BL/6J con HFD, 12 semanas	7% de disminución en la ganancia de peso corporal	Activador PPARα hepático	Lee et al. (2008a)
Cortidis rhizoma	Berberina	5 mg/kg, ratones db/db, 26 días	13% de disminución en ganancia de peso corporal	Activación de AMPK	Lee et al. (2006b), Huang et al. (2006a)
Nelumbo nucifera (hoja)	Extracto crudo etanólico (flavonoide)	1%, ratones A/J con HFD, 12 semanas	15% de disminución en ganancia de peso corporal	Activación de receptor beta-adrenérgico	Ohkoshi et al (2007)
Curcuma longa L.	Curcumina	1%, ratones ob/ob con HFD, 4 semanas	7% de disminución en ganancia de peso corporal	Reversión de desarreglos metabólicos e inflamatorios	Weisberg et al. (2008), Manjunatha y Srinivasan (2007)
	Curcuminoides	0.2%, ratas SD con HFD, 2 semanas	11% de disminución en ganancia de peso corporal	Alteraciones en el metabolismo de ácido graso	Asai y Miyazawa (2001)
Eucommia ulmoides (hoja)	Extracto crudo etanólico	1%, ratones db/db con HFD, 6 semanas	No hay datos	Subregulación de enzimas lipogénicas	Park et al. (2006a)
Arachis	Extracto crudo	1%, ratas Wistar	12% de	Inhibición	Moreno et al.

hypogaea (corteza)	etanólico	con HFD, 12 semanas	disminución en ganancia de peso corporal	de absorción de grasas, activación de metabolismo de lípidos	(2006)
Coix lachrymajobi var. Mayeun (semilla)	Extracto crudo acuoso	500 mg/kg, ratas SD con HFD, 4 semanas	36%* de disminución en la ganancia de peso corporal	Modulación de leptina y TNF-α	Kim et al. (2004a)
Salacia reticulate (raíz)	Extracto acuoso (compuestos polifenólicos)	125 mg/kg, ratas Zucker obesas, 27 días	7% de disminución en ganancia de peso corporal	Inhibición de enzimas que metabolizan lípidos y estimula-ción de lipólisis	Yoshikawa et al. (2002)
Glycyrrhiza glabra L. (raíz)	Aceite de licor de flavonoide (LFO)	2%, LFO, ratones obesos KK-A^y, 4 semanas	30% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARgamma	Nakagawa et al (2004)
Diospyros kaki (hoja)	Extracto crudo metanólico	5%, ratas SD con HFD, 6 semanas	11% de disminución en la ganancia de peso corporal	Modulación de leptina y enzimas lipogénicas	Lee et al. (2006a)
Morus alba (hoja)	Extracto crudo acuoso	0.5%, ratones db/db, 12 semanas	7% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARs	Park et al. (2005)
Panax ginseng	Extracto crudo acuoso	0.5%, ratones db/db, 12 semanas	8% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARs	Park et al. (2005)
Lagerstroemia speciosa L (hoja)	Extracto crudo acuoso	0.5%, ratones db/db, 12 semanas	3% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARs	Park et al. (2005)
Zea mays	Maíz de color morado(PCC) (antocianinas)	PCC 1.1%, ratones C57BL/6J con HFD, 12 semanas	21%* de disminución en ganancia	Activación de AMPK	Tsuda et al. (2003, 2004); Kong et al.

			de peso corporal		(2003)
Glycyrriza uralensis	Extracto crudo etanólico (flavonoides)	0.2%, ratones C57BL/6J con HFD, 4 semanas	22% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARgamma	Mae et al (2003)
Evodia Rutaecarpa (fruto)	Extracto crudo etanólico (evodiamine)	0.02%, ratas SD con HFD, 21 días	23% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista de receptor vainilloide	Kobayashi et al (2001)
Aralia mandshurica (AM) y Engelhardtia chrysolepis (EC)	Aralox	150 mg/d AM y 150/d mg, EC, 32 mujeres, 15 semanas	4% de disminución en ganancia de peso corporal	Estimulación de lipasa sensible a hormona	Abivod et al (2006)
Commiphora mukul	E- y Z-guggulsterone	4.5 g/d, 40 pacientes, 16 semanas	Reducción en niveles de colesterol y glicéridos en 22, y 27%, respectivamente	Antagonista de receptor de ácido biliar receptor X farnesoide	Urizar y Moore (2003), Verma y Bordia (1988)
Rhynchosia volubilis (frijol de soya negro)	Tripéptido (Ile-Gln-Asn)	10 mg/ml, adipocito 3T3-L1 8 días	IC50= 0.014 mg proteína /ml	Activación de AMPK	Kim et al (2007)
No se especifica	Ginsenosido Rg3	40 um, adipocito 3T3-L1	40%* de reducción en la acumulación de TG	Actividad agonista PPAR gamma	Hwang et al. (2009c),
Frijol de soya	Genisteina+L-carnitina (isoflavona de soya)	0.2% genisteina + 0.5% L-carnitina, ratones C57BL/6J con HFD 12 semanas	254% disminución en la ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARs	Yang et al (2006b)
Coffea canephora	Cafeína, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ácidos feuloquínicos	0.5% ratones ddy con dieta estándar, 14 días	157% de disminución en la ganancia de peso corporal	Inhibición de absorción de grasa, activación de metabolismo de grasa	Shimoda et al. (2006)

Frijol de soya	Beta-conglicinina, glicinina (globulinas)	23.7% Beta-conglicinina y 21.9% glicinina, ratones obesos KK-A^y, 4 semanas	10% disminución en la ganancia de peso corporal	Aceleración de beta oxidación, supresión de síntesis de ácidos grasos	Moriyama et al (2004)
Aceite de pescado	Acido eicosapentaenoico (ácido graso n-3 poliinsaturado)	1 g/kg, ratas Wistar con dieta de cafetería, 5 semanas	9%* de disminución en la ganancia de peso corporal	Subregulación de PPAR gamma, apoptosis en WAT	Pérez-Matute et al. (2007)
Fitoquímicos	Resveratrol (R) Quercetina (Q)	R25 + Q25 uM (R100 + Q100 nM), adipocito 3T3-L1, 6 días	69% de disminución en la acumulación de lípidos (R25 + Q25 uM), 74% disminución en viabilidad de adipocitos (R100 + Q100 nM)	Subregulación de PPAR gamma y C/EBP alfa, apoptosis	Yang et al. (2008b, Ahn et al. (2007ª))
Glycine max (soya) isoflavona	Gentiseina	200 nM, adipocitos 3T3-L1	90% de inhibición de diferenciación de adipocitos	Activación de AMPK/apoptosis de adipocitos	Hwang et al (2005)
Fitoquímicos	Cafeína + arginina + isoflavonas de soya + L-carnitina (CASL)	CASL (250 mg, 6 g, 2 g, 1.5 g/kg) ratones KK con HFD, 3 semanas	5.4% de disminución en la ganancia de peso corporal	Inhibición de lipogénesis en el hígado	Murosaki et al. (2007)
Rubus idaeus (frambuesa)	4-(4-hydroxyfenil) butan-2-ona (RK)	2% RK, ratones ICR con HFD, 10 semanas	17%* de disminución en la ganancia de peso corporal	Lipólisis incrementada	Morimoto et al (2005)
Agua profunda de mar	Minerales (principalmente Ca y Mg)	Agua profunda de mar de dureza 1000, ratones ob/ob, 84 días	7% de disminución en ganancia de peso corporal	Activación de GLUT y AMPK	Hwang et al (2005)
Quitosano	No se especifica	3 g/día, adultos humanos con	22% de disminución	Disminución en	Kaats et al. (2006)

		sobrepeso, 8 semanas	en la ganancia de peso corporal	absorción de grasas	
Quitosano oligosa-cáridos	MW 125-145 kD	2%, ratas Wistar, 4 semanas	9% de disminución en la ganancia de peso corporal	Disminu-ción en absorción de grasas	Bondiolotti et al. (2007)
	MW 3-5 kD	200 mg/kg ratones ob/ob, 28 días	12% de disminución en la ganancia de peso corporal	Subregula-ción de genes relacionado s con obesidad	Kumar et al. (2009)
Palatinosa		55.7% palatinosa, 23.9% dextrina ramificada, ratas SD con mordida estándar, 8 semanas	237% de disminución en la ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPARs	Matsuo et al (2005)
Levano		10% ratas SD con HFD, 4 semanas	160% de disminución en ganancia de peso corporal	Actividad agonista PPAR alfa	Kang et al (2006)
No especificad o	Oleoiletano-lamida	5 mg/kg, ratas Wistar con HFD, 2 semanas	3.6%* de disminución en cambio de peso corporal	Actividad agonista PPAR alfa	Guzmán et al (2004), Fu et al. (2005)
No especificad o	Ácido linoleico conjugado PEGilado (PCLA)	200 uM PCLA, adipocitos 3T3-L1, 72 h	80% de incremento en lipólisis corporal	Actividad agonista PPAR gamma	Moon et al (2006)
No especificad o	Ácido linoleico conjugado (CLA)	1.5% CLA, ratones C57B/6 con HFD, 6 semanas	52%* de disminución en ganancia de peso corporal	Inhibición de captación en adiposo	Liu et al (2007) , Lin et al. (2001), Li et al (2008a), lei et al. (204), Wang y Jones (2004)
Solanum tuberosum	Extracto crudo etanólico	200 mg/kg, ratas SD, 4 semanas	5%* de disminución en ganancia de peso corporal	Subregula-ción de P38, MAPK y sobreregu-lación de UCP3	Yoon et al (2008)

Momordica charantia	Extracto crudo etanólico	0.2 mg/ml, pre-adipocitos 3T3-L1	61% de incremento en captación de glucosa con 0.5 nM de insulina y 75% de incremento en secreción de adiponectina	Captación de glucosa mejorada y secreción de adiponectina	Roffey et al (2007)
Toona sinensis (hoja)	Extracto crudo etanólico	0.1 mg/ml, pre-adipocitos 3T3-L1, 6h	156% de incremento en liberación de glicerol	Actividad lipolítica	Hsu et al (2003)
Cinnamoni cassiae (hoja)	Canela	0.6 mg/ml, pre-adipocitos 3T3-L1, 5 días	3.1 veces incremento en niveles de PPAR gamma	Actividad agonística de PPAR gamma	Sheng et al (2008)

[a] mg/kg indica una dosis (mg) basada en el peso corporal experimental del animal (kg) y % se refiere a la proporción de la dieta.

[b] El autor recalculó los valores con un asterisco (*) a partir de los datos originales (mostrados como figuras) en cada referencia.

[c] Datos a partir de la primera referencia citada.

2.5 Efecto regulatorio sobre el metabolismo de lípidos

El objetivo farmacológico de la lipólisis puede visualizarse de dos formas diferentes. La primera estrategia conlleva estimular la hidrólisis de triglicéridos con el fin de disminuir almacenamiento de grasa, combatiendo así la obesidad. Esta opción requiere la oxidación asociada de los ácidos grasos recientemente liberados y llevó al desarrollo de agonistas β3-adrenérgicos (Langin, 2006). Sin embargo, considerando que una lipólisis excesiva contribuye a niveles de ácidos grasos elevados en la circulación y desarrollo de dislipidemia, (como se observa en el síndrome metabólico), una obstrucción de tal liberación de ácidos grasos puede ser de interés terapéutico (Langin, 2006). Algunos ejemplos de compuestos naturales involucrados en la activacion de receptor beta-adrenérgico son varios flavonoides en las hojas de Nelumbo nucífera (NN). A través de esta vía, la suplementación dietética con extracto de NN resultó en supresión significativa de ganancia de peso corporal en ratones A/J alimentados con HFD (Ohkoshi et al., 2007).

PPARγ es un factor de transcripción predominantemente expresado en tejido adiposo, y activa la diferenciación de adipositos in vivo e in vitro (Cornelius et al., 1994). Cuando el PPARγ se sobreexpresa, comienza la inducción de preadipocito 3T3-L1. Esto sugiere que la supresión de PPARγ bloquea la adipogénesis y la lipogénesis (Kefterova y Lazar, 2009). Así, el agonismo de PPARγ lleva a la disminución de anormalidades lipídicas en pacientes con dislipidemia. Hallazgos a partir de diversos estudios en roedores han demostrado que los agonistas PPARγ pueden mejorar

la resistencia a insulina, así como la dislipidemia. Concomitantemente, los modelos de enfermedad en roedor han demostrado que los agonistas de PPARγ previnieron la adiposidad incrementada y el peso corporal sin una reducción de ingesta de alimento (Kersten 2002). Similarmente, la activación de PPARα reguló la expresión de genes que regulan la oxidación de lípidos. Un extracto acuoso de raíz de Salacia oblonga (componente activo principal, magniferina) ha demostrado propiedades activadoras de PPARα, que después mejoraron la esteatosis hiperlipidémica y hepática en un modelo animal de obesidad genética (Huang et al., 2006b). Además, una mezcla de tres extractos mejoró el metabolismo de lípidos al incrementar los niveles de ARNm hepático de PPARα, la enzima objetivo responsable de la oxidación beta de ácidos grasos (Lee et al., 2008a).

La AMPK es una enzima encontrada en numerosos tejidos a través del cuerpo. Se ha caracterizado como un interruptor maestro metabólico que regula las actividades de diversas proteínas objetivo que controlan el metabolismo. El papel de la AMPK en el músculo esquelético ejercitado ha sido estudiado ampliamente. En términos amplios, la activación de AMPK en el músculo esquelético parece incrementar el transporte de glucosa (Hayashi et al., 2000) y oxidación de ácido graso (Winder y Hardie, 1999; Ruderman et al., 1999). Uno de los objetivos mejor caracterizados de activación por AMPK en el músculo esquelético es ACC. Los fosforilatos activados por AMPK inhiben esta acción (Saha y Ruderman 2003). El ACC en cambio cataliza síntesis de malonil CoA, un inhibidor potente de CPT-1, que controla la entrada de ácidos grasos en la mitocondria. Ahí, los ácidos grasos pueden ser oxidados o convertidos a cuerpos cetónicos (en el hígado) para uso como combustible en otros órganos (Flier, 2004). Así, el resultado neto de esta cadena de eventos es que un incremento en la AMPK muscular lleva a un incremento en CPT-1 y en la oxidación de ácidos grasos. La tabla 5 resume los diversos activadores de AMPK naturales que han sido encontrados.

Tomoda et al. (2002) contribuyeron al descubrimiento de metabolitos microbianos novedosos que muestran actividad inhibitoria en contra del metabolismo de lípidos, particularmente aquellos que afectan las vías metabólicas de ácidos grasos y colesterol. Ellos descubrieron numerosos compuestos, incluendo cerulenina, thiotetromicina, clorogentisilquinina y los boverolides, piripiropenos, terpendoles y ferroverdinas (Tomoda et al., 2002). Estos compuestos funcionan como inhibidores de la sintasa de ácidos grasos (cerulenina) inhibidores de acil-CoA sintasa (triacsina C), e inhibidores de HMG-CoA sintasa (himglusina).

La actividad del té oolong es un buen ejemplo de otro mecanismo antiobesidad. La cafeína, uno de los principales componentes bioactivos del té oolong, posee una carga positiva y un área hidrofóbica como la adrenalina. El mecanismo de la cafeína de acción lipolítica puede deberse a su unión a grupos fosfato de fosfolípidos y las interacciones subsecuentes entre la lipasa y las porciones de triglicéridos de gotas de lípido, favoreciendo la lipólisis (Han et al., 1999b).

Tabla 6. Otros Biomateriales antiobesidad cuyos mecanismos no están identificados

Fuente	Componente activo	Métodos experimentales [a] (dosis tratada, sujetos, duración del tratamiento)	Actividad principal [b]	Referencias [c]

Hibiscus sabdariffa	Antocianina crudas	120 mg/kg, ratones ob/MSG 60 días	10% de disminución en la ganancia de peso corporal	Alarcon-Aguilar et al. (2007)
Panax ginseng (mora)	Extracto crudo etanólico	150 mg/kg, ratones ob/ob, 12 días	11% disminución de ganancia de peso corporal	Dey et al., (2003)
Trigonella foenum graecum (semilla)	Extracto crudo etanólico	350 mg/kg, ratones con HFD, 22 días	14%* disminución de ganancia de peso corporal	Handa et al (2005)
Acantopanax senticosus (corteza de tallo)	Extracto crudo acuoso	500 mg/kg, ratas C57BL/6J con HFD, 12 semanas	4%* de disminución en ganancia de peso corporal	Cha et al (2004), Park et al (2006b)
Ginseng	Extracto crudo etanólico	500 mg/kg, ratas ICR con HFD, 8 semanas	16% de disminución en ganancia de peso corporal	Yun et al (2004)
Cissus quadrangularis	Extracto estandarizado (fitosteroles)	Dos dosis diarias (514 mg cada uno), personas obesas, 8 semanas	23% de disminución en ganancia de peso corporal	Oben et al. (2006, 2007)
Panax quinquefolium L. (mora)	Extracto crudo acuoso (ginsenósidos)	0.6 ml/kg (jugo), ratones ob/ob, 10 días	250% de disminución en ganancia de peso corporal	Xie et al. (2007)
Eucommia ulmoides (hoja)	Extracto crudo acuoso	10 mg/ml, adipocitos hMSC, 7 días	1/12 de disminución en acumulación de TG	Lee et al. (2004)
Aislado de protein de soya (SPI)	No se especifica	41.1%, ratones amarillos KK con dieta restringida de energía, 4 semanas	20% de disminución en ganancia de peso corporal	Aoyama et al. (2000)
Pigmento carotenoides	Astaxantina	30 mg/kg, ratones ddy con HFD, 60 días	15%* de disminución en ganancia de peso corporal	Ikeuchi et al. (2007)
Hongos	Isaria sinclairii	41.1%, ratones Zucker (fa/fa), 17 semanas	17% de disminución en acumulación de TG	Ahn et al. (2007b)

[a] mg/kg indica una dosis (mg) basada en el peso corporal experimental del animal (kg) y % se refiere a la proporción de la dieta.

[b] El autor recalculó los valores con un asterisco (*) a partir de los datos originales (mostrados como figuras) en cada referencia.
[c] Datos a partir de la primera referencia citada.

2.6 *Efecto combinado para tratamiento de la obesidad*

Como se mencionó anteriormente, muchos productos naturales muestran actividades antiobesidad en diversos mecanismos. Probablemente el alcance recomendado para investigar tratamientos para obesidad en forma más eficiente y lograr efectos sinérgicos de productos naturales debería ser buscar tratamientos usando múltiples productos o productos que tengan actividades múltiples (Rayalam et al., 2008).

Algunos biomateriales naturales que poseen actividades antiobesidad multifuncional han sido descubiertos. El té verde y la Garcina cambogia son buenos ejemplos. Los investigadores originalmente encontraron que el té verde posee actividad antioxidante más alta que actividad antiobesidad, debido a su alta concentración de catequinas, incluyendo epicatequina, ECG y EGCG. Investigación posterior probó la actividad antiobesidad de catequinas resultado de las acciones combinadas de reducción de apetito, mayor actividad lipolítica y gasto de energía, y menos actividad lipogénica y diferenciación de adipocitos (Boschmann y Thielecke, 2007; Chantre y Lairon, 2002; Dulloo et al., 1999; Hsu y Yen, 2006; Kao et al., 2000; Lin y Lin-Shiau, 2006; Moon et al., 2007; Nagao et al, 2005; Thielecke y Boschmann, 2009; Wolfram et al., 2006). G. Cambogia es ampliamente conocida por su actividad antiobesidad (Heymsfield et al., 1998; Kim et al., 2004a). Su extracto comercialmente disponible se deriva de la fruta seca del árbol de G. cambogia, que crece en los bosques del sur de India y Sureste asiático. Su principal ingrediente activo es el ácido (-)-hidroxicítrico (Kim et al., 2006a). G. cambogia previene el metabolismo de carbohidrados en grasas al inhibir la lipogénesis, quemando exceso de grasas y suprimiendo el apetito (Kim et al., 2004a).

El extracto acuoso de Hibiscus sabdariffa (que contiene principalmente antocianinas) ha exhibido muchos mecanismos potenciales antiobesidad, incluyendo efectos antihiperglucémicos, reducción de nivel de colesterol plasmático, inhibición de la lipasa pancreática y gástrica, estimulación de termogénesis, inhibición de acumulación de gotas de lípido en células grasas (sin afectar la conversión adiposa), e inhibición de la sintasa de ácidos grasos (Alarcon-Aguilar et al., 2007). El extracto de *G. cambogia* (componente activo, ácido hidroxicítrico) también ha desplegado efectos antiobesidad multifuncionales. La investigación ha mostrado que inhibe la diferenciación de adipocitos, reduce la síntesis de ácidos grados, lipogénesis y acumulación de grasa apididimal a través de la reducción de la actividad de la ATP-citrato liasa, y suprime el apetito (Kim et al., 2004a; Saito et al., 2005). Ha estado en el mercado por 10 años si ningún efecto adverso (Ohia et al., 2002; Saito et al., 2005).

El extracto de granada (componentes activos, ácido elágico y ácido tánico) también tiene efectos antiobesidad duales, en cuanto a que inhibe la actividad de la lipasa pancreática y suprime la ingesta energética. Su efecto sobre la ingesta energética fue similar a la sibutramina, pero con un diferente mecanismo (Lei et al., 2007). En ratas obesas, la suplementación con extracto acuoso de Pinellia ternate indujo termogénesis incrementada en BAT (es decir, expresión de UCP1 incrementada) y oxidación de ácido graso (PPAR alfa activado) en WAT (Kim et al., 2006d). Los extractos de té verde también ejercen actividades antiobesidad en dos formas: por inhibición de la

lipasa y estimulación de termogénesis (Chantre y Lairon, 2002). El extracto de cáscara de cacahuate (Arachis hypogaea) contribuye a inhibir la absorción de grasas en el tracto digestivo, activando el metabolismo de lípidos en el hígado, y reduciendo la lipólisis de adipocitos (Moreno et al., 2006). La hoja de *Nelumbo nucifera* posee múltiples actividades antiobesidad, incluyendo inhibición de absorción de lípidos y carbohidratos y aceleración del metabolismo de lípidos y gasto de energía (Ono et al., 2006). La cetona de frambuesa ejerce efecto antiobesidad a través de incrementar la lipólisis inducida por norepinefrina en WAT e incrementar la termogénesis en BAT (Morimoto et al., 2005). Un estudio encontró que una hierba de la India, Salacia, tiene objetivos de reducción de obesidad múltiples tanto por la modulación de la transcripción de gen lipogénico mediado por PPARa y señalización del receptor de angiotensina II tipo 1 y también inhibiendo la lipasa pancreática y la alfa-glucosidasa (Li et al., 2008b). Diversos ácidos grasos poliinsaturados también muestran combinaciones de acciones antiobesidad, incluyendo sobrerregulación de biogénesis mitocondrial, inducción de beta-oxidación, y supresión de lipogénesis de adipocitos (Flachs et al., 2005). Tomados juntos, las terapias de combinación empleando productos naturales que pueden dirigirse a diferentes genes de obesidad y/o diferentes etapas del ciclo de vida de adipocitos, pueden probar beneficios en el tratamiento de la obesidad.

Finalmente, la Tabla 6 enlista otros productos naturales antiobesidad cuyos mecanismos de acción no están definidos aún.

3. Conclusiones

El tratamiento farmacológico antiobesidad debe administrarse sólo cuando se considera seguro y efectivo para el sujeto obeso. Durante treinta años, pocos fármacos para el tratamiento de la obesidad han sido desarrollados o aprobados. Sólo dos fármacos se encuentran disponibles actualmente y algunos fármacos han sido retirados del mercado debido a efectos secundarios serios. La sibutramina y el orlistat pueden causar pérdida de peso de hasta el 10% cuando se usan en combinación con terapia dietética, conductual y de ejercicio. Existe la necesidad de fármacos antiobesidad que tengan mayor efectividad, que sean mejor tolerados. En el futuro, la exploración activa de muchas fuentes naturales puede proporcionar esperanza para nuevos desarrollos basados en un entendimiento creciente de los mecanismos fisiológicos altamente redundantes y complejos involucrados en la regulación del contenido de grasa corporal. Idealmente, tal exploración e investigación llevará a tratamientos más seguros y más eficaces para la obesidad. Cabe destacar que la FDA de los Estados Unidos es particularmente sensible a temas antiobesidad. Además, cualquier medicina antiobesidad que entra al mercado se convierte inmediatamente en objeto de abuso y sobredosis.

Reconocimientos

Esta investigación fue apoyada por el Programa de Investigadores de Media Carrera a través de la National Research Foundation de Corea (NRF) y fundada por el Ministerio de la Educación, Ciencia y Tecnología (Número de Concesión R01-2008-00-10277-0). El autor también desea agradecer a la Srita J.S. Lee y a la Srita. H.S. Hwang por su útil recolección y arreglo de literatura.

Phytochemistry 71 (2010) 1625–1641

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

Review

Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review

Jong Won Yun *

Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 September 2009
Received in revised form 15 June 2010
Available online 21 August 2010

Keywords:
Adipocyte
Anti-obesity
Appetite suppressant
Energy expenditure
Lipase inhibition
Lipid metabolism

ABSTRACT

Obesity is associated with many diseases, particularly diabetes, hypertension, osteoarthritis, and heart disease. The obesity incidence has increased at an alarming rate in recent years, becoming a worldwide health problem, with incalculable social costs. Two different obesity-treatment drugs are currently on the market: orlistat, which reduces intestinal fat absorption via inhibiting pancreatic lipase; and sibutramine, an anorectic or appetite suppressant. Both drugs have hazardous side-effects, including increased blood pressure, dry mouth, constipation, headache, and insomnia. For this reason, a wide variety of natural materials have been explored for their obesity treatment potential. These are mainly complex products having several components with different chemical and pharmacological features. This review aimed to survey the literature covering natural products with anti-obesity activity and to review the scientific data, including experimental methodologies, active components, and mechanisms of action against obesity.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction 1625
2. Natural materials for treatment of obesity 1626
   2.1. Lipase inhibitory effect 1626
   2.2. Suppressive effect on food intake 1628
   2.3. Stimulatory effects on energy expenditure 1629
   2.4. Inhibitory effect on adipocyte differentiation 1630
   2.5. Regulatory effect on lipid metabolism 1632
   2.6. Combined effect for obesity treatment 1635
3. Conclusions 1636
   Acknowledgements 1636
   References 1636

1. Introduction

On a global scale, obesity has reached epidemic proportions and is a major contributor to the global burden of chronic disease and disability. Currently, more than one billion adults worldwide are overweight and at least 300 million of them are clinically obese (WHO, 2009).

Two different types of obesity-treatment drugs are currently available on the market (Chaput et al., 2007). One of these is orlistat (Xenical), which reduces intestinal fat absorption through inhibition of pancreatic lipase (Ballinger and Peikin, 2002; Drew et al., 2007; Hutton and Fergusson, 2004; Thurairajah et al., 2005). The other is sibutramine (Reductil), which is an anorectic,

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, adenosine 5′-monophosphate-activated protein kinase; BAT, brown adipocyte tissue; C/EBP, CCAAT enhancer binding protein; CNS, central nervous system; CPT, carnitine palmitoyltransferase-1; DHA, docosahexaenoic acid; ECG, (−)-epicathin-3-gallate; EGG, (−)-epigallocatechin; EGCG, (−)-epigallocatechin-3-gallate; EPA, eicosapentaenoic acid; ERK, extracellular signal-regulated kinases; FA, fatty acid; GLUT, glucose transporter; GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; HFD, high fat diet; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; IC_{50}, the half maximal inhibitory concentration (with triolein as a lipase substrate); MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCH, melanin-concentrating hormone; PPAR, peroxisome-proliferator activated receptor; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RQ, respiratory quotient; TG, triglyceride; TNF, tumor necrosis factor; UCP, uncoupling protein; WAT, white adipocyte tissue.

* Tel./fax: +82 53 850 6559.
E-mail address: jwyun@daegu.ac.kr

0031-9422/$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.phytochem.2010.07.011

or appetite suppressant (Lean, 2001; Poston and Foreyt, 2004; Tziomalos et al., 2009). Both drugs have side-effects, including increased blood pressure, dry mouth, constipation, headache, and insomnia (de Simone and D'Addeo, 2008; Karamadoukis et al., 2009; Slovacek et al., 2008; Thurairajah et al., 2005). A number of anti-obesity drugs are currently undergoing clinical development, including centrally-acting drugs (e.g. radafaxine and oleoyl-estrone), drugs targeting peripheral episodic satiety signals (e.g. rimonabant and APD356), drugs blocking fat absorption (e.g. cetilistat and AOD9604), and human growth hormone fragments (Halford, 2006; Melnikova and Wages, 2006).

At present, because of dissatisfaction with high costs and potentially hazardous side-effects, the potential of natural products for treating obesity is under exploration, and this may be an excellent alternative strategy for developing future effective, safe anti-obesity drugs (Mayer et al., 2009; Nakayama et al., 2007; Park et al., 2005). A variety of natural products, including crude extracts and isolated compounds from plants, can induce body weight reduction and prevent diet-induced obesity. Therefore, they have been widely used in treating obesity (Han et al., 2005a; Moro and Basile, 2000; Rayalam et al., 2008).

A wealth of information indicates numerous bioactive components from nature are potentially useful in obesity treatments. A good example of such is the polyphenols. These show strong anti-obesity activity and include apigenin, genistein, and the catechins (Rayalam et al., 2008; Thielecke and Boschmann, 2009; Wolfram et al., 2006).

To date, despite the appearance of several excellent reviews of anti-obesity agents in the literature, no reviews have focused on summarizing real, natural-product data on anti-obesity activity, active compound types, and mechanisms of action. In 2000, Moro and Basile reviewed the use of certain well-known medicinal plants that had claimed to be useful in treating obesity (Moro and Basile, 2000). Five years later, Han et al., 2005a reviewed the anti-obesity effects of natural products from more diverse sources. More recently, the review of anti-obesity phytochemicals by Rayalam et al. (2008) focused on adipocyte life cycle regulation. However, these reviews do not provide updates from the literature regarding various natural products that have anti-obesity effects.

Therefore, in this review, we surveyed natural products with anti-obesity potential and reviewed the scientific data, including experimental methodologies, active components, and mechanisms of action against obesity. A growing body of evidence indicates that natural products having anti-obesity effects can be arranged into five categories based on their distinct mechanisms; they produce (1) decreased lipid absorption, (2) decreased energy intake, (3) increased energy expenditure, (4) decreased pre-adipocyte differentiation and proliferation, or (5) decreased lipogenesis and increased lipolysis. Therefore, in this review, we addressed naturally-occurring compounds possessing anti-obesity activity addressed by categorizing them per these mechanisms.

2. Natural materials for treatment of obesity

2.1. Lipase inhibitory effect

Among treatments for obesity, one of the most promising strategies in the effort to reduce energy intake through gastrointestinal mechanisms, without altering the central mechanisms, is the development of nutrient digestion and absorption inhibitors (Birari and Bhutani, 2007). Dietary fat is not directly absorbed by the intestine unless the fat has been subjected to the action of pancreatic lipase. Therefore, pancreatic lipase is one of the most widely studied mechanisms for determining natural products' potential efficacy as anti-obesity agents (Birari and Bhutani, 2007).

Pancreatic lipase is a key enzyme in dietary triacylglycerol absorption, hydrolyzing triacylglycerols to monoacylglycerols and fatty acids. Only a few substances interact directly with the lipases themselves. One example is tetrahydrolipstatin (orlistat), a derivative of the naturally-occurring lipase inhibitor produced from *Streptomyces toxytricini* (Ballinger and Peikin, 2002). Orlistat's lipase inhibition mechanism acts through a covalent bond to the lipase's active site serine (Hadváry et al., 1988, 1991; Tsujita et al., 2006). Although this pancreatic lipase inhibitor is clinically approved for obesity treatment, orlistat has certain unpleasant gastrointestinal side-effects (Karamadoukis et al., 2009; Thurairajah et al., 2005). These side-effects result from orlistat's mode of action and include oily spotting, liquid stools, fecal urgency or incontinence, flatulence, and abdominal cramping (Chaput et al., 2007). Therefore, researchers are screening novel inhibitors, derived from plants or other natural sources, that lack some of these unpleasant side-effects (Birari and Bhutani, 2007).

Natural products provide a vast pool of pancreatic lipase inhibitors with potential for being developed into clinical products. Birari and Bhutani, 2007 reviewed various extracts and secondary metabolites, derived from plants and microorganisms, that have pancreatic lipase inhibitory activity. Drug development programs should focus on these extracts and metabolites.

A wide variety of plants possess pancreatic lipase inhibitory effects, including *Panax japonicus* (Han et al., 2005b), *Platycodi radix* (Han et al., 2000), *Salacia reticulata* (Kishino et al., 2006), *Nelumbo nucifera* (Ono et al., 2006), and so on (see Table 1 for details). These pancreatic lipase inhibitory phytochemicals include mainly saponins, polyphenols, flavonoids, and caffeine (Kim and Kang, 2005; Han et al., 2006; Moreno et al., 2006; Shimoda et al., 2006).

Several carbohydrates also possess pancreatic lipase inhibitory effects (Takao et al., 2006). For example, when researchers fed experimental animals a high-fat diet containing 7–15% chitin/chitosan, fat excretion in the feces increased, resulting in reduced body weights (Han et al., 2005a). However, the effects these carbohydrates have on body weight reduction in animals and humans are controversial (Bondiolotti et al., 2007; Gades and Stern, 2003, 2005; Gallaher et al., 2002; Han et al., 1999a; Hayashi and Ito, 2002; Ho et al., 2001; Kaats et al., 2006; Sumiyoshi and Kimura, 2006). We recently found a distinct body weight reduction in *ob/ob* mice fed on chitosan oligosaccharides; proteome analysis of mouse plasma before and after these treatments suggested chitosan oligosaccharide's molecular actions (Kumar et al., 2009). The expression of many genes is altered significantly during the anti-obesity effect, in response to the chitosan oligosaccharide in the diet (Kumar et al., 2009).

Many metabolites from microorganisms, including lipstatin from *Streptomyces toxytricini* (Weibel et al., 1987), panclicins from *Streptomyces* sp. NR0619 (Mutoh et al., 1994; Yoshinari et al., 1994), valilactone and ebelactones from *Streptomyces albolongus* (Kitahara et al., 1987; Umezawa et al., 1980), esterastin from *Streptomyces lavendulae* (Umezawa et al., 1978), caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* (Tomoda et al., 2002), vibralactone from *Boreostereum virans* (Liu et al., 2006), and percyquinin from *Basidiomycete stereum complicatum* (Bitou et al., 1999) also possess pancreatic lipase inhibitory activity. Moreover, certain fruiting bodies or mycelia of macrofungi reportedly possess lipase inhibitory activity (Ahn et al., 2007b; Slanc et al., 2004).

Some of the most widely-studied materials among the many natural sources of pancreatic lipase inhibitors are the different types of tea (e.g. green, oolong, and black tea). A significantly different type of polyphenols (e.g. L-epicatechin, ECG, EGG, and EGCG), isolated from tea leaves, showed strong inhibitory activity against pancreatic lipase (Han et al., 1999b; Lin and Lin-Shiau, 2006; Nakai et al., 2005; Thielecke and Boschmann, 2009). These polyphenols require galloyl moieties within their chemical

Table 1
Anti-obesity biomaterial compounds showing inhibition of pancreatic lipase.

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	References[c]
Juniperus communis (bark) and *Illicium religiosum* (wood)	Crude ethanol/water extract	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 20.4 and 21.9 μg/ml, respectively	Kim and Kang (2005)
Panax japonicus (rhizomes)	Chikusetsusaponins	3%, ICR mice with HFD, 5 weeks	22%* decrease in body weight gain	Han et al. (2005b)
Platycodi radix	Platycodin saponins	70 mg/kg, SD rats with HFD, 4 weeks	13% decrease in body weight gain	Zhao et al. (2005); Zhao and Kim (2004); Han et al. (2002) Xu et al. (2005)
Platycodi radix	Crude aqueous/ethanolic extract (saponin)	5%, ICR mice with HFD, 8 weeks	12%* decrease in body weight gain	Han et al. (2000)
Acanthopanax senticosus (stem bark)	10.6% ellagic acid	800 mg/kg, ICR mice with HFD, 5 weeks	54%* decrease in body weight gain	Lei et al. (2007); Han et al. (2000)
Thea sinensis (oolong tea)	Crude aqueous extract (caffeine)	5%, ICR mice with HFD, 10 weeks	10%* decrease in body weight gain	Han et al. (1999b)
Cassia mimosoides	Prodelphinidin	Inhibitory activity of pancreatic lipase; 2.5%, SD rats with HFD, 8 weeks	IC_{50} = 0.11 mg/ml; 60%* decrease in body weight gain	Yamamoto et al. (2000)
Kochia scoparia (fruits)	Crude aqueous extract (saponins)	3%, ICR mice with HFD, 9 weeks	19%* decrease in body weight gain	Han et al. (2006)
Aframomum melegueta, *Spilanthes acmella*	Crude ethanolic extract	2 mg/ml, inhibitory activity of pancreatic lipase	90%, 40% lipase inhibition, respectively	Ekanem et al. (2007)
Salacia reticulate (mixed with cyclodextrin)	Crude aqueous extract	0.5%, SD rats with HFD, 8 weeks	27% decrease in body weight gain	Kishino et al. (2006)
Thea sinensis (leaf)	Saponin	0.5%, ICR mice with HFD, 11 weeks	17%* decrease in body weight gain	Han et al. (1998b, 2001)
Nelumbo nucifera (leaf)	Crude ethanolic extract	5%, ICR mice with HFD, 5 weeks	28%* decrease in body weight gain	Ono et al. (2006)
Trigonella foenum graecum L. (seed)	Crude ethanolic extract	0.3%, ddY obese mice, 22 days	14%* decrease in body weight gain	Handa et al. (2005)
Salix marsudana (leaf)	Poly phenol (PP)	5% PP, Wistar King rats with HFD, 9 weeks	20%* decrease in body weight gain	Han et al. (2003a,b)
	Flavonoid glucoside	5%, rats of ICR strain with HFD, 9 weeks	19%* decrease in body weight gain	Han et al. (2003b)
Vitis vinifera	Crude ethanolic extract	1 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 8 days	Inhibitory effect on lipase activity = 80%	Moreno et al. (2003)
Eriochlon villosa	Crude methanolic extract	0.2 mg/ml, inhibitory activity of pancreatic lipase	Inhibitory effect on lipase activity = 83%	Sharma et al. (2005)
Orixa japonica	Crude methanolic extract	0.2 mg/ml, inhibitory activity of pancreatic lipase	Inhibitory effect on lipase activity = 81%	Sharma et al. (2005)
Salvia officinalis L. (leaf)	Methanolic extract (carnosic acid)	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 36 μg/ml	Ninomiya et al. (2004)
Setaria italic	Crude methanolic extract	0.2 mg/ml, inhibitory activity of pancreatic lipase	Inhibitory effect on lipase activity = 80%	Sharma et al. (2005)
Scabiosa tschiliensis Grun.	Triterpenoid saponins	Inhibitory activity of pancreatic lipase	Maximum activity; almost 100% with prosapogenin 1B (1 mg/ml)	Zheng et al. (2004)
Acanthopanax sessiliflorous	Lupane-type saponins	0.5%, ICR mice with HFD, 4 weeks	40%* decrease in body weight gain	Yoshizumi et al. (2006)
Aesculus turbinate (seed)	Escin	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 14 μg/ml with escin IIb	Kimura et al. (2006)
Cyclocarya paliurus (Batal) Iljinskaja	Crude aqueous extract	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 9.1 μg/ml	Kurihara et al. (2003)
Cassia nomame	Flavan dimers	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 5.5 μM with (2S)-3′,4′,7-trihydroxyflavan-(4α → 8)-catechin	Hatano et al. (1997)
Gardenia jasminoides (fruchis)	Crocin, crocetin	Inhibitory activity of pancreatic lipase; 50 mg/kg/d, Triton WR-1339-induced hyperlipidermic mice, 5 weeks	IC_{50} = 2.1 mg/ml with crocetin; 25%* decrease in body weight gain with crocin	Lee et al. (2005); Sheng et al. (2005)
Dioscorea nipponica	Crude methanolic extract	5%, SD rats with HFD, 8 weeks	IC_{50} = 5–10 μg/ml, 37% decrease in body weight gain	Kwon et al. (2003)
Coffea canephora	Caffeine, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, feruloyquinic acids	0.5%, ddy mice with standard diet, 14 days	157% decrease in body weight gain	Shimoda et al. (2006)
Peptide	ε-Polylysine	0.4%, C57Bl/6 mice with HFD, 60 days	29%* decrease in body weight gain	Tsujita et al. (2006)
Glycyrrhiza uralensis	Licochalcone A	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 35 μg/ml, K_i = 11.2 μg/ml	Won et al. (2007)
Chitosan	Not specified	3 g/day, human overweight adults, 8 weeks	22% decrease in body weight gain	Kaats et al. (2006)
	MW 125–145 kD	2%, Wistar rats, 4 weeks	9% decrease in body weight gain	Bondolotti et al. (2007)
	MW 46 kDa	300 mg/kg, C57Bl/6J mice with HFD, 10 weeks	14%* decrease in body weight gain	Sumiyoshi and Kimura (2006)

(continued on next page)

Table 1 (*continued*)

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	References[c]
Chitosan–chitin	Chitosan (80%), chitin (20%)	15%, ICR mice with HFD, 9 weeks	143%* decrease in body weight gain	Han et al. (1999a), Gades and Stern (2003, 2005), Gallaher et al. (2002)
Manno-oligosaccharides		1%, ICR mice with HFD, 12 weeks	40% decrease in hepatic triglyceride, no body weight change	Takao et al. (2006)
Levan		10%, SD rats with HFD, 4 weeks	160% decrease in body weight gain	Kang et al. (2006)
Fungus, *Laetiporus sulphureus*	Mycelia extract	2 mg/ml fungal extract, lipase activity	Inhibitory effect on lipase activity = 83%	Slanc et al. (2004)
Fungus, *Tylopilus felleus*	Mycelia extract	2 mg/ml fungal extract, lipase activity	Inhibitory effect on lipase activity = 96%	Slanc et al. (2004)
Fungus, *Hygrocybe conica*	Mycelia extract	2 mg/ml fungal extract, lipase activity	Inhibitory effect on lipase activity = 97%	Slanc et al. (2004)
Basidiomycete, *Boreostereum vibrans*	Vibralactone	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.4 μg/ml	Liu et al. (2006)
Streptomyces toxytricini	Lipistatin	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.14 μM	Weibel et al. (1987), Hochuli et al. (1987)
Streptomyces sp. NR0619	Panclicins	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.89 μM with panclicin D	Mutoh et al. (1994), Yoshinari et al. (1994)
Actinomycetes sp. MG147-CF2	Valilactone	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.00014 μg/ml	Kitahara et al. (1987)
	Esterastin	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.2 μg/ml	Umezawa et al. (1978)
	Ebelactone B	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.001 μg/ml	Umezawa et al. (1980)
	Ebelactone A	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 0.003 μg/ml	Umezawa et al. (1980)
Citrus unshiu	Hesperidin	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 32 μg/ml	Kawaguchi et al. (1997)
Marine algae (*Caulerpa taxifolia*)	Caulerpenyne	Inhibitory activity of pancreatic lipase	IC_{50} = 2 mM	Tomoda et al. (2002)

[a] The mg/kg indicates a dose (mg) based on the experimental animal's body weight (kg), and% refers to proportion of the diet.
[b] The author recalculated values with an asterisk (*) from the original data (shown as figures) in each reference.
[c] Data from the first reference cited.

structures and/or polymerization of their flavan-3-ols for enhanced pancreatic lipase inhibition (Nakai et al., 2005).

In their search for a pancreatic lipase inhibitor Bitou et al. (1999) screened 54 marine algae. Interestingly, almost all algaes showed lipase inhibitory activity, in either methanol or ethyl acetate extracts (see Table 1 of Bitou et al., 1999).

Reportedly, the IC_{50} value of orlistat, a clinically-approved lipase inhibitor, is 0.75 μg/mL. Because crude extracts include, not only active substances, but also non-active components, the inhibitory potencies of crude extracts from plants and other natural sources are significantly weaker than that of orlistat (Kim and Kang, 2005).

Numerous natural compounds and decoctions prepared from plants resemble orlistat, in that they inhibit gastrointestinal lipase reactions. However, their inhibitory mechanisms differ from orlistat's; some are reversible reaction inhibitors, whereas others, like orlistat, are irreversible inhibitors (Tsujita et al., 2006; Birari and Bhutani, 2007). Irreversible inhibitors interact with lipase and inactivate it through formation of a stable covalent intermediate (Bitou et al., 1999).

2.2. Suppressive effect on food intake

Body weight regulation through appetite control is a multifactorial event resulting from neurological and hormonal interrelationships. A line of evidence indicates that serotonin, histamine, dopamine, and their associated receptor activities are closely associated with satiety regulation. These receptors may enable researchers to better target their searches for drugs that treat obesity through energy intake reduction (Chantre and Lairon, 2002).

Agents that act via peripheral satiety peptide systems, alter the various hypothalamic neuropeptides' CNS levels, or alter the key CNS appetite monoamine neurotransmitters' levels may be suitable candidates for drugs that will suppress appetite (Halford and Blundell, 2000; Wynne et al., 2005).

Any changes a potential appetite suppressant induces should be considered in terms of: (1) the psychological experience and behavioral expression of appetite, (2) metabolism and peripheral physiology, and (3) the CNS neural pathways' functioning (Halford and Blundell, 2000). In general, natural appetite suppressants are dietary supplements that aid in appetite control. Appetite suppressant mechanisms of action typically affect hunger control centers in the brain, resulting in a sense of fullness. However, in animals and humans, ghrelin secretion in the stomach may increase with decreased food intake, stimulating increased intake. Therefore, ghrelin antagonism may decrease or blunt the increased appetite that potentially occurs with decreased feeding, and, thus, may be a potential adjunctive treatment for obesity (Bays, 2004). MCH receptor antagonism may also prove an important target for obesity treatment through appetite regulation.

Sibutramine is the first new drug for treating obesity via appetite suppression to be approved by the FDA within the past 30 years (Tziomalos et al., 2009). Its main mechanism causes an increase in the feeling of satiety by controlling noradrenalin, serotonin, 5-hydroxytryptamine, and dopamine (Lean, 2001; Poston and Foreyt, 2004). However, sibutramine has some known adverse effects, including dry mouth, constipation, and insomnia (Chaput et al., 2007).

One clear example of a natural appetite suppressant is *Hoodia gordonii*, a leafless, spiny, succulent plant growing in some South African countaries (van Heerden, 2008). Despite its popularity, there is insufficient clinical information on *H. gordonii* to prove its efficacy. However, the consensus now is that *H. gordonii* regulates appetite and can significantly reduce calory intake and boost weight loss (Lee and Balick, 2007; MacLean and Luo, 2004; van Heerden et al., 2007; van Heerden, 2008). There are currently more

than 20 international patents on compounds originating in *H. gordonii*, and many hoodia-containing commercial preparations are available on the market (van Heerden, 2008). However, there has been no confirmation that these preparations actually contain hoodia. A common and noteworthy problem with the commercialization of botanicals is that commercially-available products often lack botanical or active ingredients.

Natural (−)-hydroxycitric acid (HCA), prepared from *Garcinia cambosia*, is another potential natural appetite suppressant. Currently, it is commercial available under the names HCA-SX and Super CitriMax™ (Ohia et al., 2002; Life Extension Vitamin Supplies and Life Extension Institute, Inc., Place Scottsdale, AZ, USA). This phytochemical acts by increasing the release/availability of 5-hydroxytryptamine and/or serotonin; the latter is a neurotransmitter implicated in the regulation of eating behavior and appetite control (Ohia et al., 2002). Another similar natural appetite suppressant available on the market is CQR-300, an extract of *Cissus quadrangularis* (Oben et al., 2007; WellCrops International, LLC, San Francisco, CA, USA).

Reportedly, other plant extracts and herbal supplements, including Korean red ginseng (Kim et al., 2005), *Camellia sinensis* (Kao et al., 2000; Moon et al., 2007; Dulloo et al., 1999; Nagao et al., 2005; Wolfram et al., 2006), *Caralluma fimbriata* (Kuriyan et al., 2007), ephedra (Fleming, 2007), *Citrus aurantium* (Klontz et al., 2006), *Phaseolus vulgaris* (Baintner et al., 2003; Celleno et al., 2007), *Robinia pseudoaccacia* (Baintner et al., 2003), and sunflower oil (Ferrer-Lorente et al., 2007; Remesar et al., 2000; Romero et al., 2007; Salas et al., 2007), possess appetite-suppressive properties. Although research has identified several active constituents in these substances possessing appetite-suppressive capabilities (e.g. glycosides, saponin, and flavonoids), the ways in which they work to suppress appetite are unclear; they are thought to amplify signaling in the basal hypothalamus's energy-sensing function.

The endogenous mechanisms of appetite regulation by these materials depend on the plant type. For example, *H. gordonii* extract increased ATP content in the hypothalamic neurons regulating food intake in the rat brain (MacLean and Luo, 2004) (Table 2). As is well known, central metabolism of glucose suppresses food intake, mediated by the hypothalamic AMPK/malonyl-CoA signaling system (Lane and Cha, 2009). Central administration of glucose increases hypothalamic malonyl-CoA, decreases orexigenic neuropeptide expression, and suppresses food intake. Centrally-administered fructose provokes feeding, via the AMPK/malonyl-CoA signaling pathway. Thus, decoctions prepared from natural sources containing excessively high fructose levels may suppress the hypothalamic malonyl-CoA signaling pathway, thereby exerting an orexigenic effect (Cha et al., 2008; Lane and Cha, 2009).

Many other natural appetite suppressants mediate the reduced expression of hypothalamic neuropeptide Y (NPY) or serum leptin levels (Kim et al., 2005; Weigle, 2003). For instance, Kim et al. (2005) proved that, in HFD-induced obesity in rats, a crude saponin of Korean ginseng effectively regulated serum leptin and NPY expression in the rat hypothalamus.

Some investigators have found that supplementation with certain dietary fats (e.g. conjugated linoleic acid, lauric acid, and salatrim) had suppressive effects on energy intake. However, their effects on body weight reduction were not significant (Feltrin et al., 2008; Kamphuis et al., 2003; Sørensen et al., 2008). Fat's gastrointestinal effects depend on fatty acid acyl lengths. Fatty acids with over 12 carbon atoms slow gastric emptying, modulate gastrointestinal hormone secretion, and suppress energy intake (Feltrin et al., 2008).

2.3. Stimulatory effects on energy expenditure

Abundant evidence indicates many rodent models of obesity show reduced energy expenditures, which contribute to the development of obesity, whereas the role of reduced energy expenditure in the promotion of human obesity is much less clear. Excessive adiposity results from an imbalance in energy homeostasis, in which the consequences of excessive food intake are not balanced by increased energy expenditure (Flatt, 2007; Redinger, 2009). Energy expenditure has many components. It can be separated into

Table 2
Anti-obesity biomaterials showing appetite-repression activity.

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	References[c]
Panax ginseng (root)	Crude saponins	200 mg/kg, SD rats with HFD, 3 weeks	37% decrease in body weight gain	Kim et al. (2005)
Garcinia cambogia	(−)-Hydroxycitric acid (HCA)	154 mmol HCA/kg, Zucker obese rats, 92 days	8% decrease in body weight gain	Saito et al. (2006), Heymsfield et al. (1998), Ohia et al. (2002)
Camellia sinensis (leaf)	(−)-Epigallo-cathechin gallate (EGCG)	① 82 mg/kg SD rats (7 days), ② 81 mg/kg lean Zucker rats (8 days), ③ 92 mg/kg obese Zucker rats (4 days)	① 53% decrease in body weight gain, ② 32% decrease in body weight gain, ③ 11% decrease in body weight gain	Kao et al. (2000), Moon et al. (2007), Dulloo et al. (1999), Nagao et al. (2005), Wolfram et al. (2006)
Caralluma fimbriata (cactus)	Crude ethanolic extract (pregnane glycosides)	1 g/day, overweight adult Indian men and women, 60 days	2.5% decrease in body weight gain	Kuriyan et al. (2007)
Coix lachrymajobi var. mayeun (seed)	Crude aqueous extract	500 mg/kg, SD rats with HFD, 4 weeks	36%* decrease in body weight gain	Kim et al. (2004b)
Hoodia gordonii and *H. pilifera*	Steroidal glycoside (P57AS3)	Intracerebroventricular injection, 24 h	40–60% reduction in food intake	MacLean and Luo (2004), van Heerden (2008), van Heerden et al. (2007), Lee and Balick (2007)
Not specified	Oleoyl-estrone	4.4 μmol/kg/day, Zucker lean rats with HFD, 12 days	30% decrease in body weight gain	Remesar et al. (2000), Salas et al. (2007), Ferrer-Lorente et al. (2007), Romero et al. (2007)
Phaseolus vulgaris and *Robinia pseudoacacia*	Lectins	100 mg/kg, Harlan -Wistar rats, 16 h	8.25-fold* decrease in food intake	Baintner et al., 2003
Pinus koraiensis (pine nut)	Pine nut fatty acids	3 g, obese women, 4 h	60% increase in cholecystokinin -8 (satiety hormone) secretion	Pasman et al. (2008), Hughes et al. (2008)

[a] The mg/kg indicates a dose (mg) based on the experimental animal's body weight (kg), and% refers to proportion of the diet.
[b] The author recalculated values with an asterisk (*) from the original data (shown as figures) in each reference.
[c] Data from the first reference cited.

Table 3
Anti-obesity biomaterials promoting energy expenditure.

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	Mechanism of action	References[c]
Pinellia ternata	Crude aqueous extract	400 mg/kg, obese Zucker rats, 6 weeks	Slight decrease in body weight gain (data not shown)	Increased UCP1 expression in BAT and PPARα in WAT	Kim et al. (2006d)
Nelumbo nucifera (leaf)	Crude ethanolic extract (flavonoid)	1%, A/J mice with HFD, 12 weeks	15%* decrease in body weight gain	Activation of β-adrenergic receptor	Ohkoshi et al. (2007)
Camellia sinensis	EGCG	300 mg/d, obese men, 2 days	8% decrease in RQ	Decrease in RQ	Boschmann and Thielecke (2007), Chantre and Lairon (2002), Thielecke and Boschmann (2009)
Panax ginseng (berry)	Crude ethanolic extract	150 mg/kg, ob/ob mice, 12 days	13% decrease in body weight gain	Increased energy expenditure and body temperature	Attele et al. (2002)
Glycine max (soybean)	β-conglycinin, glycinin (globulins)	23.7% β-conglycinin and 21.9% glycinin, KK-Ay obese mice, 4 weeks	10% decrease in body weight gain	Acceleration of β-oxidation, suppression of fatty acid synthesis	Moriyama et al. (2004), Ishihara et al. (2003)
Undaria pinnatifida (sea weed)	Fucoxanthin	2%, KKAy mice with soybean oil diet, 4 weeks	17% decrease in body weight gain	UCP1 expression in WAT	Maeda et al. (2005, 2007a,b)
Not specified	Medium-chain tryglycerides (MCT)	Diet containing 64.7% MCT, 24 obese men, 28 days	1.3% decrease in body weight gain	Increased energy expenditure	St-Onge et al. (2003a,b), St-Onge and Jones (2002), Papamandjaris et al. (1998), Bourque et al. (2003), Geliebter et al. (1983)
Fish oil	EPA and DHA	C57BL/6 J mice with 60% fish oil diet containing 7% EPA and 24% DHA, 5 months	58% decrease in body weight gain	Upregulation of UCP2 in liver	Tsuboyama-Kasaoka et al. (1999)

[a] The mg/kg indicates a dose (mg) based on the experimental animal's body weight (kg), and % refers to proportion of the diet.
[b] The author recalculated values with an asterisk (*) from the original data (shown as figures) in each reference.
[c] Data from the first reference cited.

a number of different categories. The simplest scheme divides energy expenditure into three categories: (1) physical activity, (2) obligatory energy expenditure, and (3) adaptive thermogenesis.

To regulate body weight and energy expenditure, mammalian BAT establishes non-shivering thermogenesis through dissipation of excess energy as heat (Cannon and Nedergaard, 2004). BAT plays an important role in obesity control by controlling energy balance. The key player in this process is UCP1, which discharges the proton gradient generated in oxidative phosphorylation, thereby dissipating energy as heat. Thus, searching for substances that upregulate UCP1 gene expression may be a worthy strategy for achieving obesity control through increased energy expenditure (Kumar et al., 1999). One analogue of UCP1, UCP3, is also a potentially potent anti-obesity agent, because it mediates the thermogenesis regulated by the thyroid hormone, β_3-adrenergic agonists, and/or leptin in some organs (Gong et al., 1997). An example is the ethanolic extract of *Solanum tuberosum*, which activated the expression of UCP3 in BAT and the liver and significantly reduced fat weight in HFD-fed rats (Yoon et al., 2008).

BAT can be recruited under certain conditions. For example, earlier studies have described remodeling mature WAT into mitochondria-rich cells with a high capacity for fatty acid oxidation (Cinti, 2002; Mercader et al., 2006). Several naturally occurring agents, including n−3 polyunsaturated fatty acids and fucoxanthin, which is of marine origin, stimulate thermogenesis in BAT and promote WAT deposits *in vivo* acquisition of BAT features in rodents (Cabrero et al., 2001; Orci et al., 2004; Flachs et al., 2005; Maeda et al., 2007a). Thus, finding natural compounds that can recruit BAT within WAT may be a useful obesity treatment strategy.

Numerous naturally-occurring compounds have been proposed as treatments for weight loss via enhanced energy expenditure, including caffeine (Dulloo, 1993; Racotta et al., 1994) and capsaicin (Kawada et al., 1986; Rayalam et al., 2008). However, researchers attribute most of such putative effects on energy expenditure to green tea and its extract, where the catechins, such as EGC and EGCG, have received tremendous attention (Wolfram et al., 2006; Moon et al., 2007). Several lines of evidence suggest EGCG also stimulates thermogenesis through inhibition of the catechol *O*-methyltransferase involved in degradation of norepinephrine (Borchardt and Huber, 1975; Boschmann and Thielecke, 2007; Chantre and Lairon, 2002; Rayalam et al., 2008; Thielecke and Boschmann, 2009). Extracts of *Pinellia ternate* (Kim et al., 2006d) and *Panax ginseng* (berry) (Attele et al., 2002) also show activity for increasing energy expenditure (Table 3).

The ethanolic extract of *Ilex paraguariensis* ameoliorated HFD-induced obesity through enhanced β-oxidation of fatty acids, increasing AMPK activation in visceral adipose tissue and subsequently reducing ACC activity (Pang et al., 2008). Activated AMPK phosphorylates (inactivates) ACC and lowers levels of intracellular malonyl-CoA, which is the fatty acid synthesis substrate. At the same time, malonyl-CoA inhibits CPT-1, the rate-limiting enzyme in mitochondrial fatty acid oxidation. Accordingly, these processes lead to the promotion of fatty acid oxidation (Pang et al., 2008).

2.4. Inhibitory effect on adipocyte differentiation

Adipocytes play a central role in the maintenance of lipid homeostasis and energy balance, by storing triglycerides and releasing free fatty acids in response to changing energy demands. Because adipocyte tissue growth can be due to both hyperplasia and hypertrophy of adipocytes, several studies screening for anti-obesity materials have focused on the processes of adipocyte proliferation and differentiation (Kim et al., 2006a). In this search, 3T3-L1 pre-adipocytes cells are currently used as an *in vitro* model for the study of obesity, because such cells accumulate triglycerides upon differentiating in culture (Cowherd et al., 1999; Green and Kehinde, 1975). This is due to the expression of adipocyte-specific genes, such as PPARγ and C/EBPα (Wu et al., 1999; Lefterova and Lazar, 2009). For this reason, natural products that specifically target adipogenesis inhibition had been considered

Table 4
Anti-obesity biomaterials inhibiting adipocyte differentiation.

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	References[c]
Garcinia cambogia	(−)-Hydroxycitric acid (HCA)	4 μg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 8 days	35% decrease in lipid accumulation	Kim et al. (2004a)
Pinus densiflora	Crude aqueous extract	10 g/kg, SD rats with HFD, 6 weeks	12% decrease in body weight gain	Jeon and Kim (2006)
Coptidis rhizome	Berberine	5 mg/kg, db/db mice, 26 days	13% decrease in body weight	Lee et al. (2006b), Huang et al. (2006a), Hu and Davies (2009)
Not specified (product of Sigma)	Esculetin	200–800 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	↓ 200 μM, pre-adipocyte apoptosis ↓ 800 μM, inhibition of adipogenesis	Yang et al., 2006a
Glycine max (product of GIBCO)	Genistein	100 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 60%	Harmon and Harp (2001), Harmon et al. (2002), Zhang et al. (2009), Kim et al. (2006b), Naaz et al. (2003), Kandulska et al. (1999), Szkudelska et al. (2000)
Not specified (product of GIBCO)	Naringenin	100 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by ~40%	Harmon and Harp (2001)
Not specified (product of Sigma)	Quercetin	250 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 71.5%, IC_{50} = 40.4 μM	Hsu and Yen (2006)
Chili pepper (*Capsicum*)	Capsaicin	3T3-L1 adipocyte, 72 h	↓ Inhibition of population: IC_{50} = 45 μM ↓ Apoptosis percentage: 26.7% at 250 μM	Hsu and Yen (2007)
Deep sea water	Minerals (mainly Ca and Mg)	Hardness 1000, 3T3-L1 adipocyte, 72 h	27% decrease in lipid accumulation	Hwang et al. (2009b)
Chitosan oligosaccharides	MW 1–3 kDa	3T3-L1 adipocyte, 72 h	90% decrease in lipid accumulation	Cho et al. (2008), Rahman et al. (2008a,b), Kim et al. (2006c)
Kochujang (fermented red pepper paste)	Not identified	1 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	70–75% decrease in adipogenic transcription factors	Ahn et al. (2006)
Fish oil	Docosahexaenoic acid	200 μM, 3T3-L1 adipocyte, 4 h	90% increase in lipolysis	Kim et al. (1999, 2006), Parrish et al. (1990), Flachs et al. (2005)
Perilla oil (product of Ajinomoto Co., Japan)	Rich in α-linolenic acid	12% dietary fat, SD rats, 12 weeks	94% decrease in TG accumulation	Okuno et al. (1997)
Palm oil	γ-tocotrienol	24 μM, 3T3-L1 adipocyte, 21 days	48% decrease in TG accumulation	Uto-Kondo et al. (2009)
Sterol (product of Sigma)	β-sitosterol	16 μM, 3T3-L1 adipocyte, 72 h	65% decrease in preadipocyte differentiation	Awad et al. (2000)
Scutellaria baicalensis (product of Sigma)	Baicalein	100 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	1.86-fold decrease in lipid accumulation	Cha et al. (2006)
Lagerstroemia speciosa L. (banana leaf)	Hot water extract (tannic acid)	0.1–0.25 extract (20 mg/l tannic acid), 3T3-L1 adipocyte, 48 h	No differentiation	Liu et al. (2001, 2005), Bai et al. (2008), Klein et al. (2007)
Undaria pinnatifida (brown algae)	Fucoxanthin	15 μM, 3T3-L1 adipocyte, 120 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 70%	Maeda et al. (2006)
Conjugated linoleic acids (CLA)	*trans*-10, *cis*-12 CLA	100 μM, 3T3-L1 adipocyte, 3 days	36% decrease in TG accumulation	Evans et al. (2000), Joseph et al. (2009)
Camellia sinensis (green tea)	(−)-Epigallocatechin gallate	20 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 7-fold*	Ku et al. (2008), Lee et al. (2008b), Sakurai et al. (2009)
Lithospermum erythrohizon	Shikonin	20 μM, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	Inhibition of preadipocyte differentiation: IC_{50} = 1.1 μM	Lee et al. (2009a)
Panax ginseng	Ginsenosides	40 μM, 3T3-L1 adipocyte, 6 days	40%* decrease in TG accumulation with ginsenoside Rg3	Hwang et al. (2009c), Park et al. (2008b), Kim et al. (2009a,c)
Brown algae	Fucoidan	100 μM, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 33%	Kim et al. (2009b)
Zizyphus jujuba (fruit)	Extract of choroform fraction	50 μM, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	Inhibition of GPDH activity by 80%*	Kubota et al. (2009)
Silybum marianum	Silibinin	30 μM, 2 days	60%* decrease in TG accumulation	Xu et al. (2009)
Combined natural compounds	Genestein (G), quercetin (Q), resveratrol (R)	50 μM G, 100 μM Q, 100 μM R, 3T3-L1 adipocyte, 3 days	92% decrease in lipid accumulation	Park et al. (2008a)
Garlic	Ajoene	100 μM, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 86%	Ambati et al. (2009)
Humulus lupulus	Xanthohumol	75 μM, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by 51%	Yang et al. (2007) Mendes et al. (2008)
Lagerstroemia speciosa (leaf)	Ellagitannins	0.04–0.5 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	Inhibition of preadipocyte differentiation by max 100%	Bai et al. (2008)
Ascophyllum nodosum	Aqueous methanolic extract	75 μg extract, 3T3-L1 adipocyte, 8 days	Inhibition of GPDH activity by 20%	Uto-Kondo et al. (2009)
Seabuckthorn	Isorhamnetin	50 μM, 3T3-L1 adipocyte, 3 days	2.75-fold* decrease in TG accumulation	Lee et al. (2009b)
Not specified	Retinoic acid	10 μM, cultured porcine pre-adipocytes, 24 h	Inhibition of GPDH activity by 80%	Suryawan and Hu, 1997
Red yeast rice fermented by *Monascus ruber*	Not identified	2 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 8 days	86% decrease in TG accumulation	Jeon et al. (2004)
Wasabia japonica (leaf)	Not identified	667 μg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 6 days	Inhibition of GPDH activity by 36%	Ogawa et al. (2009)

(*continued on next page*)

Table 4 (continued)

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	References[c]
Coriolus versicolor (mushroom fruit body)	(+)-Terrnatin	1.3 μM, 3T3-L1 adipocyte, 9 days	87% decrease in TG accumulation	Ito et al. (2009)
Cordyceps militaris	Mycelial extract	0.2%, 3T3-L1 adipocyte, 12 days	93.7% decrease in lipid accumulation	Shimada et al. (2008)
Ipomoea batatas (root)	Sporamin	0.5 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 5 days	Inhibition of preadipocyte differentiation by 84%	Xiong et al. (2009)
Rosmarinus officinalis	Carnosic acid	0–10 μM, 3T3-L1 adipocyte, 2 days	Inhibition of preadipocyte differentiation: IC_{50} = 0.86 μM	Takahashi et al. (2009)
Curcuma longa	Curcumin	50 μM, 3T3-L1 adipocyte, 8 days	2.4-fold* decrease in TG accumulation	Lee et al. (2009c), Ejaz et al. (2009), Miller et al. (2008), Wang et al. (2009)
Linum usitatissimum (flax seed)	(−)-Secoisolariciresinol	0.15 μM, 3T3-L1 adipocyte, 14 days	Almost 100%* decrease in TG accumulation	Tominaga et al. (2009)
Hibiscus sabdariffa	Flower extract	100 μg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 4 days	50% decrease in TG accumulation	Kim et al. (2003)
Solanum tuberosum	Ethanolic extract	0–200 μg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	Inhibition of preadipocyte differentiation: IC_{50} = 46.2 μg/ml	Yoon et al. (2008)
Soy isoflavone	Genistein	200 μM, 3T3-L1 adipocyte	90%* inhibition of adipocyte differentiation, 43%* decrease in cell adipocyte viability	Hwang et al. (2005)
Undaria pinnatifida	Neoxanthin	20 μM, 3T3-L1 adipocyte	64% reduction in lipid accumulation, 40% reduction in GPDH activity	Okada et al. (2008)
Commiphora mukul	Cis-guggulsterone	200 μM, 3T3-L1 adipocyte, 24 h	90%* decrease in adipocyte differentiation	Yang et al. (2008a)
Rehmannia glutinosa	Crude ethanolic extract	1 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 48 h	2-fold* decrease in adipocyte differentiation	Jiang et al. (2008)
Eriobotrya japonica	Corosolic acid	45 μM, 3T3-L1 adipocyte	4.17-fold* decrease in adipocyte differentiation	Zong and Zhao (2007)
Irvingia gabonesis (seed)	Extract	250 μM, 3T3-L1 adipocyte, 72 h	81% decrease in TG accumulation	Oben et al. (2008)

[a] The mg/kg indicates a dose (mg) based on the experimental animal's body weight (kg), and% refers to proportion of the diet.
[b] The author recalculated values with an asterisk (*) from the original data (shown as figures) in each reference.
[c] Data from the first reference cited.

promising with regard to their potential in treatment of obesity. However, current research suggests that inhibiting adipogenesis or adipose tissue expansion is unhealthy, leading to type 2 diabetes and other metabolic diseases, such as atherosclerosis (Lefterova and Lazar, 2009).

Fatty acids, particularly polyunsaturated fatty acids (PUFA), act as signal transducing molecules in adipocyte differentiation. In adipocyte tissue, saturated and monounsaturated fatty acids are more readily acylated into triglycerides than PUFA are (Awad et al., 2000; Evans et al., 2000; Okuno et al., 1997). Thus, PUFA play a central role in suppressing fatty acid synthesis and regulating adipocyte differentiation through suppression of late-phase adipocyte differentiation (Madsen et al., 2005; Okuno et al., 1997). Recent reports have demonstrated another interesting mechanism, in extract of macrofungus *Cordyceps militaris* mycelia, which suppressed 3T3-L1 adipocyte differentiation through activation of the aryl hydrocarbon receptor (Shimada et al., 2008). Table 4 lists the wide variety of natural products found to inhibit pre-adipocyte proliferation and/or the apoptotic effect.

In addition to showing inhibitory activity against adipocyte differentiation, several naturally-occurring compounds have displayed apoptotic effects on maturing pre-adipocytes. For example, some phytochemicals, such as esculetin, resveratrol, quercetin, genistein, EGCG, capsaicin, and conjugated linoleic acids induced apoptosis of maturing 3T3-L1 pre-adipocytes through suppression of ERK1/2 phosphorylation, activation of the mitochondrial pathway, AMPK activation, or anti-oxidant activity (Hargrave et al., 2002; Hwang et al., 2005; Hsu and Yen, 2006; Yang et al., 2006a, 2008b). Thus, inducing apoptosis in mature adipocytes may be important for treating obesity with naturally-occurring compounds.

The cell cycle is closely associated with adipocyte growth and proliferation and is thus an important factor to consider in targeting anti-obesity natural products. Recent evidence has indicated that certain phenolic compounds lead to cell cycle arrest at the G_1 phase during 3T3-L1 adipocyte differentiation (see review by Hsu and Yen (2008)). Recent reports have shown that phenolic compounds also efficiently induce apoptosis in 3T3-L1 adipocytes through AMPK activation (Hwang et al., 2005; Lin et al., 2005). A combined treatment of ajoene and conjugated linoleic acid, enhanced apoptosis in mature 3T3-L1 adipocytes through a synergistic increase of expression in several proapototic factors (Rayalam et al., 2008). Sirtuin 1 is another target molecule for anti-obesity treatment. Decreased adipogenesis due to resveratrol correlated with increased expression of Sirtuin1, which promotes fat mobilization by repressing PPARγ (Picard et al., 2004; Rayalam et al., 2008).

2.5. Regulatory effect on lipid metabolism

The pharmacological targeting of lipolysis can be envisaged in two different ways. The first strategy entails stimulating triglyceride hydrolysis in order to diminish fat stores, thereby combating obesity. This option requires the associated oxidation of the newly released fatty acids and led to the development of the β_3-adrenergic agonists (Langin, 2006). However, considering that excessive lipolysis contributes to high circulating fatty acid levels and development of dyslipidemia (as seen in metabolic syndrome), a blockade of such a fatty acid release may be of therapeutic interest (Langin, 2006). Some examples of the natural compounds involved in β-adrenergic receptor activation are the various flavonoids in the leaves of *Nelumbo nucifera* (NN). Through this pathway, NN extract dietary supplementation resulted in significant suppression of body weight gain in A/J mice fed a HFD (Ohkoshi et al., 2007).

Table 5
Anti-obesity biomaterials promoting lipid metabolism.

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	Mechanism of action	References[c]
Salacia oblonga (root)	Mangiferin	500 mg/kg, ZDF rats, 28 days	40% decrease in liver/body weight ratio	Hepatic PPARα activator	Rong et al. (2008), Huang et al. (2006b)
Ilex paraguariensis	Crude water extract	0.24%, SD rats with HFD, 60 days	11% decrease in body weight gain	Down regulation of adipose tissue genes	Pang et al. (2008)
Mixture of *Morus alba*, *Melissa officinalis*, *Artemisia capillaris* (leaf)	Crude aqueous extract	0.2%, C57BL/6 J mice with HFD, 12 weeks	7% decrease in body weight gain	Hepatic PPARα activator	Lee et al. (2008a)
Coptidis rhizoma	Berberine	5 mg/kg, db/db mice, 26 days	13% decrease in body weight	AMPK activation	Lee et al. (2006b), Huang et al. (2006a)
Nelumbo nucifera (leaf)	Crude ethanolic extract (flavonoid)	1%, A/J mice with HFD, 12 weeks	15%* decrease in body weight gain	Activation of β-adrenergic receptor	Ohkoshi et al. (2007)
Curcuma longa L.	Curcumin	3%, ob/ob mice with HFD, 4 weeks	7%* decrease in body weight gain	Reversal of inflammatory and metabolic derangements	Weisberg et al. (2008, Manjunatha and Srinivasan (2007)
	Curcuminoids	0.2%, SD rats with HFD, 2 weeks	11% decrease in body weight gain	Alterations in fatty acid metabolism	Asai and Miyazawa (2001)
Eucommia ulmoides (leaf)	Crude aqueous extract	1%, db/db mice, 6 weeks	No data	Down regulation of lipogenic enzymes	Park et al. (2006a)
Arachis hypogaea (shell)	Crude ethanolic extract	1%, Wistar rats with HFD, 12 weeks	12% decrease in body weight gain	Inhibition of fat absorption, activation of lipid metabolism	Moreno et al. (2006)
Coix lachryma-jobi var. *mayuen* (seed)	Crude aqueous extract	500 mg/kg, SD rats with HFD, 4 weeks	36%* decrease in body weight gain	Modulation of leptin and TNF-α	Kim et al. (2004b)
Salacia reticulate (root)	Aqueous extract (polyphenolic compounds)	125 mg/kg, Zucker fatty rats, 27 days	7%* decrease in body weight gain	Inhibition of lipid-metabolizing enzymes and stimulation of lipolysis	Yoshikawa et al. (2002)
Glycyrrhiza glabra L. (root)	Licorice flavonoid oil (LFO)	2% LFO, KK-A^y obese mice, 4 weeks	30% decrease in body weight gain	PPARγ agonistic activity	Nakagawa et al. (2004)
Diospyros kaki (leaf)	Crude methanolic extract	5%, SD rats with HFD, 6 weeks	11% decrease in body weight gain	Modulation of leptin and lipogenic enzymes	Lee et al. (2006a)
Morus alba L. (leaf)	Crude aqueous extract	0.5%, db/db mice, 12 weeks	7% decrease in body weight gain	PPARs agonistic activity	Park et al. (2005)
Panax ginseng	Crude aqueous extract	0.5%, db/db mice, 12 weeks	8% decrease in body weight gain	PPARs agonistic activity	Park et al. (2005)
Lagerstroemia speciosa L. (leaf)	Crude aqueous extract	0.5%, db/db mice, 12 weeks	3% decrease in body weight gain	PPARs agonistic activity	Park et al. (2005)
Zea mays L.	Purple corn color (PCC) (anthocyanins)	PCC 1.1%, C57BL/6J mice with HFD, 12 weeks	21%* decrease in body weight gain	AMPK activation	Tsuda et al. (2003, 2004), Kong et al. (2003)
Glycyrrhiza uralensis	Crude ethanolic extract (flavonoids)	0.2%, C57BL/6 J mice with HFD, 4 weeks	22% decrease in body weight gain	PPARγ agonistic activity	Mae et al. (2003)
Evodia rutaecarpa (fruit)	Crude ethanolic extract (evodiamine)	0.02%, SD rats with HFD, 21 days	23% decrease in body weight gain	Vanilloid receptor agonistic activity	Kobayashi et al. (2001)
Aralia mandshurica (AM) and *Eriobotrya chrysolepis* (EC)	Aralox	150 mg/d AM and 150/d mg EC, 32 women, 15 weeks	4% decrease in body weight gain	Stimulation of hormone-sensitive lipase	Abidov et al. (2006)
Commiphora mukul	E- and Z-guggulsterone	1.5 g/d, 40 patients, 16 weeks	Reduction in cholesterol and triglyceride levels by 22, and 27%, respectively	Antagonist of the bile acid receptor farnesoid X receptor	Urizar and Moore (2003), Verma and Bordia (1988)
Rhynchosia volubilis (black soybean)	Tripeptide (Ile-Gln-Asn)	10 mg/ml, 3T3-L1 adipocyte, 8 days	IC_{50} = 0.014 mg protein/ml	AMPK activation	Kim et al. (2007)
Not specified	Ginsenoside Rg3	40 μM, 3T3-L1 adipocyte	40%* decrease in TG accumulation	PPARγ agonistic activity	Hwang et al. (2009c)
Soybean	Genistein+ L-carnitine (soy isoflavone)	0.2% genistein + 0.5% L-carnitine, C57BL/6 J mice with HFD, 12 weeks	25.4% decrease in body weight gain	PPARs agonistic activity	Yang et al. (2006b)
Coffea canephora	Caffeine, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, feruloyquinic acids	0.5%, ddy mice with standard diet, 14 days	15.7% decrease in body weight gain	Inhibition of fat absorption, activation of fat metabolism	Shimoda et al. (2006)
Soybean	β-conglycinin, glycinin (globulins)	23.7% β-conglycinin, and 21.9% glycinin, KK-A^y obese mice, 4 weeks	10% decrease in body weight gain	Acceleration of β-oxidation, suppression of fatty acid synthesis	Moriyama et al. (2004)
Fish oil	Eicosapentaenoic acid (n-3 polyunsaturated fatty acid)	1 g/kg, Wistar rats with cafeteria diet, 5 weeks	9%* decrease in body weight gain	Down regulation of PPARγ, apoptosis in WAT	Pérez-Matute et al. (2007)
Phytochemicals	Resveratrol (R), Quercetin (Q)	R25 + Q25 μM (R100 + Q100 μM), 3T3-L1 adipocyte, 6 days	69% decrease in lipid accumulation (R25 + Q25 μM), 74% decrease in adipocyte viability (R100 + Q100 μM)	Down regulation of PPARγ and C/EBPα, apoptosis	Yang et al. (2008b), Ahn et al. (2007a)

(continued on next page)

Table 5 (*continued*)

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	Mechanism of action	References[c]
Glycine max (Soy) isoflavone	Genistein	200 μM, 3T3-L1 adipocyte	90%* inhibition of adipocyte differentiation, 43%* decrease in cell adipocyte viability	AMPK activation,adipocyte apoptosis	Hwang et al. (2005)
Phytochemicals	Caffeine + arginine + soy isoflavones+L-carnitine (CASL)	CASL (250 mg, 6 g, 2 g, 1.5 g/kg) KK mice with HFD, 3 weeks	5.4% decrease in body weight gain	Inhibition of lipogenesis in liver	Murosaki et al. (2007)
Rubus idaeus (raspberry)	4-(4-Hydroxyphenyl) butan-2-one (RK)	2% RK, ICR mice with HFD, 10 weeks	17%* decrease in body weight gain	Increased lipolysis	Morimoto et al. (2005)
Deep sea water	Minerals (mainly Ca and Mg)	Deep sea water of hardness 1000, ob/ob mice, 84 days	7% decrease in body weight gain	GLUT and AMPK activation	Hwang et al. (2009a)
Chitosan	Not specified	3 g/day, human overweight adults, 8 weeks	22% decrease in body weight gain	Decrease in fat absorption	Kaats et al. (2006)
Chitosan oligosaccharides	MW 125–145 kD	2%, Wistar rats, 4 weeks	9% decrease in body weight gain	Decrease in fat absorption	Bandiolotti et al. (2007)
	MW 3–5 kD	200 mg/kg, ob/ob mice, 28 days	12% decrease in body weight gain	Down regulation of obesity-related genes	Kumar et al. (2009)
Palatinose		55.7% palatinose, 23.9% branched dextrin, SD rats with standard chow, 8 weeks	23% decrease in body weight gain	PPARγ agonistic activity	Matsuo et al. (2007)
Levan		10%, SD rats with HFD, 4 weeks	160% decrease in body weight gain	PPARα agonistic activity	Kang et al. (2006)
Not specified	Oleoylethanolamide	5 mg/kg, Wistar rats with HFD, 2 weeks	3.6%* decrease in body weight change	PPARα agonistic activity	Guzmán et al. (2004), Fu et al. (2005)
Not specified	PEGylated conjugated linoleic acid (PCLA)	200 μM PCLA, 3T3-L1 adipocyte, 72 h	80% increase in body lipolysis	PPARγ agonistic activity	Moon et al. (2006)
Not specified	Conjugated linoleic acid (CLA)	1.5% CLA, C57Bl/6 mice with HFD, 6 weeks	52%* decrease in body weight gain	Inhibition of FA uptake into adipose	Liu et al. (2007), Lin et al. (2001), Li et al. (2008a), Lei et al. (2004), Wang and Jones (2004)
Solanum tuberosum	Crude ethanolic extract	200 mg/kg, SD rats, 4 weeks	5%* decrease in body weight gain	Down regulation of P38 MAPK and Upregulation of UCP3	Yoon et al. (2008)
Momordica charantia	Crude ethanolic extract	0.2 mg/ml, 3T3-L1 pre-adipocytes	61% increase in glucose uptake with 0.5 nM insulin and 75% increase in adiponectin secretion	Enhanced glucose uptake and adiponectin secretion	Roffey et al. (2007)
Toona sinensis (leaf)	Crude ethanolic extract	0.1 mg/ml, 3T3-L1 pre-adipocytes, 6 h	156% increase in glycerol release	Lipolytic activity	Hsu et al. (2003)
Cinnamomi cassiae	Cinnamon	0.6 mg/ml, 3T3-L1 pre-adipocytes, 5 days	3.1-fold increase in PPARγ levels	PPARγ agonistic activity	Sheng et al. (2008)

[a] The mg/kg indicates a dose (mg) based on the experimental animal's body weight (kg), and% refers to proportion of the diet.
[b] The author recalculated values with an asterisk (*) from the original data (shown as figures) in each reference.
[c] Data from the first reference cited.

PPARγ is a transcription factor predominantly expressed in adipose tissue, and it activates adipocyte differentiation both *in vivo* and *in vitro* (Cornelius et al., 1994). When PPARγ is overexpressed, 3T3-L1 pre-adipocyte induction begins. This suggests that PPARγ suppression blocks adipogenesis and lipogenesis (Lefterova and Lazar, 2009). Thus, PPARγ agonism leads to the amelioration of lipid abnormalities in dyslipidemic patients. Findings from a number of rodent studies have demonstrated that PPARγ agonists can improve insulin resistance, as well as dyslipidemia. Concomitantly, rodent disease models have demonstrated that PPARγ agonists prevented increased adiposity and body weight without any reduction in food intake (Kersten, 2002). Similarly, PPARα activation mediated the expression of genes that regulate lipid oxidation. Aqueous extract of *Salacia oblonga* root (active main component, mangiferin) has demonstrated PPARα activator properties, which then improved postprandial hyperlipidermic and hepatic steatosis in a genetic-obesity animal model (Huang et al., 2006b). Additionally, a mixture of three herbal extracts improved lipid metabolism by increasing hepatic mRNA levels of PPARα, the target enzyme responsible for fatty acid β-oxidation (Lee et al., 2008a).

AMPK is an enzyme found in numerous tissues throughout the body. It has been characterized as a metabolic master switch that regulates the activities of a number of target proteins controlling metabolism. The role of AMPK in the exercising skeletal muscle has been studied extensively. In broad terms, AMPK activation in skeletal muscle appears to increase glucose transport (Hayashi et al., 2000) and fatty acid oxidation (Winder and Hardie, 1999; Rudenman et al., 1999). One of the most well-characterized AMPK activation targets in skeletal muscle is ACC. Activated AMPK phosphorylates ACC, inhibiting its action (Saha and Ruderman, 2003). ACC in turn catalyzes synthesis of malonyl-CoA, a potent inhibitor of CPT-1, which controls the fatty acids' entry into the mitochondria. There, the fatty acids can be oxidized or converted to ketone bodies (in the liver) for use as fuel in other organs (Flier, 2004). Thus, the net result of this chain of events is that an increase in muscle AMPK leads to an increase in CPT-1 and in fatty acid oxidation. Table 5 summarizes the many natural AMPK activators that have been found.

Tomoda et al. (2002) contributed to the discovery of novel microbial metabolites showing inhibitory activity against lipid

metabolism, particularly those affecting fatty acid and cholesterol metabolic pathways. They discovered numerous compounds, including cerulenin, thiotetromycin, chlorogentisylquinone, and the beauverolides, pyripyropenes, terpendoles, and ferroverdins (Tomoda et al., 2002). These compounds function as fatty acid synthase inhibitors (cerulenin), acyl-CoA synthetase inhibitors (triacsin C), and HMG-CoA synthase inhibitors (hymeglusin).

The activity of oolong tea is a good example of another anti-obesity mechanism. Caffeine, one of the major bioactive components in oolong tea, possesses both a positive charge and a hydrophobic area like that of adrenaline. Caffeine's mechanism of lipolytic action might be due to its binding to the phospholipid phosphate groups and the subsequent interactions between the lipase and triglyceride portions of lipid droplets, eliciting lipolysis (Han et al., 1999b).

2.6. Combined effect for obesity treatment

As mentioned above, many natural products show anti-obesity activities of varying mechanisms. Perhaps the recommended approach to researching more efficient obesity treatments and achieving the synergistic effects of natural products should be to seek treatments using multiple products or products having multiple activities (Rayalam et al., 2008).

Some natural biomaterials possessing multi-functional anti-obesity activities have been discovered. Green tea and *Garcinia cambogia* are good examples. Researchers originally found green tea possessed higher anti-oxidant activity than anti-obesity activity, owing to its high concetration of catechins, including epicatechin, ECG, and EGCG. Subsequent research proved the anti-obesity activity of catechins resulted from the combined actions of appetite reduction, greater lipolytic activity and energy expenditure, and less lipogenic activity and adipocyte differentiation (Boschmann and Thielecke, 2007; Chantre and Lairon, 2002; Dulloo et al., 1999; Hsu and Yen, 2006; Kao et al., 2000; Lin and Lin-Shiau, 2006; Moon et al., 2007; Nagao et al., 2005; Thielecke and Boschmann, 2009; Wolfram et al., 2006). *G. cambogia* is widely known for its anti-obesity activity (Heymsfield et al., 1998; Kim et al., 2004a). Its commercially-available extract is derived from the dried fruit of the *G. cambogia* tree, which grows in the forests of South India and Southeast Asia. Its main active ingredient is (−)-hydroxycitric acid (Kim et al., 2004a). *G. cambogia* prevents the metabolism of carbohydrates into fats by inhibiting lipogenesis, burning excess fats, and suppressing appetite (Kim et al., 2004a).

The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* (containing mainly anthocyanins) has exhibited many potential anti-obesity mechanisms, including anti-hyperglycemic effects, plasma cholesterol level reduction, gastric and pancreatic lipase inhibition, thermogenesis stimulation, inhibition of lipid droplet accumulation in fat cells (without affecting adipose conversion), and fatty acid synthase inhibition (Alarcon-Aguilar et al., 2007). *G. cambogia* extract (active component, hydroxycitric acid) has also displayed multi-functional anti-obesity effects. Research has shown that it inhibits adipocyte differentiation, reduces fatty acid synthesis, lipogenesis, and apididymal fat accumulation through reducing ATP-citrate lyase activity, and suppresses appetite (Kim et al., 2004a; Saito et al., 2005). It has been on the market over 10 years with no adverse side-effects (Ohia et al., 2002; Saito et al., 2005).

Pomegranate extract (active components, ellagic acid and tannic acid) also has dual anti-obesity effects, in that it inhibits pancreatic lipase activity and suppresses energy intake. Its effect on energy intake was similar to sibutramine, but with a different mechanism (Lei et al., 2007). In obese rats, supplementation with aqueous extract of *Pinellia ternate* induced increased thermogenesis in BAT (i.e., increased UCP1 expression) and fatty acid oxidation (activated PPARα) in WAT (Kim et al., 2006d). Green tea extracts also exert anti-obesity activities in two ways: lipase inhibition and thermogenesis stimulation (Chantre and Lairon, 2002). Peanut (*Arachis hypogaea*) shell extract contribute to inhibiting fat absorption in the digestive tract, activating lipid metabolism in the liver, and reducing adipocyte lipolysis (Moreno et al., 2006). The *Nelumbo nucifera* leaf possesses multiple anti-obesity activities, including inhibition of lipid and carbohydrate absorption and acceleration of lipid metabolism and energy expenditure (Ono et al., 2006). Raspberry ketone exerts its anti-obesity effect via increasing

Table 6
Other anti-obesity biomaterials, whose mechanisms are unidentified.

Source	Active component	Experimental methods[a] (treated dose, subjects, duration of treatment)	Major activity[b]	References[c]
Hibiscus sabdariffa	Anthocyanin	120 mg/kg, ob/MSG mice, 60 days	10% decrease in body weight gain	Alarcon-Aguilar et al. (2007)
Panax ginseng (berry)	Crude ethanolic extract	150 mg/kg, ob/ob mice, 12 days	11% decrease in body weight gain	Dey et al. (2003)
Trigonella foenum graecum L. (seed)	Crude ethanolic extract	350 mg/kg, mice with HFD, 22 days	14%* decrease in body weight gain	Handa et al. (2005)
Acanthopanax senticosus (stem bark)	Crude aqueous extract	500 mg/kg, C57BL/6 J mice with HFD, 12 weeks	4%* decrease in body weight gain	Cha et al. (2004), Park et al. (2006b)
Ginseng	Crude ethanolic extract	500 mg/kg, ICR mice with HFD, 8 weeks	16% decrease in body weight gain	Yun et al. (2004)
Cissus quadrangularis	Standardized extract (phytosterols)	Two daily dose (514 mg each), obese persons, 8 weeks	23% decrease in body weight gain	Oben et al. (2006, 2007)
Panax quinquefolium L. (berry)	Crude aqueous extract (Ginsenosides)	0.6 ml/kg (juice), ob/ob mice, 10 days	250% decrease in body weight gain	Xie et al. (2007)
Eucommia ulmoides (leaf)	Crude aqueous extract	10 mg/ml, hMSC adipocyte, 7 days	1/12 decrease in TG accumulation	Lee et al. (2004)
Soy protein isolate (SPI)	Not specified	41.1%, yellow KK mice with energy restricted diet, 4 weeks	20% decrease in body weight gain	Aoyama et al. (2000)
Carotenoid pigment	Astaxanthin	30 mg/kg, ddy mice with HFD, 60 days	15%* decrease in body weight gain	Ikeuchi et al. (2007)
Fungi	Isaria sinclairii	10%, (fa/fa) Zucker mice, 17 weeks	17% decrease in body weight gain	Ahn et al. (2007b)

[a] The mg/kg indicates a dose (mg) based on the experimental animal's body weight (kg), and% refers to proportion of the diet.
[b] The author recalculated values with an asterisk (*) from the original data (shown as figures) in each reference.
[c] Data from the first reference cited.

norepinephrine-induced lipolysis in WAT and enhancing thermogenesis in BAT (Morimoto et al., 2005). One study found an Indian herb, *Salacia* met multiple obesity-reduction targets by both modulating PPARα-mediated lipogenic gene transcription and angiotensin II type 1 receptor signaling and also inhibiting α-glucosidase and pancreatic lipase (Li et al., 2008b). Several polyunsaturated fatty acids also show combinations of anti-obesity actions, including upregulation of mitochondrial biogenesis, induction of β-oxidation, and suppression of adipocyte lipogenesis (Flachs et al., 2005). Taken together, combination therapies employing natural products that target different obesity genes and/or different stages of the adipocyte life cycle might prove beneficial in treating obesity.

Finally, Table 6 lists other natural anti-obesity products whose mechanisms of action are yet unidentified.

3. Conclusions

Anti-obesity pharmacological treatment should be administered only when considered safe and effective for obese subject. Over the past 30 years, few obesity-treatment drugs have been developed or approved. Only two drugs are currently available, and some drugs have been withdrawn from the market due to serious side-effects. Sibutramine and orlistat may cause weight loss of up to 10% when used in combination with dietary, behavioral, and exercise therapy. The need exists for anti-obesity drugs having greater effectiveness, which are better tolerated. In the future, the active exploration of many natural sources may provide hope for new developments based on a growing understanding of the complex and highly redundant physiological mechanisms involved in body fat content regulation. Ideally, such exploration and research will lead to a safer and more effective pharmacological treatment for obesity. It is also worth noting that the United States' FDA is particularly sensitive to anti-obesity claims. Furthermore, any anti-obesity medicine entering the market becomes immediately subject to abuse and overdose.

Acknowledgements

This research was supported by the Mid-Career Researcher Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) and funded by the Ministry of Education, Science, and Technology (Grant Number R01-2008-000-10277-0). The author also wishes to thank Ms. J.S. Lee and Ms. H.S. Hwang for their helpful literature collection and arrangements.

References

Abidov, M.T., del Rio, M.J., Ramazanov, T.Z., Klimenov, A.L., Dzhamirze, S.H., Kalyuzhin, O.V., 2006. Effects of *Aralia mandshurica* and *Engelhardtia chrysolepis* extracts on some parameters of lipid metabolism in women with nondiabetic obesity. Bull. Exp. Biol. Med. 141, 343–346.

Ahn, I.S., Do, M.S., Kim, S.O., Jung, H.S., Kim, Y.I., Kim, H.J., Park, K.Y., 2006. Antiobesity effect of *Kochujang* (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. J. Med. Food 9, 15–21.

Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Ha, T., 2007a. Resveratrol inhibits TNF-α-induced changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 364, 972–977.

Ahn, M.Y., Jee, S.D., Lee, B.M., 2007b. Antiobesity effects of *Isano sinctairii* by repeated oral treatment in obese Zucker rats over a 4-month period. J. Toxicol. Environ. Health A 70, 1395–1401.

Alarcon-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M.D., Almanza-Perez, J.C., Romero-Nuñez, E., Campos-Sepulveda, E.A., Vazquez-Carrillo, L.I., Roman-Ramos, R., 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. J. Ethnopharmacol. 114, 66–71.

Ambati, S., Yang, J.Y., Rayalam, S., Park, H.J., Della-Fera, M.A., Baile, C.A., 2009. Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis. Phytother. Res. 23, 513–518.

Aoyama, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Hashimoto, Y., Yamamoto, T., 2000. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). Nutrition 16, 349–354.

Asai, A., Miyazawa, T., 2001. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. J. Nutr. 131, 2932–2935.

Attele, A.S., Zhou, Y.P., Xie, J.T., Wu, J.A., Zhang, L., Dey, L., Pugh, W., Rue, P.A., Polonsky, K.S., Yuan, C.S., 2002. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. Diabetes 51, 1851–1858.

Awad, A.B., Begdache, L.A., Fink, C.S., 2000. Effect of sterols and fatty acids on growth and triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells. J. Nutr. Biochem. 11, 153–158.

Bai, N., He, K., Roller, M., Zheng, B., Chen, X., Shao, Z., Peng, T., Zheng, Q., 2008. Active compounds from *Lagerstroemia speciosa*, insulin-like glucose uptake-stimulatory/inhibitory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. J. Agric. Food Chem. 56, 11668–11674.

Balntner, K., Kiss, P., Pfüller, U., Bardocz, S., Pusztai, A., 2003. Effect of orally and intraperitoneally administered plant lectins on food consumption of rats. Acta Physiol. Hung. 90, 97–107.

Ballinger, A., Peikin, S.R., 2002. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. Eur. J. Pharmacol. 440, 109–117.

Bays, H.E., 2004. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. Obes. Res. 12, 1197–1211.

Birari, R.B., Bhutani, K.K., 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. Drug Discov. Today 12, 879–889.

Bitou, N., Ninomiya, M., Tsujita, T., Okuda, H., 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. Lipids 34, 441–445.

Bondiolotti, G., Bareggi, S.R., Frega, N.G., Strabioli, S., Cornelli, U., 2007. Activity of two different polyglucosamines, L112® and FF45®, on body weight in male rats. Eur. J. Pharmacol. 567, 155–158.

Borchardt, R.T., Huber, J.A., 1975. Catechol O-methyltransferase. 5. Structure–activity relationships for inhibition by flavonoids. J. Med. Chem. 18, 120–122.

Boschmann, M., Thielecke, F., 2007. The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study. J. Am. Coll. Nutr. 26, 389S–395S.

Bourque, C., St-Onge, M.P., Papamandjaris, A.A., Cohn, J.S., Jones, P.J., 2003. Consumption of an oil composed of medium chain triacylglycerols, phytosterols, and *N*-3 fatty acids improves cardiovascular risk profile in overweight women. Metabolism 52, 771–777.

Cabrero, A., Alegret, M., Sanchez, R.M., Adzet, T., Laguna, J.C., Vazquez, M., 2001. Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. Diabetes 50, 1883–1890.

Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol. Rev. 84, 277–359.

Celleno, L., Tolaini, M.V., D'Amore, A., Perricone, N.V., Preuss, H.G., 2007. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. Int. J. Med. Sci. 4, 45–52.

Cha, M.H., Kim, I.C., Lee, B.H., Yoon, Y., 2006. Baicalein inhibits adipocyte differentiation by enhancing COX-2 expression. J. Med. Food 9, 145–153.

Cha, S.H., Wolfgang, M., Tokutake, Y., Chohnan, S., Lane, M.D., 2008. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 16871–16875.

Cha, Y.S., Rhee, S.J., Heo, Y.R., 2004. *Acanthopanax senticosus* extract prepared from cultured cells decreases adiposity and obesity indices in C57BL/6J mice fed a high fat diet. J. Med. Food 7, 422–429.

Chantre, P., Lairon, D., 2002. Recent findings of green tea extract AR25 (exolise) and its activity for the treatment of obesity. Phytomedicine 9, 3–8.

Chaput, J.P., St-Pierre, S., Tremblay, A., 2007. Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. Mini Rev. Med. Chem. 7, 3–10.

Cho, E.J., Rahman, M.A., Kim, S.W., Baek, Y.M., Hwang, H.J., Oh, J.Y., Hwang, H.S., Lee, S.H., Yun, J.W., 2008. Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. J. Microbiol. Biotechnol. 18, 80–87.

Cinti, S., 2002. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. J. Endocrinol. Invest. 25, 823–835.

Cornelius, P., MacDougald, O.A., Lane, M.D., 1994. Regulation of adipocyte development. Annu. Rev. Nutr. 14, 99–129.

Cowherd, R.M., Lyle, R.E., McGehee Jr., R.E., 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. Semin. Cell Dev. Biol. 10, 3–10.

de Simone, G., D'Addeo, G., 2008. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 18, 337–341.

Dey, L., Xie, J.T., Wang, A., Wu, J., Maleckar, S.A., Yuan, C.S., 2003. Anti-hyperglycemic effects of ginseng: comparison between root and berry. Phytomedicine 10, 600–605.

Drew, B.S., Dixon, A.F., Dixon, J.B., 2007. Obesity management: update on orlistat. Vasc. Health Risk Manag. 3, 817–821.

Dulloo, A.G., 1993. Ephedrine, xanthines and prostaglandin-inhibitors: actions and interactions in the stimulation of thermogenesis. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 17, S35–S40.

Dulloo, A.G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P., Vandermander, J., 1999. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. Am. J. Clin. Nutr. 70, 1040–1045.

Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., Meydani, M., 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. J. Nutr. 139, 919–925.

Ekanem, A.P., Wang, M., Simon, J.E., Moreno, D.A., 2007. Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. Phytother. Res. 21, 1253–1255.

Evans, M., Geigerman, C., Cook, J., Curtis, L., Kuebler, B., McIntosh, M., 2000. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. Lipids 35, 899–910.
Feltrin, K.L., Little, T.J., Meyer, J.H., Horowitz, M., Rades, T., Wishart, J., Feinle-Bisset, C., 2008. Comparative effects of intraduodenal infusions of lauric and oleic acids on antropyloroduodenal motility, plasma cholecystokinin and peptide YY, appetite, and energy intake in healthy men. Am. J. Clin. Nutr. 87, 1181–1187.
Ferrer-Lorente, R., Cabot, C., Fernández-López, J.A., Alemany, M., 2007. Effects of combined oleoyl-estrone and rimonabant on overweight rats. J. Pharmacol. Sci. 104, 176–182.
Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahota, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J., Kopecky, J., 2005. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce β-oxidation in white fat. Diabetologia 48, 2365–2375.
Flatt, J.P., 2007. Differences in basal energy expenditure and obesity. Obesity (Silver Spring) 15, 2546–2548.
Fleming, R.M., 2007. The effect of ephedra and high fat dieting: a cause for concern! A case report. Angiology 58, 102–105.
Flier, J.S., 2004. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell 116, 337–350.
Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E., Piomelli, D., 2005. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. Neuropharmacology 48, 1147–1153.
Gades, M.D., Stern, J.S., 2003. Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men. Obes. Res. 11, 683–688.
Gades, M.D., Stern, J.S., 2005. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. J. Am. Diet. Assoc. 105, 72–77.
Gallaher, D.D., Gallaher, C.M., Mahrt, G.J., Carr, T.P., Hollingshead, C.H., Hesslink, R., Wise, J., 2002. A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. J. Am. Coll. Nutr. 21, 428–433.
Geliebter, A., Torbay, N., Bracco, E.F., Hashim, S.A., Van Itallie, T.B., 1983. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. Am. J. Clin. Nutr. 37, 1–4.
Gong, D.W., He, Y., Karas, M., Reitman, M., 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β-adrenergic agonists, and leptin. J. Biol. Chem. 272, 24129–24132.
Green, H., Kehinde, O., 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell 5, 19–27.
Guzmán, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., Piomelli, D., 2004. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR-α). J. Biol. Chem. 279, 27849–27854.
Hadváry, P., Lengsfeld, H., Wolfer, H., 1988. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. Biochem. J. 256, 357–361.
Hadváry, P., Sidler, W., Meister, W., Vetter, W., Wolfer, H., 1991. The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. J. Biol. Chem. 266, 2021–2027.
Halford, J.C., 2006. Obesity drugs in clinical development. Curr. Opin. Invest. Drugs 7, 312–318.
Halford, J.C., Blundell, J.E., 2000. Pharmacology of appetite suppression. Prog. Drug Res. 54, 25–58.
Han, L.K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng, Y.N., Okuda, H., 2001. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 25, 1459–1464.
Han, L.K., Kimura, Y., Okuda, H., 1999a. Reduction in fat storage during chitin–chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 23, 174–179.
Han, L.K., Kimura, Y., Okuda, H., 2005a. Anti-obesity effects of natural products. Stud. Nat. Prod. Chem. 30, 79–110.
Han, L.K., Nose, R., Li, W., Gong, X.J., Zheng, Y.N., Yoshikawa, M., Koike, K., Nikaido, T., Okuda, H., Kimura, Y., 2005. Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from *Kochia scoparia* fruit. Phytother. Res. 20, 877–882.
Han, L.K., Sumiyoshi, M., Zhang, J., Liu, M.X., Zhang, X.F., Zheng, Y.N., Okuda, H., Kimura, Y., 2003a. Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (part 1). Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals. Phytother. Res. 17, 1188–1194.
Han, L.K., Sumiyoshi, M., Zheng, Y.N., Okuda, H., Kimura, Y., 2003b. Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 2). Isolation of anti-obesity effectors from polyphenol fractions of *Salix matsudana*. Phytother. Res. 17, 1195–1198.
Han, L.K., Takaku, T., Li, J., Kimura, Y., Okuda, H., 1999b. Anti-obesity action of oolong tea. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 23, 98–105.
Han, L.K., Xu, B.J., Kimura, Y., Zheng, Y., Okuda, H., 2000. *Platycodi radix* affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. J. Nutr. 130, 2760–2764.
Han, L.K., Zheng, Y.N., Xu, B.J., Okuda, H., Kimura, Y., 2002. Saponins from *Platycodi radix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. J. Nutr. 132, 2241–2245.
Han, L.K., Zheng, Y.N., Yoshikawa, M., Okuda, H., Kimura, Y., 2005b. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. BMC Complement. Altern. Med. 5, 9.
Handa, T., Yamaguchi, K., Sono, Y., Yazawa, K., 2005. Effects of fenugreek seed extract in obese mice fed a high-fat diet. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 1186–1188.
Hargrave, K.M., Li, C., Meyer, B.J., Kachman, S.D., Hartzell, D.L., Della-Fera, M.A., Miner, J.L., Baile, C.A., 2002. Adipose depletion and apoptosis induced by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid in mice. Obes. Res. 10, 1284–1290.
Harmon, A.W., Harp, J.B., 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 280, C807–C813.
Harmon, A.W., Patel, Y.M., Harp, J.B., 2002. Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. Biochem. J. 367, 203–208.
Hatano, T., Yamashita, A., Hashimoto, T., Ito, H., Kubo, N., Yoshiyama, M., Shimura, S., Itoh, Y., Okuda, T., Yoshida, T., 1997. Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. Phytochemistry 46, 893–900.
Hayashi, K., Ito, M., 2002. Antidiabetic action of low molecular weight chitosan in genetically obese diabetic KK-A^y mice. Biol. Pharm. Bull. 25, 188–192.
Hayashi, T., Hirshman, M.F., Fujii, N., Habinowski, S.A., Witters, L.A., Goodyear, L.J., 2000. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. Diabetes 49, 527–531.
Heymsfield, S.B., Allison, D.B., Vasselli, J.R., Pietrobelli, A., Greenfield, D., Nunez, C., 1998. *Garcinia cambogia* (hydroxycitric acid) as a potential antiobesity agent. JAMA 280, 1596–1600.
Ho, S.C., Tai, E.S., Eng, P.H., Tan, C.E., Fok, A.C., 2001. In the absence of dietary surveillance, chitosan does not reduce plasma lipids or obesity in hypercholesterolaemic obese Asian subjects. Singapore Med. J. 42, 6–10.
Hochuli, E., Kupfer, E., Maurer, R., Meister, W., Mercadal, Y., Schmidt, K., 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation. J. Antibiot. (Tokyo) 40, 1086–1091.
Hsu, C.L., Yen, G.C., 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. Mol. Nutr. Food Res. 50, 1072–1079.
Hsu, C.L., Yen, G.C., 2007. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. J. Agric. Food Chem. 55, 1730–1736.
Hsu, C.L., Yen, G.C., 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. Mol. Nutr. Food Res. 52, 53–61.
Hsu, H.K., Yang, Y.C., Hwang, J.H., Hong, S.J., 2003. Effects of *Toona sinensis* leaf extract on lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Kaohsiung J. Med. Sci. 19, 385–389.
Hu, Y., Davies, G.E., 2009. Berberine increases expression of GATA-2 and GATA-3 during inhibition of adipocyte differentiation. Phytomedicine 16, 864–873.
Huang, C., Zhang, Y., Gong, Z., Sheng, X., Li, Z., Zhang, W., Qin, Y., 2006a. Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPARgamma pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 348, 571–578.
Huang, T.H., Peng, G., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2006b. *Salacia oblonga* root improves postprandial hyperlipidemia and hepatic steatosis in zucker diabetic fatty rats: activation of PPAR-α. Toxicol. Appl. Pharmacol. 210, 225–235.
Hughes, G.M., Boyland, E.J., Williams, N.J., Mennen, L., Scott, C., Kirkham, T.C., Harrold, J.A., Keizer, H.G., Halford, J.C., 2008. The effect of Korean pine nut oil (pinno thin) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. Lipids Health Dis. 7, 1–10.
Hutton, B., Fergusson, D., 2004. 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.
Hwang, H.S., Kim, H.A., Lee, S.H., Yun, J.W., 2009a. Anti-obesity and anti-diabetic effects of deep sea water on *ob/ob* mice. Mar. Biotechnol. (NY) 11, 531–539.
Hwang, H.S., Kim, S.H., Yoo, Y.C., Chu, Y.S., Shon, Y.H., Nam, K.S., Yun, J.W., 2009b. Inhibitory effect of deep sea water on differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Mar. Biotechnol. (NY) 11, 161–168.
Hwang, J.T., Lee, M.S., Kim, H.J., Sung, M.J., Kim, H.Y., Kim, M.S., Kwon, D.Y., 2009c. Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR-γ signal pathways. Phytother. Res. 23, 262–266.
Hwang, J.T., Park, I.J., Shin, J.I., Lee, Y.K., Lee, S.K., Baik, H.W., Ha, J., Park, O.J., 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 694–699.
Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J., Yazawa, K., 2007. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 893–899.
Ishihara, K., Oyaizu, S., Fukuchi, Y., Mizunoya, W., Segawa, K., Takahashi, M., Mita, Y., Fukuya, Y., Fushiki, T., Yasumoto, K., 2003. A soybean peptide isolate diet promotes postprandial carbohydrate oxidation and energy expenditure in type II diabetic mice. J. Nutr. 133, 752–757.
Ito, M., Ito, J., Kitazawa, H., Shimamura, K., Fukami, T., Tokita, S., Shimokawa, K., Yamada, K., Kanatani, A., Uemura, D., 2009. *Daisuke uemura* (−)-tematin inhibits adipogenesis and lipid metabolism in 3T3-L1 cells. Peptides 30, 1074–1081.
Jeon, T., Hwang, S.G., Hirai, S., Matsui, T., Yano, H., Kawada, T., Lim, B.O., Park, D.K., 2004. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. Life Sci. 75, 3195–3203.
Jeon, J.R., Kim, J.Y., 2006. Effects of pine needle extract on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obesity in high-fat diet fed rats. Biol. Pharm. Bull. 29, 2111–2115.
Jiang, L., Zhang, N.X., Mo, W., Wan, R., Ma, C.G., Li, X., Gu, Y.L., Yang, X.Y., Tang, Q.Q., Song, H.Y., 2008. Rehmannia inhibits adipocyte differentiation and adipogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 371, 185–190.

Joseph, S.V., Miller, J.R., McLeod, R.S., Jacques, H., 2009. Effect of *trans*8, *cis*10 + *cis*9, *trans*11 conjugated linoleic acid mixture on lipid metabolism in 3T3-L1 cells. Lipids 44, 613–620.

Ka, S.O., Kim, K.A., Kwon, K.B., Park, J.W., Park, B.H., 2009. Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway. Int. J. Mol. Med. 23, 633–637.

Kaats, G.R., Michalek, J.E., Preuss, H.G., 2006. Evaluating efficacy of a chitosan product using a double-blinded, placebo-controlled protocol. J. Am. Coll. Nutr. 25, 389–394.

Kamphuis, M.M., Lejeune, M.P., Saris, W.H., Westerterp-Plantenga, M.S., 2003. Effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on appetite and food intake in overweight subjects. Eur. J. Clin. Nutr. 57, 1268–1274.

Kandulska, K., Nogowski, L., Szkudelski, T., 1999. Effect of some phytoestrogens on metabolism of rat adipocytes. Reprod. Nutr. Dev. 39, 497–501.

Kang, S.A., Hong, K., Jang, K.H., Kim, Y.Y., Choue, R., Lim, Y., 2006. Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPARα in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. J. Nutr. Biochem. 17, 419–426.

Kao, Y.H., Hiipakka, R.A., Liao, S., 2000. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. Endocrinology 141, 980–987.

Karamadoukis, L., Shivashankar, G.H., Judeman, L., Williams, A.J., 2009. An unusual complication of treatment with orlistat. Clin. Nephrol. 71, 430–432.

Kawada, T., Watanabe, T., Takaishi, T., Tanaka, T., Iwai, K., 1986. Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 183, 250–256.

Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K., Uchino, K., 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 102–104.

Kersten, S., 2002. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. Eur. J. Pharmacol. 440, 223–234.

Kim, E.J., Lee, H.I., Chung, K.J., Noh, Y.H., Ro, Y., Koo, J.H., 2009a. The ginsenoside-Rb2 lowers cholesterol and triacylglycerol levels in 3T3-L1 adipocytes cultured under high cholesterol or fatty acids conditions. BMB Rep. 42, 194–199.

Kim, H.J., Bae, I.Y., Ahn, C.W., Lee, S., Lee, H.G., 2007. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. Peptides 28, 2098–2103.

Kim, H.J., Takahashi, M., Ezaki, O., 1999b. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. J. Biol. Chem. 274, 25892–25898.

Kim, H.K., Della-Fera, M., Lin, J., Baile, C.A., 2006a. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. J. Nutr. 136, 2965–2969.

Kim, H.K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M.A., Yang, J.Y., Zhang, W., Duan, J., Hartzell, D.L., Hamrick, M.W., Baile, C.A., 2006b. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. J. Nutr. 136, 409–414.

Kim, H.M., Hong, S.H., Yoo, S.J., Baek, K.S., Jeon, Y.J., Choung, S.Y., 2006c. Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects. J. Med. Food 9, 427–430.

Kim, H.Y., Kang, M.H., 2005. Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. Phytother. Res. 19, 359–361.

Kim, J.H., Hahm, D.H., Yang, D.C., Kim, J.H., Lee, H.J., Shim, I., 2005. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. J. Pharmacol. Sci. 97, 124–131.

Kim, M.J., Chang, U.J., Lee, J.S., 2009b. Inhibitory effects of fucoidan in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Mar. Biotechnol. 11, 557–562.

Kim, M.S., Kim, J.K., Kim, H.J., Moon, S.R., Shin, B.C., Park, K.W., Yang, H.O., Kim, S.M., Park, R., 2003. Hibiscus extract inhibits the lipid droplet accumulation and adipogenic transcription factors expression of 3T3-L1 preadipocytes. J. Altern. Complement. Med. 9, 499–504.

Kim, M.S., Kim, J.K., Kwon, D.Y., Park, R., 2004a. Anti-adipogenic effects of *Garcinia* extract on the lipid droplet accumulation and the expression of transcription factor. Biofactors 22, 193–196.

Kim, S.N., Lee, J.H., Shin, H., Son, S.H., Kim, Y.S., 2009c. Effects of in vitro-digested ginsenosides on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Planta Med. 75, 596–601.

Kim, S.O., Yun, S.J., Jung, B., Lee, E.H., Hahm, D.H., Shim, I., Lee, H.J., 2004b. Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi var Mayuen*) in obesity rat fed high fat diet: relations of TNF-α and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. Life Sci. 75, 1391–1404.

Kim, Y.J., Shin, Y.O., Ha, Y.W., Lee, S., Oh, J.K., Kim, Y.S., 2006d. Anti-obesity effect of *Pinellia ternata* extract in zucker rats. Biol. Pharm. Bull. 29, 1278–1281.

Kimura, H., Ogawa, S., Jisaka, M., Kimura, Y., Katsube, T., Yokota, K., 2006. Identification of novel saponins from edible seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinate* Blume) after treatment with wooden ashes and their nutraceutical activity. J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 1657–1665.

Kishino, E., Ito, T., Fujita, K., Kiuchi, Y., 2006. A mixture of the *Salacia reticulata* (kotala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces the accumulation of visceral fat mass in mice and rats with high-fat diet-induced obesity. J. Nutr. 136, 433–439.

Kitahara, M., Asano, M., Naganawa, H., Maeda, K., Hamada, M., Aoyagi, T., Umezawa, H., Iitaka, Y., Nakamura, H., 1987. Valilactone, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) 40, 1647–1650.

Klein, G., Kim, J., Himmeldirk, K., Cao, Y., Chen, X., 2007. Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. Evid. Based Complement. Altern. Med. 4, 401–407.

Klontz, K.C., Timbo, B.B., Street, D., 2006. Consumption of dietary supplements containing *Citrus aurantium* (bitter orange) – 2004 California behavioral risk factor surveillance survey (BRFSS). Ann. Pharmacother. 40, 1747–1751.

Kobayashi, Y., Nakano, Y., Kizaki, M., Hoshikuma, K., Yokoo, Y., Kamiya, T., 2001. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist. Planta Med. 67, 628–633.

Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64, 923–933.

Ku, H.C., Chang, H.H., Liu, H.C., Hsiao, C.H., Lee, M.J., Hu, Y.J., Hung, P.F., Liu, C.W., Kao, Y.H., 2009. Green tea (−)-epigallocatechin gallate inhibits insulin stimulation of 3T3-L1 preadipocyte mitogenesis via the 67-kDa laminin receptor pathway. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 297, C121–C132.

Kubota, H., Morii, R., Kojima-Yuasa, A., Huang, X., Yano, Y., Matsui-Yuasa, I., 2009. Effect of *Zizyphus jujuba* extract on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. Am. J. Chin. Med. 37, 597–608.

Kumar, M.V., Sunvold, G.D., Scarpace, P.J., 1999. Dietary vitamin a supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. J. Lipid Res. 40, 824–829.

Kumar, S.G., Rahman, M.A., Lee, S.H., Hwang, H.S., Kim, H.A., Yun, J.W., 2009. Plasma proteome analysis for anti-obesity and anti-diabetic potentials of chitosan oligosaccharides in *ob/ob* mice. Proteomics 9, 2149–2162.

Kurihara, H., Asami, S., Shibata, H., Fukami, H., Tanaka, T., 2003. Hypolipemic effect of *Cyclocarya paliurus* (batal) Iljinskaja in lipid-loaded mice. Biol. Pharm. Bull. 26, 383–385.

Kuriyan, R., Raj, T., Srinivas, S.K., Vaz, M., Rajendran, R., Kurpad, A.V., 2007. Effect of *Caralluma fimbriata* extract on appetite, food intake and anthropometry in adult Indian men and women. Appetite 48, 338–344.

Kwon, C.S., Sohn, H.Y., Kim, S.H., Kim, J.H., Son, K.H., Lee, J.S., Lim, J.K., Kim, J.S., 2003. Anti-obesity effect of *Diascorea nipponica* makino with lipase-inhibitory activity in rodents. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 1451–1456.

Lane, M.D., Cha, S.H., 2009. Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. Biochem. Biophs. Res. Commun. 382, 1–5.

Langin, D., 2006. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. Pharmacol. Res. 53, 482–491.

Lean, M.E., 2001. How does sibutramine work? Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 4, S8–S11.

Lee, G.W., Yoon, H.C., Byun, S.Y., 2004. Inhibitory effect of *Eucommia ulmoides* oliver on adipogenic differentiation through proteome analysis. Enzyme Microb. Technol. 35, 632–638.

Lee, H., Kang, R., Yoon, Y., 2009a. Shikonin inhibits fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Phytother. Res., 16 July 2009 [Epub ahead of print].

Lee, I.A., Lee, J.H., Baek, N.I., Kim, D.H., 2005. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite Crocetin. Biol. Pharm. Bull. 28, 2106–2110.

Lee, J., Chae, K., Ha, J., Park, B.Y., Lee, H.S., Jeong, S., Kim, M.Y., Yoon, M., 2008a. Regulation of obesity and lipid disorders by herbal extracts from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* in high-fat diet-induced obese mice. J. Ethnopharmacol. 115, 263–270.

Lee, J., Jung, E., Lee, J., Kim, S., Huh, S., Kim, Y., Kim, Y., Byun, S.Y., Kim, Y.S., Park, D., 2009b. Isorhamnetin represses adipogenesis in 3T3-L1 cells. Obesity (Silver Spring) 17, 226–232.

Lee, J.S., Lee, M.K., Ha, T.Y., Bok, S.H., Park, H.M., Jeong, K.S., Woo, M.N., Do, G.M., Yeo, J.Y., Choi, M.S., 2006a. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet. Food Chem. Toxicol. 44, 1875–1883.

Lee, M.S., Kim, C.T., Kim, I.H., Kim, Y., 2008b. Inhibitory effects of green tea catechin on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Phytother. Res. 23, 1088–1091.

Lee, R.A., Balick, M.J., 2007. Indigenous use of *Hoodia gordonii* and appetite suppression. Explore (NY) 3, 404–406.

Lee, Y.K., Lee, W.S., Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Surh, Y.J., Park, O.J., 2009c. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPKα-PPAR-γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPKα-COX-2 in cancer cells. J. Agric. Food Chem. 57, 305–310.

Lee, Y.S., Kim, W.S., Kim, K.H., Yoon, M.J., Cho, H.J., Shen, Y., Ye, J.M., Lee, C.H., Oh, W.K., Kim, C.T., Hohnen-Behrens, C., Gosby, A., Kraegen, E.W., James, D.E., Kim, J.B., 2006b. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. Diabetes 55, 2256–2264.

Lefterova, M.I., Lazar, M.A., 2009. New developments in adipogenesis. Trends Endocrin. Met. 20, 107–114.

Lei, F., Zhang, X.N., Wang, W., Xing, D.M., Xie, W.D., Su, H., Du, L.J., 2007. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. Int. J. Obes. (Lond.) 31, 1023–1029.

Lei, T., Xie, W., Han, J., Corkey, B.E., Hamilton, J.A., Guo, W., 2004. Medium-chain fatty acids attenuate agonist-stimulated lipolysis, mimicking the effects of starvation. Obes. Res. 12, 599–611.

Li, J.J., Huang, C.J., Xie, D., 2008a. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. Mol. Nutr. Food Res. 52, 631–645.

Li, Y., Huang, T.H., Yamahara, J., 2008b. *Salacia* root, a unique ayurvedic medicine, meets multiple targets in diabetes and obesity. Life Sci. 82, 1045–1049.

Lin, J., Della-Fera, M.A., Baile, C.A., 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. Obes. Res. 13, 982–990.
Lin, J.K., Lin-Shiau, S.Y., 2006. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. Mol. Nutr. Food Res. 50, 211–217.
Lin, Y., Kreeft, A., Schuurbiers, J.A., Draijer, R., 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. J. Nutr. Biochem. 12, 183–189.
Liu, D.Z., Wang, F., Liao, T.G., Tang, J.G., Steglich, W., Zhu, H.J., Liu, J.K., 2006. Vibralactone: a lipase inhibitor with an unusual fused beta-lactone produced by cultures of the basidiomycete *Boreostereum vibrans*. Org. Lett. 8, 5749–5752.
Liu, F., Kim, J., Li, Y., Liu, X., Li, J., Chen, X., 2001. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake – stimulatory and adipocyte differentiation – inhibitory activities in 3T3-L1 cells. J. Nutr. 131, 2242–2247.
Liu, L.F., Purushotham, A., Wendel, A.A., Belury, M.A., 2007. Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 92, G1671–G1682.
Liu, X., Kim, J.K., Li, Y., Li, J., Liu, F., Chen, X., 2005. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. J. Nutr. 135, 165–171.
MacLean, D.B., Luo, L.G., 2004. Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. Brain Res. 1020, 1–11.
Madsen, L., Petersen, R.K., Kristiansen, K., 2005. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. Biochim. Biophys. Acta 1740, 266–286.
Mae, T., Kishida, H., Nishiyama, T., Tsukagawa, M., Konishi, E., Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Takahashi, K., Kawada, T., Nakagawa, K., Kitahara, M., 2003. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor-γ ligand-binding activity affects diabetes in KK-A^y mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive Rats. J. Nutr. 133, 3369–3377.
Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K., 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332, 392–397.
Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K., 2007a. Effect of medium-chain triacylglycerols on anti-obesity effect of fucoxanthin. J. Oleo. Sci. 56, 615–621.
Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K., 2007b. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-A^y mice. J. Agric. Food Chem. 55, 7701–7706.
Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyashita, K., 2006. Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Int. J. Mol. Med. 18, 147–152.
Manjunatha, H., Srinivasan, K., 2007. Hypolipidemic and antioxidant effects of curcumin and capsaicin in high-fat-fed rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 85, 588–596.
Matsuo, K., Arai, H., Muto, K., Fukaya, M., Sato, T., Mizuno, A., Sakuma, M., Yamanaka-Okumura, H., Sasaki, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Doi, T., Takeda, E., 2007. The anti-obesity effect of the palatinose-based formula inslow is likely due to an increase in the hepatic PPAR-α and adipocyte PPAR-γ gene expressions. J. Clin. Biochem. Nutr. 40, 234–241.
Mayer, M.A., Hocht, C., Puyo, A., Taira, C.A., 2009. Recent advances in obesity pharmacotherapy. Curr. Clin. Pharmacol. 4, 53–61.
Melnikova, I., Wages, D., 2006. Anti-obesity therapies. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 369–370.
Mendes, V., Monteiro, R., Pestana, D., Teixeira, D., Calhau, C., Azevedo, I., 2008. Xanthohumol influences preadipocyte differentiation: implication of antiproliferative and apoptotic effects. J. Agric. Food Chem. 56, 11631–11637.
Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M.L., Palou, A., 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. Endocrinology 14, 5325–5332.
Miller, M., Chen, S., Woodliff, J., Kansra, S., 2008. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and decreases hormone levels and secretion in pituitary tumor cells. Endocrinology 149, 4158–4167.
Moon, H.S., Lee, H.G., Choi, Y.J., Kim, T.G., Cho, C.S., 2007. Proposed mechanisms of (−)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. Chem. Biol. Interact. 167, 85–98.
Moon, H.S., Lee, H.G., Seo, J.H., Chung, C.S., Kim, T.G., Kim, I.Y., Lim, K.W., Seo, S.J., Choi, Y.J., Cho, C.S., 2006. Down-regulation of PPARγ2-induced adipogenesis by PEGylated conjugated linoleic acid as the pro-drug: attenuation of lipid accumulation and reduction of apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 456, 19–29.
Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle, D.L., Fried, S.K., Raskin, I., 2003. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. Nutrition 19, 876–879.
Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A., Raskin, I., 2006. Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. Life Sci. 78, 2797–2803.
Morimoto, C., Satoh, Y., Hara, M., Inoue, S., Tsujita, T., Okuda, H., 2005. Anti-obese action of raspberry ketone. Life Sci. 77, 194–204.
Moriyama, T., Kishimoto, K., Nagai, K., Urade, R., Ogawa, T., Utsumi, S., Maruyama, N., Maebuchi, M., 2004. Soybean β-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of β-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 352–359.
Moro, C.O., Basile, G., 2000. Obesity and medicinal plants. Fitoterapia 71, S73–S82.
Murasaki, S., Lee, T.R., Muroyama, K., Shin, E.S., Cho, S.Y., Yamamoto, Y., Lee, S.J., 2007. A combination of caffeine, arginine, soy isoflavones, and L-carnitine enhances both lipolysis and fatty acid oxidation in 3T3-L1 and hepG2 cells in vitro and in KK mice in vivo. J. Nutr. 137, 2252–2257.
Mutoh, M., Nakada, N., Matsukuma, S., Ohshima, S., Yoshinari, K., Watanabe, J., Arisawa, M., 1994. Panclicins, novel pancreatic lipase inhibitors. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. J. Antibiot. (Tokyo) 47, 1369–1375.
Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M.A., Bunick, D., Doerge, D.R., Lubahn, D.B., Helferich, W.G., Cooke, P.S., 2003. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. Endocrinology 144, 3315–3320.
Nagao, T., Komine, Y., Soga, S., Meguro, S., Hase, T., Tanaka, Y., Tokimitsu, I., 2005. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. Am. J. Clin. Nutr. 81, 122–129.
Nakagawa, K., Kishida, H., Arai, N., Nishiyama, T., Mae, T., 2004. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A^y mice. Biol. Pharm. Bull. 27, 1775–1778.
Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., Kiso, Y., 2005. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. J. Agric. Food Chem. 53, 4593–4598.
Nakayama, T., Suzuki, S., Kudo, H., Sassa, S., Nomura, M., Sakamoto, S., 2007. Effects of three Chinese herbal medicines on plasma and liver lipids in mice fed a high-fat diet. J. Ethnopharmacol. 109, 236–240.
Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M., 2004. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 1943–1946.
Oben, J., Kuate, D., Agbor, G., Momo, C., Talla, X., 2006. The use of a *Cissus quadrangularis* formulation in the management of weight loss and metabolic syndrome. Lipids Health Dis. 5, 24.
Oben, J.E., Enyegue, D.M., Fomekong, G.I., Soukontoua, Y.B., Agbor, G.A., 2007. The effect of *Cissus quadrangularis* (CQR-300) and a *Cissus formulation* (CORE) on obesity and obesity-induced oxidative stress. Lipids Health Dis. 6, 4.
Oben, J.E., Ngondi, J.L., Blum, K., 2008. Inhibition of *Irvingia gabonensis* seed extract (OB131) on adipogenesis as mediated via down regulation of the PPARgamma and leptin genes and up-regulation of the adiponectin gene. Lipids Health Dis. 7, 44.
Ogawa, T., Tabata, H., Katsube, T., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Yamasaki, M., Shiwaku, K., 2009. Suppressive effect of hot water extract of wasabi (*Wasabia japonica Matsum.*) leaves on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Food Chem. Available online 6 May 2009.
Ohia, S.E., Opere, C.A., LeDay, A.M., Bagchi, M., Bagchi, D., Stohs, S.J., 2002. Safety and mechanism of appetite suppression by a novel hydroxycitric acid extract (HCA-SX). Mol. Cell. Biochem. 238, 89–103.
Ohkoshi, E., Miyazaki, H., Shindo, K., Watanabe, H., Yoshida, A., Yajima, H., 2007. Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. Planta Med. 73, 1255–1259.
Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K., 2008. Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells. J. Oleo. Sci. 57, 345–351.
Okuno, M., Kajiwara, K., Imai, S., Kobayashi, T., Honma, N., Maki, T., Suruga, K., Goda, T., Takase, S., Muto, Y., Moriwaki, H., 1997. Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. J. Nutr. 127, 1752–1757.
Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S., Ohizumi, Y., 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. J. Ethnopharmacol. 106, 238–244.
Orci, L., Cook, W.S., Ravazzola, M., Wang, M.Y., Park, B.H., Montesano, R., Unger, R.H., 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 2058–2063.
Pang, J., Choi, Y., Park, T., 2008. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. Arch. Biochem. Biophys. 476, 178–185.
Papamandjaris, A.A., MacDougall, D.E., Jones, P.J., 1998. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. Life Sci. 62, 1203–1215.
Park, H.J., Yang, J.Y., Ambati, S., Della-Fera, M.A., Hausman, D.B., Rayalam, S., Baile, C.A., 2008a. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. J. Med. Food 11, 773–783.
Park, M.Y., Lee, K.S., Sung, M.K., 2005. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and hanaba on glucose homeostasis in relation to PPAR-α, PPAR-γ, and LPL mRNA expressions. Life Sci. 77, 3344–3354.
Park, S., Ahn, I.S., Kwon, D.Y., Ko, B.S., Jun, W.K., 2008b. Ginsenosides Rb1 and Rg1 suppress triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes and enhance beta-cell insulin secretion and viability in Min6 cells via PKA-dependent pathways. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 2815–2823.
Park, S.A., Choi, M.S., Kim, M.J., Jung, U.J., Kim, H.J., Park, K.K., Noh, H.J., Park, H.M., Park, Y.B., Lee, J.S., Lee, M.K., 2006a. Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/ks*j-db/db* mice. J. Ethnopharmacol. 107, 412–417.
Park, S.H., Lee, S.G., Kang, S.K., Chung, S.H., 2006b. *Acanthopanax senticosus* reverses fatty liver disease and hyperglycemia in *ob/ob* mice. Arch. Pharm. Res. 29, 768–776.
Parrish, C.C., Pathy, D.A., Angel, A., 1990. Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. Metabolism 39, 217–219.

Pasman, W.J., Heimerikx, J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O'Shea, M., Gambelli, L., Hendriks, H.F., Einerhand, A.W., Scott, C., Keizer, H.G., Mennen, L.I., 2008. The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. Lipids Health Dis. 7, 10.

Pérez-Matute, P., Pérez-Echarri, N., Martínez, J.A., Marti, A., Moreno-Aliaga, M.J., 2007. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-α. Br. J. Nutr. 97, 389–398.

Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngram, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., et al., 2004. Sirt 1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature 429, 771–776.

Poston, W.S., Foreyt, J.P., 2004. Sibutramine and the management of obesity. Expert Opin. Pharmacother. 5, 633–642.

Racotta, I.S., Leblanc, J., Richard, D., 1994. The effect of caffeine on food intake in rats: involvement of corticotropin-releasing factor and the sympatho-adrenal system. Pharmacol. Biochem. Behav. 48, 887–892.

Rahman, M.A., Kumar, S.G., Kim, S.W., Hwang, H.J., Baek, Y.M., Lee, S.H., Hwang, H.S., Shon, Y.H., Nam, K.S., Yun, J.W., 2008a. Proteomic analysis for inhibitory effect of chitosan oligosaccharide on 3T3-L1 adipocyte differentiation. Proteomics 8, 565–581.

Rahman, M.A., Kumar, S.G., Lee, S.H., Hwang, H.S., Kim, H.A., Yun, J.W., 2008b. Proteome analysis for 3T3-L1 adipocyte differentiation. J. Microbiol. Biotechnol. 18, 1895–1902.

Rayalam, S., Della-Fera, M.A., Baile, C.A., 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. J. Nutr. Biochem. 19, 717–726.

Redinger, R.N., 2009. Fat storage and the biology of energy expenditure. Transl. Res. 154, 52–60.

Remesar, X., Guijarro, P., Torregrosa, C., Grasa, M.M., López, J., Fernández-López, J.A., Alemany, M., 2000. Oral oleoyl-estrone induces the rapid loss of body fat in zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 24, 1405–1412.

Roffey, B.W., Atwal, A.S., Johns, T., Kubow, S., 2007. Water extracts from Momordica charantia increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells. J. Ethnopharmacol. 112, 77–84.

Romero, M.M., Esteve, M., Fernández-López, J.A., Alemany, M., 2007. The conjugated linoleic acid ester of estrone induces the mobilisation of fat in male wistar rats. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 375, 283–290.

Rong, X., Kim, M.S., Su, N., Wen, S., Matsuo, Y., Yamahara, J., Murray, M., Li, Y., 2008. An aqueous extract of *Salacia oblonga* root, a herb-derived peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator, by oral gavage over 28 days induces gender-dependent hepatic hypertrophy in rats. Food Chem. Toxicol. 46, 2165–2172.

Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., Witters, L.A., 1999. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. Am. J. Physiol. 276, E1–E18.

Saha, A.K., Ruderman, N.B., 2003. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. Mol. Cell. Biochem. 253, 65–70.

Saito, M., Ueno, M., Ogino, S., Kubo, K., Nagata, J., Takeuchi, M., 2005. High dose of *Garcinia cambogia* is effective in suppressing fat accumulation in developing male zucker obese rats, but highly toxic to the testis. Food Chem. Toxicol. 43, 411–419.

Sakurai, N., Mochizuki, K., Kameji, H., Shimada, M., Goda, T., 2009. (−)-Epigallocatechin gallate enhances the expression of genes related to insulin sensitivity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes at an early stage of differentiation. Nutrition, 15 June 2009 [Epub ahead of print].

Salas, A., Remesar, X., Esteve, M., 2007. Oleoyl-estrone treatment activates apoptotic mechanisms in white adipose tissue. Life Sci. 80, 293–298.

Sharma, N., Sharma, V.K., Seo, S.Y., 2005. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. J. Ethnopharmacol. 97, 453–456.

Sheng, L., Qian, Z., Zheng, S., Xi, L., 2006. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: crocin inhibits pancreatic lipase. Eur. J. Pharmacol. 543, 116–122.

Sheng, X., Zhang, Y., Gong, Z., Huang, C., Zang, Y.Q., 2008. Improved insulin resistance and lipid metabolism by cinnamon extract through activation of peroxisome proliferator-activated receptors. PPAR Res. 2008, 1–9.

Shimada, T., Hiramatsu, N., Kasai, A., Mukai, M., Okamura, M., Yao, J., Huang, T., Tamai, M., Takahashi, S., Nakamura, T., Kitamura, M., 2008. Suppression of adipocyte differentiation by *Cordyceps militaris* through activation of the aryl hydrocarbon receptor. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 295, E859–E867.

Shimoda, H., Seki, E., Aitani, M., 2006. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. BMC Complement. Altern. Med. 6, 9.

Slanc, P., Doljak, B., Milnaric, A., Strukelj, B., 2004. Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase. Phytother. Res. 18, 758–762.

Slovacek, L., Pavlik, V., Slovackova, B., 2008. The effect of sibutramine therapy on occurrence of depression symptoms among obese patients. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 18, e43–e44.

Sørensen, L.B., Cueto, H.T., Andersen, M.T., Bitz, C., Holst, J.J., Rehfeld, J.F., Astrup, A., 2008. The effect of salatrim, a low-calorie modified triacylglycerol, on appetite and energy intake. Am. J. Clin. Nutr. 87, 1163–1169.

St-Onge, M.P., Jones, P.J., 2002. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. J. Nutr. 132, 329–332.

St-Onge, M.P., Lamarche, B., Mauger, J.F., Jones, P.J., 2003a. Consumption of a functional oil rich in phytosterols and medium-chain triglyceride oil improves plasma lipid profiles in men. J. Nutr. 133, 1815–1820.

St-Onge, M.P., Ross, R., Parsons, W.D., Jones, P.J., 2003b. Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. Obes. Res. 11, 395–402.

Sumiyoshi, M., Kimura, Y., 2006. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. J. Pharm. Pharmacol. 58, 201–207.

Suryawan, A., Hu, C.Y., 1997. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. J. Anim. Sci. 75, 112–117.

Szkudelska, K., Nogowski, L., Szkudelski, T., 2000. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 75, 265–271.

Takahashi, T., Tabuchi, T., Tamaki, Y., Kosaka, K., Takikawa, Y., Satoh, T., 2009. Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cells through induction of phase2 enzymes and activation of glutathione metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 549–554.

Takao, I., Fujii, S., Ishii, A., Han, L.X., Kumao, T., Ozaki, K., 2006. Effects of mannooligosaccharides from coffee mannan on fat storage in mice fed a high fat diet. J. Health Sci. 52, 333–337.

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

Thuraisajah, P.H., Syn, W.K., Neil, D.A., Stell, D., Haydon, G., 2005. Orlistat (xenical)-induced subacute liver failure. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 17, 1437–1438.

Tominaga, S., Sugahara, T., Nishimoto, S., Yamawaki, M., Nakashima, Y., Kishida, T., Akiyama, K., Maruyama, M., Yamauchi, S., 2009. The effect of secoisolariciresinol on 3T3-L1 adipocytes and the relationship between molecular structure and activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 35–39.

Tomoda, H., Namatame, I., Omura, S., 2002. Microbial metabolites with inhibitory activity against lipid metabolism. Proc. Japan Acad. 78, 217–240.

Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Kim, H., Ezaki, O., 1999. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 257, 879–885.

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., Osawa, T., 2003. Dietary cyanidin 3-*O*-β-d-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. J. Nutr. 133, 2125–2130.

Tsuda, T., Ueno, Y., Aoki, H., Koda, T., Horio, F., Takahashi, N., Kawada, T., Osawa, T., 2004. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 149–157.

Tsujita, T., Takaichi, H., Takaku, T., Aoyama, S., Hiraki, J., 2006. Antiobesity action of ε-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase. J. Lipid Res. 47, 1852–1858.

Tziomalos, K., Krassas, G.E., Tzotzas, T., 2009. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update. Vasc. Health Risk Manag. 5, 441–452.

Umezawa, H., Aoyagi, T., Hazato, T., Uotani, K., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T., 1978. Esterastin, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) 31, 639–641.

Umezawa, H., Aoyagi, T., Uotani, K., Hamada, M., Takeuchi, T., Takahashi, S., 1980. Ebelactone, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) 33, 1594–1596.

Urizar, N.L., Moore, D.D., 2003. GUGULIPID: a natural cholesterol-lowering agent. Annu. Rev. Nutr. 23, 303–313.

Uto-Kondo, H., Ohmori, R., Kiyose, C., Kishimoto, Y., Saito, H., Igarashi, O., Kondo, K., 2009. Tocotrienol suppresses adipocyte differentiation and akt phosphorylation in 3T3-L1 preadipocytes. J. Nutr. 139, 51–57.

van Heerden, F.R., 2008. *Hoodia gordonii*: a natural appetite suppressant. J. Ethnopharmacol. 119, 434–437.

van Heerden, F.R., Marthinus Horak, R., Maharaj, V.J., Vleggaar, R., Senabe, J.V., Gunning, P.J., 2007. An appetite suppressant from *Hoodia* species. Phytochemistry 68, 2545–2553.

Verma, S.K., Bordia, A., 1988. Effect of commiphora mukul (gum guggulu) in patients of hyperlipidemia with special reference to HDL-cholesterol. Indian J. Med. Res. 87, 356–360.

Wang, S.L., Li, Y., Wen, Y., Chen, Y.F., Na, L.X., Li, S.T., Sun, C.H., 2009. Curcumin, a potential inhibitor of up-regulation of TNF-alpha and IL-6 induced by palmitate in 3T3-L1 adipocytes through NF-kappaB and JNK pathway. Biomed. Environ. Sci. 22, 32–39.

Wang, Y.W., Jones, P.J., 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 28, 941–955.

Weibel, E.K., Hadvary, P., Hochuli, E., Kupfer, E., Lengsfeld, H., 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. J. Antibiot. (Tokyo) 40, 1081–1085.

Weigle, D.S., 2003. Pharmacological therapy of obesity: past, present, and future. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88, 2462–2469.

Weisberg, S.P., Leibel, R., Tortoriello, D.V., 2008. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabesity. Endocrinology 149, 3549–3558.

WHO, 2009. Obesity and overweight. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>.

Winder, W.W., Hardie, D.G., 1999. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. Am. J. Physiol. 277, E1–E10

Wolfram, S., Wang, Y., Thielecke, F., 2006. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. Mol. Nutr. Food Res. 50, 176–187.

Won, S.R., Kim, S.K., Kim, Y.M., Lee, P.H., Ryu, J.H., Kim, J.W., Rhee, H.I., 2007. Licochalcone A: lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. Food Res. Int. 40, 1046–1050.

Wu, Z., Puigserver, P., Spiegelman, B.M., 1999. Transcriptional activation of adipogenesis. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 689–694.
Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S., 2005. Appetite control. J. Endocrinol. 184, 291–318.
Xie, J.T., Wang, C.Z., Ni, M., Wu, J.A., Mehendale, S.R., Aung, H.H., Foo, A., Yuan, C.S., 2007. American ginseng berry juice intake reduces blood glucose and body weight in *ob/ob* mice. J. Food Sci. 72, S590–S594.
Xiong, Z.D., Li, P.G., Mu, T.H., 2009. The differentiation- and proliferation-inhibitory effects of sporamin from sweet potato in 3T3-L1 preadipocytes. Agric. Sci. China 8, 671–677.
Xu, B.J., Han, L.K., Zheng, Y.N., Lee, J.H., Sung, C.K., 2005. *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi radix* on pancreatic lipase. Arch. Pharm. Res. 28, 180–185.
Yamamoto, M., Shimura, S., Itoh, Y., Ohsaka, T., Egawa, M., Inoue, S., 2000. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, nomame herba, on rats fed a high-fat diet. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 24, 758–764.
Yang, J.Y., Della-Fera, M.A., Baile, C.A., 2008a. Guggulsterone inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 cells. Obesity (Silver Spring) 16, 16–22.
Yang, J.Y., Della-Fera, M.A., Hartzell, D.L., Nelson-Dooley, C., Hausman, D.B., Baile, C.A., 2006a. Esculetin induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. Obesity (Silver Spring) 14, 1691–1699.
Yang, J.Y., Della-Fera, M.A., Rayalam, S., Ambati, S., Hartzell, D.L., Park, H.J., Baile, C.A., 2008b. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. Life Sci. 82, 1032–1039.
Yang, J.Y., Della-Fera, M.A., Rayalam, S., Baile, C.A., 2007. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. Apoptosis 12, 1953–1963.
Yang, J.Y., Lee, S.J., Park, H.W., Cha, Y.S., 2006b. Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. J. Med. Food 9, 459–467.
Yoon, S.S., Rhee, Y.H., Lee, H.J., Lee, E.O., Lee, M.H., Ahn, K.S., Lim, H.T., Kim, S.H., 2008. Uncoupled protein 3 and p38 signal pathways are involved in anti-obesity activity of *Solanum tuberosum* L. Cv. Bora Valley. J. Ethnopharmacol. 118, 396–404.
Yoshikawa, M., Shimoda, H., Nishida, N., Takada, M., Matsuda, H., 2002. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. J. Nutr. 132, 1819–1824.
Yoshinari, K., Aoki, M., Ohtsuka, T., Nakayama, N., Itezono, Y., Mutoh, M., Watanabe, J., Yokose, K., 1994. Panclicins, novel pancreatic lipase inhibitors. II. Structural elucidation. J. Antibiot. (Tokyo) 47, 1376–1384.
Yoshizumi, K., Hirano, K., Ando, H., Hirai, Y., Ida, Y., Tsuji, T., Tanaka, T., Satouchi, K., Terao, J., 2006. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. J. Agric. Food Chem. 54, 335–341.
Yun, S.N., Moon, S.J., Ko, S.K., Im, B.O., Chung, S.H., 2004. Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. Arch. Pharm. Res. 27, 790–796.
Zhang, M., Ikeda, K., Xu, J.W., Yamori, Y., Gao, X.M., Zhang, B.L., 2009. Genistein suppresses adipogenesis of 3T3-L1 cells via multiple signal pathways. Phytother. Res. 23, 713–718.
Zhao, H.L., Kim, Y.S., 2004. Determination of the kinetic properties of platycodin D for the inhibition of pancreatic lipase using a 1,2-diglyceride-based colorimetric assay. Arch. Pharm. Res. 27, 968–972.
Zhao, H.L., Sim, J.S., Shim, S.H., Ha, Y.W., Kang, S.S., Kim, Y.S., 2005. Antiobese and hypolipidemic effects of platycodin saponins in diet-induced obese rats: evidences for lipase inhibition and calorie intake restriction. Int. J. Obes. (Lond.) 29, 983–990.
Zheng, Q., Koike, K., Han, L.K., Okuda, H., Nikaido, T., 2004. New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. J. Nat. Prod. 67, 604–613.
Zong, W., Zhao, G., 2007. Corosolic acid isolation from the leaves of *Eriobotrya japonica* showing the effects on carbohydrate metabolism and differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 16, 346–352.



Jong Won Yun received his MSc degree in 1987 from the Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan, Korea. He was employed for six years as research scientist in CJ Cheiljedang R&D Center. The focus of his laboratory was to development of functional sweeteners such as fructooligosaccharides and palatinose from natural resources. In 1992, he started his PhD study at the Department of Chemical Engineering, Pusan National University. The focus of his PhD studies was production of fructooligosaccharides and isomaltooligosaccharides by several transferases. In 1995, following his PhD study, he was employed as Assistant Professor at the Department of Biotechnology, Daegu University, where his work is focused on production of biomaterials with anti-diabetic and anti-obesity activity. Recently, he has studied clinical proteomics to discover anti-obesity biomarkers in response to anti-obesity drugs or medicinal compounds with anti-obesity activity. He is acting as an editor or editorial board member of several international journals including Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Journal of Microbiology and Biotechnology, and Biotechnology and Bioprocess Engineering. He has published 130 international papers and 54 domestic papers in the fields of functional biomaterials and proteomics.

Korean J Physiol Pharmacol

Vol 17: 417 —422, October, 2013

http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2013.17.5.417

Dosis inefectivas de Dexmedetomidina Potencializa la Antinocicepción Inducida por morfina y fentanilo en el Modelo de Dolor Agudo

Mumin Unal[1], Sinan Gursoy[1], Ahmet Altun[2], Cevdet Duger[1], Iclal Ozdemir Kol[1], Kenan Kaygusuz[1], Ihsan Bagcivan[2], and Caner Mimaroglu[1]

Departmentos de [1] Anestesiología, [2] Farmacología, Escuela de Medicina de la Universidad de Cumhuriyet, Sivas 58140, Turquía

El objetivo de este estudio fue evaluar la potenciación sinérgica efecto de dosis no efectivas de dexmedetomidina en la antinocicepción inducida por morfina y fentanilo en el modelo de dolor agudo in ratas. Setenta ratas albino Wistar fueron separadas en 7 grupos. Los datos para los grupos control y falso positive fueron registrados. La dosis no efectiva de dexmedetomidina fue investigada y se encontró que fue de 3 μg/kg. A cada grupo se le administraron los siguientes medicamentos: 3 mg/kg de morfina (intraperitoneal) al Grupo 3, 5 μg/kg fentanilo (intraperitoneal) al Grupo 4, dexmedetomidina 3 μg/kg (subcutáneamente) al Grupo 5, dexmedetomidina 3 μg/kg (subcutánea)+3 mg/kg morfina (intraperitoneal) al Grupo 6 y finalmente 3 μg/kg de dexmedetomidina (subcutánea)+5μg/kg fentanilo (intraperitoneal) al Grupo 7. Justo antes de la aplicación y 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la administración del medicamento, dos mediciones de pruebas de latigazo de cola (TF) y placa caliente (HP) fueron llevados a cabo. Los promedios de las mediciones fueron registrados. Latencias de TF y HP fueron los principales resultados. El efecto analgésico de las combinaciones con dexmedetomidina+morfina (Grupo 6) y dexmedetomidina+fentanilo (Grupo 7), comparados con el efecto analgésico de morfina sola y fentanilo solo fue significativamente más alto a 15, 30, 60 y 90 minutos después de la administración. En este estudio, la dexmedetomidina en dosis no efectivas, cuando se combinó con morfina y fentanilo, potenció los efectos de la morfina y fentanilo.

Palabras clave: Dolor agudo, Dexmedetomidina, Fentanilo, Morfina, Potenciación

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los fármacos usados en el tratamiento of dolor pueden dividirse en dos grupos farmacológicos: no-opioides (adyuvantes) u opioides [1-3]. Puesto que los opioides más comunes usados como analgésicos tienen efectos secundarios como dependencia y tolerancia, así como depresión respiratoria y constipación, mientras que los fármacos no-esteroideos anti-inflamatorios (NSAID) tienen serios efectos secundarios gastrointestinales y también causan daño al riñón [1,4,5], los investigadores están trabajando activamente para desarrollar nuevos fármacos

adyuvantes. Los beneficios terapéuticos de fármacos auxiliares pueden resumirse como sigue: contribuyen a la formación de un analgésico fuerte así como dar la oportunidad para reducir la dosis de fármacos principales; en particular, reducen la frecuencia de efectos secundarios de opioides tales como nausea, vómito, constipación, prurito, sedación, y depresión respiratoria [6]. De acuerdo con esto, un enfoque alternativo a la mono-terapia que puede ser útil en el tratamiento de dolor es combinar opioides con analgésicos adyuvantes o con otros fármacos que, por su propia cuenta, no tienen efectividad analgésica pero no obstante amplifican los efectos del opioide, requiriendo así una dosis menor del opioide y reduciendo sus efectos laterales [6].

La dexmedetomidina es un agonista de3 α2-adrenoceptor fuerte y altamente selectivo que posee un amplio espectro de propiedades farmacológicas. Los agonistas α2-adrenérgicos proporcionan sedación, ansiólisis, e hipnosis así como analgesia propiedades simpatolíticas. En años recientes, la dexmedetomidina ha conseguido un importante lugar en investigaciones, así como en el tratamiento de dolor, porque tiene efectos analgésicos comparables a opioides pero no muestra los efectos segundarios de los opioides, como dependencia y tolerancia. Este mecanismo del efecto del fármaco, que se ha reportado que actúa a través de receptores opioidérgicos, noradrenérgicos y serotonérgicos, no está completamente aclarado [7,8]. Se has aceptado ampliamente que la co-administración de agonistas del receptor α2-adrenérgico u agonistas del receptor μ produce efectos sinérgicos antinociceptivos en dosis clínicamente efectivas. No obstante, nuestro estudio es un novedoso estudio que difiere de otros estudios en que usa dosis no efectivas de dexmedetomidina para lograr un efecto de potenciación.

ABREVIATURAS: NSAID, fármacos anti-inflamatorios no-esteroidales; i.p, intraperitonealmente; s.c, subcutáneamente; TF, latigazo de la cola; TFL, latencias del latigazo de la cola; HP, placa caliente.

En este estudio hemos intentado evaluar la potenciación sinérgica de dexmedetomidina en dosis no efectivas sobre la anti-nocicepción inducida por morfina y fentanilo en un modelo de dolor agudo que hicimos a través del método del latigazo de cola de la rata y el método de la placa caliente.

MÉTODOS

Animales

Se usaron ratas adultas macho Wistar albinas pesando 200~220 g (n= 70) para los experimentos. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de laboratorio y agua ad libitum y fueron mantenidos a 22±2°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12-h. Los animales fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio antes de la prueba. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en ciego entre 10:00 y 15:00 h (n=10 en cada grupo experimental). La aprobación ética para este estudio (No: 215) fue provisto por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Cumhuriyet el 30 de septiembre de 2010.

Preparación y administración de fármacos

Sulfato de morfina (Hospital de la Universidad de Cumhuriyet, Turquía), fentanilo (Fentanilo citrato®, 50 mg/ml, Abbott, EEUU) y dexmedetomidina HCl (Precedex®, 200 µg/2 ml, Meditera, Turquía) fueron disueltos en solución salina. Los fármacos fueron preparados inmediatamente antes de su uso; la morfina y el fentanilo fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) y la dexmedetomidina fue inyectada subcutáneamente (s.c.) en un volumen de 10 ml/kg.

Evaluación de antinocicepción del dolor agudo

1. Prueba del latigazo de cola

La respuesta nociceptiva de la prueba del latigazo de la cola de rata (TF) es usualmente atribuido a mecanismos centrales en el nivel espinal [9,10]. Un dispositivo estandardizado TF (May TF 0703 Unidad de latigazo de cola, Commat, Turquía) fue usado para evaluar la nocicepción térmica. La fuente de calor radiante fue enfocada en la porción distal de la cola a 3 cm después de la administración de los fármacos de estudio o el vehículo. Después de la administración del vehículo o compuesto, las latencias del latigazo de cola (TFL) fueron obtenidas. La intensidad infrarroja fue ajustada de modo que la TFL basal ocurrió a 2.8±0.4. Los animales con una TFL de línea base debajo de 2.4 o arriba de 3.2 s fueron excluidos de pruebas adicionales. La latencia de corte fue establecida a 15 s en evitar el daño de tejido. Cualquier animal que no respondieran después de 15 s fue excluido de estudios. Las mediciones línea base fueron desarrollados dos veces antes de la administración de morfina (3 mg/kg), fentanilo (5 µg/kg), y dexmedetomidina (5 µg/kg), mientras que otras mediciones fueron llevadas veces a 15, 30, 60, 90, 120 min después administración y valores de mediciones fueron registrados para cada tiempo de punto.

2. Prueba de la placa caliente

La respuesta sobre la placa caliente (HP) es generalmente un resultado a partir de una combinación de los mecanismos central y periférico [10]. En esta prueba, los animales fueron colocadas individualmente en una placa caliente (Placa Caliente de Eddy) con la temperatura ajustada a 55±1°C. La latencia a la primera señal de la lamida de pata o respuesta de salto para evitar el calor fue tomado como un índice del umbral de dolor; el tiempo de corte fue de 30 s con el fin de evitar daño a las patas de las ratas. Las pruebas HP fueron desarrolladas inmediatamente después de la prueba del latigazo de cola fue completado.

Protocolos experimentales

Los animales fueron aleatoriamente divididos 7 grupos como control, placebo, dexmedetomidina, morfina, fentanilo, dexmedetomidina+morfina, y dexmedetomidina+fentanilo. A los animales en el grupo control no se les dio medicamento. A los animales en el grupo placebo se les dio 1 ml de solución salina i.p. Los animales del grupo de dexmedetomidina fueron inyectaddos con 5 µg/kg s.c. de dexmedetomidina, la cual fue determinada como una dosis no efectiva por las pruebas preliminares dosis-respuesta en nuestro estudio (Fig. 1). Tres mg/kg i.p. de morfina fue la dosis que usamos para animales en el grupo de la morfina. A los animales en el grupo de fentanilo se les dio una dosis de 5 µg/kg i.p. que indicamos como dosis equivalente a morfina en nuestro

estudio. En el grupo dexmedetomidina+morfina, dexmedetomidina 5 µg/kg s.c. y morfina 3 mg/kg i.p. fueron usadas. Los animales del grupo dexmedetomidina+fentanilo recibieron dexmedetomidina 5 µg/kg s.c. y fentanilo 5 µg/kg i.p. Las pruebas TF y HP fueron llevada a cabo a la línea base (antes de la administración del fármaco) y a 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la administración como modelo de dolor agudo en ratas (n=10 en cada grupo). La prueba de desempeño de barra giratoria fue usada para evaluar los efectos secundarios de los fármacos por coordinación locomotriz de las ratas que recibieron fármacos o solución salina. El aparato (COMMAT Ltd., Ankara, Turquía) consistió en tres compartimientos separados y una barra giratoria con un diámetro de 7 cm. Las ratas fueron entrenadas previamente en el aparato de barra giratoria por 3 días y después fueron evaluados sobre la barra acelerada, en la cual la velocidad del perno se incrementó de 4 a 40 rpm por un periodo 5 min. En el día del experimento, cada rata fue evaluada tres veces a intervalos de 5 min y el promedio de las responses fue registrado como valores de línea base. Entonces las ratas fueron inyectadas—dependiendo del grupo al cual fueron asignadas—con solución salina, dexmedetomidina 5 µg/ kg, morfina 3 mg/kg, fentanilo 5 mg/kg, dexmedetomidina+morfina, o dexmedetomidina+fentanilo y fueron probados a los 15 y 30 min después de las inyecciones. Los resultados se expresaron como el tiempo de resistencia en la barra giratoria (Fig. 2) [11].

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos son expresados como la media±SEM (error estándar de la media). El efecto de antinocicepción fue medido. Los grupos fueron comparados estadísticamente usando los modelos generales lineales de dos vías ANOVA seguidos por la prueba de Tukey y la prueba t cuando fuera apropiado. $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Fig. 1. Latencias de latigazo de cola con diferentes dosis de dexmedatomidina. *p<0.05 cuando se compara con otras dosis. **p<0.05 cuando se compara con otras dosis.

Fig. 2. Tiempo de permanencia en la barra giratoria.

Fig. 4. Latencias de latigazo de cola de los grupos placebo, dexmedetomidina, morfina y dexmedetomidina+morfina. *$p < 0.05$ cuando el grupo morfina es comparado con otros grupos, **$p < 0.05$ cuando el grupo dexmedetomidina+morfina es comparado con el grupo morfina y otros groupos.

Fig. 3. Latencias de latigazo de cola de los grupos control y placebo.

Fig. 5. Latencias de latigazo de cola de los grupos placebo, dexmedetomidina, fentanilo y dexmedetomidina+fentanilo. *$p < 0.05$ cuando el grupo morfina es comparado con otros grupos, **$p < 0.05$ cuando el grupo dexmedetomidina+ fentanilo es comparado con el grupo fentanilo y otros grupos.

Fig. 6. Latencias de placa caliente de los grupos control y placebo.

Fig. 7. Latencias de placa caliente de los grupos placebo, dexmedetomidina, morfina y dexmedetomidina+morfina. *$p<0.05$ cuando el grupo morfina es comparado con otros grupos, **$p<0.05$ cuando el grupo dexmedetomidina+ morfina es comparado con el grupo morfina y otros grupos.

Fig. 8. Latencias de placa caliente de los grupos placebo, dexmedetomidina, fentanilo y dexmedetomidina+fentanilo. *$p<0.05$ cuando el grupo morfina es comparado con otros grupos, **$p<0.05$ cuando el grupo dexmedetomidina+ fentanilo es comparado con el grupo fentanilo y otros grupos.

RESULTADOS

Los resultados de la prueba TF de administración intraperitoneal y subcutánea de solución salina en el grupo placebo no mostraron diferencia significativa, cuando se compararon con los valores del grupo control (Fig. 3), mientras que las latencias TF del grupo de dexmedetomidina comparados con el grupo control grupo no mostraron diferencia estadísticamente significativa en ningún momento. La morfina sola dio un efecto analgésico estadísticamente significativo que comenzó en el minuto 30 (min) después de la administración ($p<0.05$). Las latencias TF a los 60 min alcanzaron el máximo, y después gradualmente disminuyeron y, a los 120 min, disminuyeron al nivel del grupo control. La aplicación de morfina sola causó latencias TF incrementadas que comenzaron a los 30 min, pero el efecto de la combinación sobre la dosis de dexmedetomidina+morfina comenzó a los 15 min. Además, cuando las latencias TF de los grupos de la combinación dexmedetomidina+morfina y de morfina sola fueron comparados, las latencias TF de la combinación fueron significativamente más altas que el efecto de morfina sola a los 15, 30, 60 y 90 min ($p<0.05$) (Fig. 4). El fentanilo solo dio lugar a un efecto significativo analgésico después de 15 min ($p<0.05$). Este efecto alcanzó su máximo al minuto 60, entonces gradualmente disminuyó y, para el minuto 90, había disminuido al nivel del grupo control. La combinación dexmedetomidina y fentanilo fue paralela a fentanilo solo; produjo analgesia significativa a los 15 min. Este efecto a los 60 min alcanzó el máximo y después gradualmente disminuyó hasta que, por los 90 min, había alcanzado el nivel del grupo control. Las latencias TF de la combinación fueron estadísticamente mayores que fentanilo solo a 15, 30 y 60 min ($p<0.05$) (Fig. 5).

Los resultados de la prueba HP de administración intraperitoneal y subcutánea de solución salina en el grupo placebo no mostraron diferencia significativa, cuando se compararon con los valores del grupo control (Fig. 6). Cuando las latencias HP del grupo de dexmedetomidina fueron comparados con el grupo control, no se encontró diferencia significativa en ningún momento. Tanto el fentanilo como la morfina proporcionaron analgesia significativa empezando en el minuto 15; este efecto alcanzó su nivel máximo a los 60 min, y después disminuyó. A los 120 min, aunque las latencias HP disminuyeron, no fueron todavía a los niveles del grupo control ($p<0.05$). Cuando la latencia HP del grupo de dexmedetomidina fue comparado con el grupo control, una diferencia significativa en ningún momento fue observada. La morfina indujo analgesia significativa que comenzó a los 15 min. Este efecto a los 60 min alcanzó su máximo y, después de eso, disminuyó. A los 120 min, aunque las latencias de la placa caliente habían disminuido, no llegaron todavía a los niveles del grupo control. La combinación dexmedetomidina+morfina proporcionó analgesia significativa comenzando en el minuto 15 y esto fue paralelo a la aplicación de fentanilo solo

(p<0.05). Este efecto, a los 60 min, alcanzó su máximo y, después de eso, disminuyó. Las latencias de retiro de la combinación fueron estadísticamente mayores que la morfina sola a los 15, 30, 60, y 90 min (p<0.05) (Fig. 7). La combinación dexmedetomidina+fentanilo, desde los 15 min, proporcionó analgesia significativa y fue paralela a la aplicación de fentanilo solo. Este efecto alcanzó su nivel máximo a los 60 min y disminuyó gradualmente a partir de ese punto. Las latencias de retiro de la combinación fueron mayores que el efecto de fentanilo solo estadísticamente significativas a los 15, 30, 60, y 90 min (p<0.05) (Fig. 8).

DISCUSION

Demostramos en nuestro estudio que la dexmedetomidina en dosis efectivas tuvo un efecto de potentiación sobre los opioides. Ha sido bien conocido que los agonistas del receptor α2-adrenérgico tienen un efecto sinérgico en opioides. Sin embargo, nuestro estudio es un estudio novedoso con una dosis no efectiva de dexmedetomidina y difiere de otros estudios en que muestra la capacidad de dosis efectivas de agonistas del receptor α2-adrenérgico para incrementar la potencia de los opioides.

A pesar de los fuertes efectos de los analgésicos opioides, su uso está limitado debido a efectos secundarios significativos tales como depresión respiratoria y tolerancia. Puesto que los opioides tienen tales desventajas e investigaciones posteriores han mostrado que una variedad de receptores distintos de los mecanismos de opioides son capaces de inducir analgesia en la médula espinal, que está localizada en el sistema nervioso central, los autores han sido forzados a investigar fármacos alternativos tales como los agonistas del receptor α2. Un estudio electrofisiológico mostró que los receptores de opioide y los α2-adrenoceptores pueden interactuar en la modulación de transmisión nociceptiva en la columna espinal de la rata [12]. Es bien sabido que la estimulación del receptor α2 de la columna espinal juega un gran papel en el nivel de analgesia [8,13]. Paalzow [14] detectó por primera vez que la implementación sistemática de clonidina causó un efecto analgésico; desde entonces, este tema ha llevado a diversas investigaciones [15,16]. En estos estudios, un agonista del receptor α2 de la clase del imidazol clonidina fue usado principalmente debido a que es más fácil de proporcionar [17,18]. La selectividad de la dexmedetomidina a receptores α2 (especialmente del subtipo α2A) lleva a una más efectiva sedación y analgesia [19].

Es un hecho conocido que los agonistas del adrenoreceptor α2 utilizan receptores de opioide. Ossipov et al. [20] investigaron los efectos anti-nociceptivos de la morfina y dosis subanalgésicas de clonidina en roedores al aplicar el medicamento intratecalmente. Encontraron una potenciación significativa en la prueba TF. Finalmente, observaron que los efectos del opioide regresaron después de que se inyectó naloxona. Su estudio probó que los agonistas del α2-adrenoreceptor utilizan receptores opioides. En nuestro estudio se expuso a través de una prueba TF, que a los niveles espinales también potencializa los efectos antinociceptivos. Sin embargo, no debe olvidarse que los α2 agonistas estudiados estaban en dosis no efectivas por sí solas. Meert y De Kock [21] estudiaron las propiedades analgésicas en ratas, específicamente la potenciación del efecto de los agonistas de α2-adrenoreceptor en opioides como fentanilo. Encontraron que los agoinstas α2 que fueron probados pueden potenciar el efecto analgésico de opioides, pero no tuvieron efecto real antinociceptivo en los reflejos espinales. Slingsby et al. [22] estudiaron los efectos antinociceptivos de dexmedetomidina con buprenorfina combinadas y en forma aislada,

en gatos. Después de todas las aplicaciones farmacéuticas, los gatos fueron probados con una prueba de umbral nociceptivo térmico. A la dosis de 20 μg/kg en dexmedetomidina, un pequeño efecto analgésico fue observado. Krzysztof et al. [23] crearon dolor en ratas con formalina intraplantar y administraron morfina y morfina+clonidina a las ratas, y después los probaron por TF. En este estudio, los resultados esperados fueron que la combinación será significativamente más efectiva que la morfina; Slingsby et al. Vieron que la combinación morfina+clonidina era máse efectiva que la morfina a dosis bajas pero no a dosis altas. En nuestro estudio, la dosis de dexmedetomidina usada no era una dosis efectiva; sin embargo, cuando se hubo combinado con opioides, el efecto analgésico fue potenciado significativamente. Existen diversos estudios que usaron dosis efectivas de agonistas α2 como una combinación con opioides, y presentaron resultados similares. Puke y Wiesenfeld-Hallin [24] crearon dolor experimental neuropático en ratas y después administraron intratecalmente morfina, morfina+clonidina, y mor phine+clonidine+ dexmedetomidina a las ratas. Por 21 días después de la administración del fármaco, buscaron auto-amputación de dedos y uñas. Encontraron que la morfina sola fue más efectiva al tratar el dolor neuropático, y que la combinación de morfina con agonistas α2 fue más útil y efectiva en tratar el dolor crónico. Guneli et al. [25] examinaron los efectos antinociceptivos de tramadol y dexmedetomidina, que fueron inyectados intraperitonealmente a ratas en las cuales el había sido generado dolor agudo y neuropático. Encontraron que la combinación de dosis inyectadas intraperitonealmente fueron más efectivas que dosis solas y que las latencias HP y TF fueron significativamente más altas. En este estudio encontraron que el efecto antinociceptivo sinérgico de tramadol y dexmedetomidina en baja dosis fue muy fuerte y que no hubo un efecto de sedación. Sin embargo, el efecto analgésico de la combinación significativamente incrementada. Gunes et al. [26] compararon la analgesia de pacientes controlados preparados con morfina+ dexmedetomidina y prepararon con morfina sola en pacientes que sufrieron una laminectomía. Ellos ajustaron la bomba de morfina a la mitad en 64 pacientes y una bomba que contenía morfina+dexmedetomidina a la otra mitad. El consumo de morfina se redujo 30% en los pacientes del grupo de la combinación. Ellos indicaron que la dexmedetomidina mostró un efecto sinérgico con morfina. En la práctica clínica, el efecto analgésico de dexmedetomidina ha sido investigado en estudios respecto al efecto de reducir el uso de opioides [8]. En voluntarios sanos, un estudio controlado por placebo, doble ciego fue llevado a cabo, en el cual el dolor de pecho isquémico fue evaluado; se observó que dosis i.v. de 0.25, 0.5 y 1 μg/kg de dexmedetomidina mostraron un efecto similar con 2 μg/kg de fentanilo [27]. De manera similar, una sola dosis preoperatoria de dexmedetomidina redujo los requerimientos analgésicos intra-operativos y postoperativos de los opioides [27]. En un estudio en pacientes con ventilación mecánica después de cirugía que compararon dexmedetomidina con placebo, se encontró que la dexmedetomidina disminuyó el requerimiento de morfina más que el placebo [28]. En estos estudios clínicos se encontró que la administración de dexmedetomidina perioperativa ayudó a reducir los requerimientos analgésicos intra-operativos y postoperativos de opioide y no-opioide. A pesar de ello, el efecto sedante de dexmedetomidina restringe su uso como un analgésico sistémico [29].

Finalmente, concluimos que las dosis no efectivas de dexmedetomidina, la cual es un agonista α2, potencian los efectos antinociceptivos de la morfina y del fentanilo cuando la dexmedetomidina está combinada con estos opioides.

REFERENCIAS

1. Hernández L, Romero A, Almela P, García-Nogales P, Laorden ML, Puig MM. Tolerancia to the antinociceptive efectos of peripherally administered opioides. Expression of beta-ar-restins. Brain Res. 2009;1248:31-39.

2. Ballesteros-Yanez I, Ambrosio E, Pérez J, Torres I, Miguéns M, García-Lecumberri C, DeFelipe J. Morfina self-admini-stration efectos on the structure of cortical pyramidal cells in addiction-resistant ratas. Brain Res. 2008;1230:61-72.

3. Lee B, Sur B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Efecto of berberine on depresión- and anxiety-like behaviors and activation of the noradrenergic system induced by development of morfina dependencia in ratas. Korean J Physiol Pharmacol. 2012;16:379-386.

4. Pergolizzi J, Böger RH, Budd K, Dahan A, Erdine S, Hans G, Kress HG, Langford R, Likar R, Raffa RB, Sacerdote P. Opioides and the management of chronic severe dolor in the elderly:

consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioides (buprenorphine, fentanilo, hydromorphone, methadone, morfina, oxycodone). Dolor Pract. 2008;8:287-313.

5. Lanza FL. A guideline for the tratamiento and prevention of NSAID-induced ulcers. Members of the Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroen-terology. Am J Gastroenterol. 1998;93:2037-2046.

6. Nader ND, Li CM, Dosluoglu HH, Ignatowski TA, Spengler RN. Adyuvante therapy with intrathecal clonidine improves post-operative dolor in patients undergoing coronary artery bypass graft. Clin J Dolor. 2009;25:101-106.

7. Carollo DS, Nossaman BD, Ramadhyani U. Dexmedetomidina: a review of clinical applications. Curr Opin Anaesthesiol. 2008; 21:457-461.

8. Mantz J. Dexmedetomidina. Fármacos Today (Barc). 1999;35:151- 157.

9. Ramabadran K, Bansinath M, Turndorf H, Puig MM. The hyperalgesic efecto of naloxone is attenuated in streptozo-tocin-diabetic ratones. Psychopharmacology (Berl). 1989;97:169- 174.

10. Kanaan SA, Saadé NE, Haddad JJ, Abdelnoor AM, Atweh SF, Jabbur SJ, Safieh-Garabedian B. Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in ratas and ratones: a new model for inflammatory dolor. Dolor. 1996;66:373-379.

11. Hamurtekin E, Gurun MS. The antinociceptive efectos of centrally administered CDP-choline on modelo de dolor agudos in ratas: the involvement of cholinergic system. Brain Res. 2006; 1117:92-100.

12. Sullivan AF, Dashwood MR, Dickenson AH. Alpha 2-adreno-ceptor modulation of nociception in rat spinal cord: location, efectos and interactions with morfina. Eur J Pharmacol. 1987;138:169-177.

13. Coursin DB, Coursin DB, Maccioli GA. Dexmedetomidina. Curr Opin Crit Care. 2001;7:221-226.

14. Paalzow L. Analgesia produced by clonidine in ratones and ratas. J Pharm Pharmacol. 1974;26:361-363.

15. Dennis SG, Melzack R, Gutman S, Boucher F. Dolor modulation by adrenergic agents and morfina as measured by three dolor tests. Life Sci. 1980;26:1247-1259.

16. Chan SH, Lai YY. Efectos of aging on dolor responses and analgesic efficacy of morfina and clonidine in ratas. Exp Neurol. 1982;75:112-119.

17. Pertovaara A, Hämäläinen MM, Kauppila T, Mecke E, Carlson S. Dissociation of the alpha 2-adrenergic antinociception from sedation following microinjection of medetomidine into the locus coeruleus in ratas. Dolor. 1994;57:207-215.

18. Pertovaara A. Antinociception induced by alpha-2-adrenoceptor agonists, with special emphasis on medetomidine studies. Prog Neurobiol. 1993;40:691-709.

19. Sabbe MB, Penning JP, Ozaki GT, Yaksh TL. Spinal and systemic action of the alpha 2 receptor agonist dexmede-tomidine in dogs. Antinociception and carbon dioxide response. Anesthesiology. 1994;80:1057-1072.

20. Ossipov MH, Suarez LJ, Spaulding TC. Antinociceptive interactions between alpha 2-adrenergic and opiate agonists at the spinal level in rodents. Anesth Analg. 1989;68:194-200.

21. Meert TF, De Kock M. Potentiation of the analgesic propiedades of fentanilo-like opioides with alpha 2-adrenoceptor agonists in ratas. Anesthesiology. 1994;81:677-688.

22. Slingsby LS, Murrell JC, Taylor PM. Combination of dexme-detomidine with buprenorphine enhances the antinociceptive efecto to a thermal stimulus in the cat compared with either agent alone. Vet Anaesth Analg. 2010;37:162-170.

23. Przesmycki K, Dzieciuch JA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z. Isobolographic analysis of interaction between intrathecal mor-phine and clonidine in the formalin test in ratas. Eur J Phar-macol. 1997;337:11-17.

24. Puke MJ, Wiesenfeld-Hallin Z. The differential efectos of morfina and the alpha 2-adrenoceptor agonists clonidine and dexmedetomidina on the prevention and tratamiento of expe rimental neuropathic dolor. Anesth Analg. 1993;77:104-109.

25. Guneli E, Karabay Yavasoglu NU, Apaydin S, Uyar M, Uyar M. Analysis of the antinociceptive efecto of systemic admini-stration of tramadol and dexmedetomidina combination on rat models of acute and neuropathic dolor. Pharmacol Biochem Behav. 2007;88:9-17.

26. Gunes Y, Ozbek TH, Gunduz HM, Gedik YE, Erman T, Ozcengiz D. Patient-controlled analgesia: comparison of mor-phine to dexmedetomidina plus morfina in patients under-

going laminectomy. Neurosurg Q. 2008;18:178-181.

27. Mantz J. Alpha2-adrenoceptor agonists: analgesia, sedation, anxiolysis, haemodynamics, respiratory function and weaning. Clinical Anaesthesiology. 2000;14:433-448.

28. Bhana N, Goa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidina. Fármacos. 2000;59:263-268.

29. Aantaa R, Kallio A, Virtanen R. Dexmedetomidina, a novel alpha-2-adrenergic agonist. A review of its pharmacodynamic characteristics. *Drugs Future*. 1993;18:49-56.

Korean J Physiol Pharmacol
Vol 17: 417−422, October, 2013
http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2013.17.5.417

Ineffective Doses of Dexmedetomidine Potentiates the Antinociception Induced by Morphine and Fentanyl in Acute Pain Model

Mumin Unal[1], Sinan Gursoy[1], Ahmet Altun[2], Cevdet Duger[1], Iclal Ozdemir Kol[1], Kenan Kaygusuz[1], Ihsan Bagcivan[2], and Caner Mimaroglu[1]

Departments of [1]Anesthesiology, [2]Pharmacology, Cumhuriyet University School of Medicine, Sivas 58140, Turkey

The aim of this study was to evaluate the synergistic potentiation effect of ineffective doses of dexmedetomidine on antinociception induced by morphine and fentanyl in acute pain model in rats. Seventy albino Wistar rats were separated into 7 groups. Data for the control and sham groups were recorded. The ineffective dose of dexmedetomidine was investigated and found to be 3 μg/kg. Each group was administered the following medications: 3 mg/kg morphine (intraperitoneal) to Group 3, 5 μg/kg fentanyl (intraperitoneal) to Group 4, dexmedetomidine 3 μg/kg (subcutaneously) to Group 5, dexmedetomidine 3 μg/kg (subcutaneous)+3 mg/kg morphine (intraperitoneal) to Group 6 and finally 3 μg/kg dexmedetomidine (subcutaneous)+5 μg/kg fentanyl (intraperitoneal) to Group 7. Just before the application and 15, 30, 60, 90 and 120 min after the administration of medication, two measurements of tail flick (TF) and hot plate (HP) tests were performed. The averages of the measurements were recorded. TF and HP latencies were the main outcomes. The analgesic effect of the combinations with dexmedetomidine+morphine (Group 6) and dexmedetomidine+fentanyl (Group 7), compared to the analgesic effect of morphine alone and fentanyl alone was significantly higher at 15, 30, 60 and 90 minutes after administration. In this study, dexmedetomidine in ineffective doses, when combined with morphine and fentanyl, potentiates the effects of both morphine and fentanyl.

Key Words: Acute pain, Dexmedetomidine, Fentanyl, Morphine, Potentiation

INTRODUCTION

Nowadays, the drugs used in treatment of pain can be divided into two pharmacological groups: non-opioids (adjuvants) and opioids [1-3]. Because the most common opioids used as analgesics have side effects like dependence and tolerance, as well as respiratory depression and constipation, while non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) have serious gastrointestinal side effects and also cause kidney damage [1,4,5], researchers are actively working to develop new adjuvant drugs. Therapeutic benefits of auxiliary drugs can be summarized as follows: they contribute to the formation of a strong analgesic as well as give the opportunity to reduce the dosage of major drugs; in particular, they reduce the frequency of opioid side effects such as nausea, vomiting, constipation, pruritus, sedation, and respiratory depression [6]. According to this, an alternative approach to mono-therapy that may be useful in the treatment of pain is to combine opioids with adjuvant analgesics or with other drugs that, on their own, do not have analgesic effectiveness but nevertheless amplify the effects of the opioid, thus requiring a smaller dose of the opioid and reducing its side effects [6].

Dexmedetomidine is a strong and highly selective α2-adrenoceptor agonist which has a wide spectrum of pharmacological properties. α2-adrenergic agonists provide sedation, anxiolysis, and hypnosis as well as analgesia and sympatholytic properties. In recent years, dexmedetomidine has attained an important place in researches, as well as in the treatment of pain, because it has analgesic effects comparable to opioids but does not show the side effects of opioids, like dependence and tolerance. This drug's effect mechanism, which is reported as acting through opioidergic, noradrenergic, and serotonergic receptors, is not completely clarified [7,8]. It has been widely accepted that co-administration of α2-adrenergic receptor agonists and μ receptor agonists produces synergistic antinociceptive effects in clinically effective doses. However, our study is a novel study that differs from other studies in that it uses ineffective doses of dexmedetomidine to achieve a potentiation effect.

In this study we aimed to evaluate the synergistic po-

Received June 3, 2013, Revised August 2, 2013,
Accepted August 13, 2013

Corresponding to: Cevdet Duger, Department of Anesthesiology, Cumhuriyet University School of Medicine, Sivas 58140, Turkey. (Tel) 00903462580125, (Fax) 00903462581305, (E-mail) cevdetduger@gmail.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABBREVIATIONS: NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs; i.p, intraperitoneally; s.c, subcutaneously; TF, tail flick; TFL, tail flick latencies; HP, hot plate.

tentiation of dexmedetomidine in ineffective doses on antinociception induced by morphine and fentanyl in an acute pain model which we made through a rat tail-flick and hot plate method.

METHODS

Animals

Adult male Wistar albino rats weighing 200~220 g (n=70) were used for the experiments. The animals were fed a standard laboratory diet and water ad libitum and were kept at 22±2°C with a 12-h light/dark cycle. Animals were acclimatized to laboratory conditions before the test. All experiments were carried out blindly between 10:00 and 15:00 h (n=10 in each experimental group). Ethical approval for this study (No: 215) was provided by the Animal Ethical Committee of Cumhuriyet University on 30 September 2010.

Drug preparation and administration

Morphine sulfate (Cumhuriyet University Hospital, Turkey), fentanyl (Fentanyl citrate®, 50 mg/ml, Abbott, USA) and dexmedetomidine HCl (Precedex®, 200 μg/2 ml, Meditera, Turkey) were dissolved in saline. Drugs were prepared immediately prior to use; morphine and fentanyl were injected intraperitoneally (i.p.) and dexmedetomidine was injected subcutaneously (s.c.) in a volume of 10 ml/kg.

Assessment of antinociception to acute pain

1. Tail-flick test

The nociceptive response to the tail-flick (TF) test is usually attributed to central mechanisms at the spinal level [9,10]. A standardized TF device (May TF 0703 Tail-flick Unit, Commat, Turkey) was used to evaluate thermal nociception. The radiant heat source was focused on the distal portion of the tail at 3 cm after administration of the vehicle or study drugs. Following vehicle or compound administration, tail-flick latencies (TFL) were obtained. The infrared intensity was adjusted so that basal TFL occurred at 2.8±0.4. Animals with a baseline TFL below 2.4 or above 3.2 s were excluded from further testing. The cutoff latency was set at 15 s to avoid tissue damage. Any animal not responding after 15 s was excluded from the study. Baseline measurements were performed twice before the administration of morphine (3 mg/kg), fentanyl (5 μg/kg), and dexmedetomidine (5 μg/kg), while and other measurements were performed twice at 15, 30, 60, 90, 120 min after administration and mean measurement values were recorded for each time point.

2. Hot-plate test

The response on the hot-plate (HP) is generally a result from a combination of central and peripheral mechanisms [10]. In this test, animals were individually placed on a hot plate (Eddy's Hot-Plate) with the temperature adjusted to 55±1°C. The latency to the first sign of paw licking or jump response to avoid the heat was taken as an index of the pain threshold; the cut-off time was 30 s in order to avoid damage to the rats' paws. HP tests were performed immediately after the tail flick test was completed.

Experimental protocols

Animals were randomly divided 7 groups as control, sham, dexmedetomidine, morphine, fentanyl, dexmedetomidine+morphine, and dexmedetomidine+fentanyl. Animals in the control group were given no medication. Animals in the sham group were given 1 ml i.p. of saline. Dexmedetomidine group animals were injected 5 μg/kg s.c. dexmedetomidine, which was determined to be an ineffective stand-alone dose by the preliminary dose-response tests in our study (Fig. 1). Three mg/kg i.p. morphine was the dose we used for animals in the morphine group. Animals in the fentanyl group were given a 5 μg/kg i.p. dose that we indicated as an equivalent dose to morphine in our study. In the dexmedetomidine+morphine group, dexmedetomidine 5 μg/kg s.c. and morphine 3 mg/kg i.p. were used. Dexmedetomidine+fentanyl group animals were given dexmedetomidine 5 μg/kg s.c. and fentanyl 5 μg/kg i.p. TF and HP tests were performed at baseline (before drug administration) and at 15, 30, 60, 90 and 120 min after administration as a model of acute pain in rats (n=10 in each group). The rota rod performance test was used to evaluate the side effects of drugs by locomotor coordination of rats that received drugs or saline. The apparatus (COMMAT Ltd., Ankara, Turkey) consisted of three separate compartments and a rotating rod with a diameter of 7 cm. The rats were pre-trained on the rota rod apparatus for 3 days and then tested on the accelerating rod, in which the speed of the spindle was increased from 4 to 40 rpm over a period of 5 min. On the experiment day, each rat was tested for three times at 5 min intervals and the average of the responses was recorded as baseline values. Then the rats were injected with−depending on the group to which they were assigned−saline, dexmedetomidine 5 μg/kg, morphine 3 mg/kg, fentanyl 5 mg/kg, dexmedetomidine+morphine, or dexmedetomidine+fentanyl and tested at 15 and 30 min after injections. Results are expressed as the endurance time on the rota rod (Fig. 2) [11].

Statistical analysis

The results obtained are expressed as mean±SEM (standard error of mean). The effect of antinociception was measured. Groups were compared statistically using general linear models of two way ANOVA followed by Tukey test and *t* test when appropriate. $p<0.05$ was considered

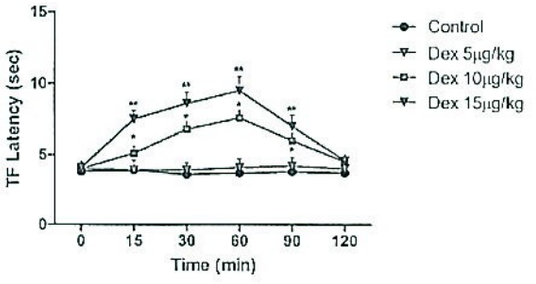


Fig. 1. Tail flick latencies of different dexmedetomidine doses. *p<0.05 when compared to other doses, **p<0.05 when compared to other doses.

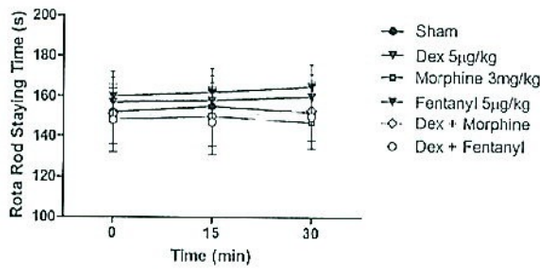


Fig. 2. Rota rod staying time.

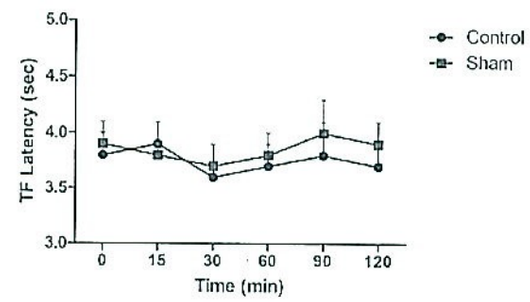


Fig. 3. Tail flick latencies of control and sham groups.

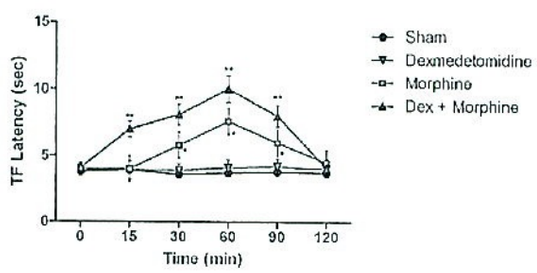


Fig. 4. Tail flick latencies of sham, dexmedetomidine, morphine and dexmedetomidine+morphine groups. *$p<0.05$ when morphine group compared to other groups, **$p<0.05$ when dexmedetomidine+morphine group compared to morphine group and other groups.

significant.

RESULTS

TF test results of intraperitoneal and subcutaneous administration of saline in the sham group showed no significant difference, when compared with control group values (Fig. 3), while the TF latencies of the dexmedetomidine group compared with the control group showed no significant difference statistically at any time. Morphine alone yielded a statistically significant analgesic effect starting from the 30 minute (min) after administration ($p<0.05$). TF latencies at the 60 min reached the maximum, and then

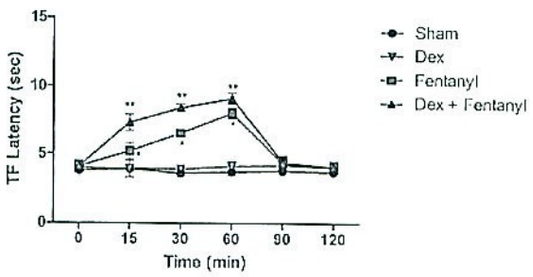


Fig. 5. Tail flick latencies of sham, dexmedetomidine, fentanyl and dexmedetomidine+fentanyl groups. *$p<0.05$ when morphine group compared to other groups, **$p<0.05$ when dexmedetomidine+fentanyl group compared to fentanyl group and other groups.

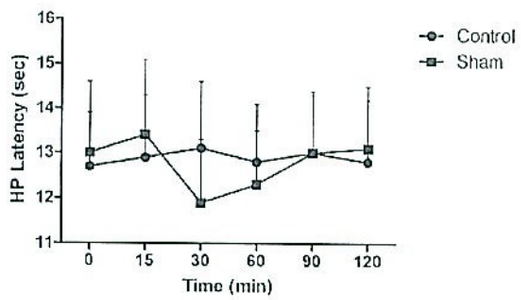


Fig. 6. Hot plate latencies of control and sham groups.

gradually decreased and, at the 120 min, had decreased to the level of the control group. Application of morphine alone caused increased TF latencies that started at the 30 min, but the combination effect of the dexmedetomidine+morphine dosage started at the 15 min. Furthermore, when the TF latencies of the dexmedetomidine+morphine combination and the morphine-only groups were compared, the TF latencies of the combination were found to be significantly higher than the effect of morphine only at the 15, 30, 60 and 90 min ($p<0.05$) (Fig. 4). Fentanyl alone gave rise to a significant analgesic effect after the 15 min ($p<0.05$). This effect reached its maximum at the 60th min, then gradually decreased and, by the 90 min, had decreased to the level of the control group. The dexmedetomidine and fentanyl combination was parallel to fentanyl alone; it produced significant analgesia at the 15 min. This effect at the 60 min reached the maximum, and then gradually decreased until, by the 90 min, it had reached the level of the control group. TF latencies of the combination were statistically greater than fentanyl alone at 15, 30 and 60 min ($p<0.05$) (Fig. 5).

HP test results of intraperitoneal and subcutaneous administration of saline in the sham group showed no significant difference, when compared with control group values (Fig. 6). When HP latencies of the dexmedetomidine group were compared with the control group, no significant difference was found at any time. Both fentanyl and morphine provided significant analgesia starting from the 15 min; this effect reached its maximum level at the 60 min, and then it decreased. At the 120 min, although HP laten-

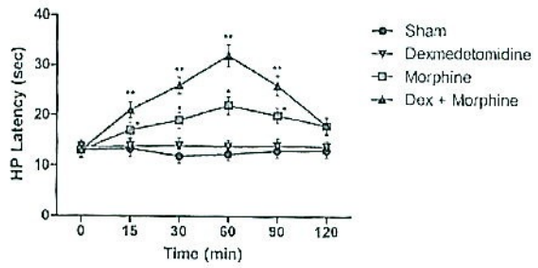


Fig. 7. Hot plate latencies of sham, dexmedetomidine, morphine and dexmedetomidine+morphine groups. *$p < 0.05$ when morphine group compared to other groups, **$p < 0.05$ when dexmedetomidine+morphine group compared to morphine group and other groups.

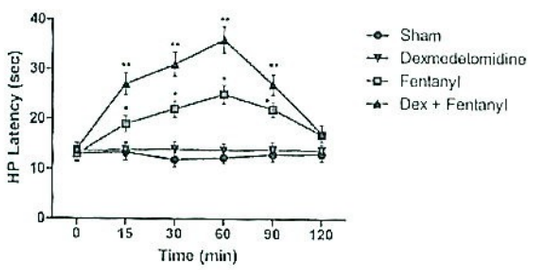


Fig. 8. Hot plate latencies of sham, dexmedetomidine, fentanyl and dexmedetomidine+fentanyl groups. *$p < 0.05$ when morphine group compared to other groups, **$p < 0.05$ when dexmedetomidine+fentanyl group compared to fentanyl group and other groups.

cies decreased, they were not yet at control group levels ($p < 0.05$). When the HP latency of the dexmedetomidine group was compared with the control group, a significant difference was not found at any time. Morphine induced significant analgesia that began at the 15 min. This effect at the 60 min reached its maximum and, after that, decreased. At the 120 min, although hot plate latencies had decreased, they were not yet at the levels of the control group. Dexmedetomidine+morphine combination provided significant analgesia starting at the 15 min and it was parallel to the application of fentanyl alone ($p < 0.05$). This effect, at the 60 min, reached its maximum and, after that, decreased. Withdrawal latencies of the combination were statistically greater than morphine alone at the 15, 30, 60, and 90 min ($p < 0.05$) (Fig. 7). Dexmedetomidine+fentanyl combination, from the 15 min, provided significant analgesia and it was parallel to the application of fentanyl alone. This effect reached its maximum level at the 60 min and it decreased gradually from that point. The withdrawal latencies of the combination were greater than the effect of fentanyl alone statistically significant at the 15, 30, 60, and 90 min ($p < 0.05$) (Fig. 8).

DISCUSSION

We showed in our study that dexmedetomidine in ineffective doses had a potentiation effect on opioids. It has been well known that α2-adrenergic receptor agonists have a synergistic effect on opioids. However, our study is a novel study with an ineffective dose of dexmedetomidine and differs from other studies in that it shows the ability of ineffective doses of α2-adrenergic receptor agonists to increase the potentiality of opioids.

Despite the strong analgesic effects of opioid analgesics, their use is limited due to significant side effects such as respiratory depression and tolerance. Since opioids have such disadvantages and after research has shown that a variety of receptors other than opioid mechanisms are able to induce analgesia in the medulla spinalis, which is located in the central nervous system, the authors have been forced to research alternative drugs such as α2 receptor agonists. An electrophysiological study showed that α2-adrenoceptors and opiate receptors can interact in the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord [12]. It is well known that α2 receptor stimulation of the spinal cord plays a big role in the level of analgesia [8,13]. Paalzow [14] detected for the first time that systematic implementation of clonidine caused an analgesic effect; since then, this subject has led to several researches [15,16]. In these studies, an α2 receptor agonist from imidazole-class clonidine was used mostly due to its being easier to supply [17,18]. The selectivity of dexmedetomidine to α2 receptors (especially the α2A subtype) leads to more effective sedation and analgesia [19].

It is a known fact that α2-adrenoreceptor agonists utilize opioid receptors. Ossipov et al. [20] investigated the antinociceptive effects of morphine and subanalgesic doses of clonidine on rodents by applying the medication intrathecally. They found a significant potentiation in the TF test. Finally, they observed that the opioid effects returned after naloxone was injected. Their study proved that α2-adrenoreceptor agonists utilize opioid receptors.

In our study it was exposed through a TF test, which at spinal levels also potentiated the antinociceptive effects. However, it should not be forgotten that the tested α2 agonists were an ineffective stand-alone dose. Meert and De Kock [21] studied rat analgesic properties, specifically the potentiation effect of α2-adrenoreceptor agonists on opioids like fentanyl. They found that the α2 agonists that were tested may potentiate the analgesic effect of opioids, but had no real anti-nociceptive effect on spinal reflexes.

Slingsby et al. [22] studied the antinociceptive effects of dexmedetomidine with buprenorphine together and alone on cats. After all pharmaceutical applications, the cats tested with a thermal nociceptive threshold test. At the dose of 20 μg/kg im dexmedetomidine, a small analgesic effect was seen. Krzysztof et al. [23] created pain in rats with intraplantar formalin, administered morphine and morphine+clonidine to the rats, and then tested them by TF. In this study, the expected result was that the combination will be significantly more effective than morphine; Slingsby et al. saw the morphine+clonidine combination was more effective than morphine at low doses but not at high doses. In our study, the dexmedetomidine dose used was not an effective dose; however, when it had been combined with opioids, the analgesic effect was significantly potentiated.

There are several studies which used effective dose α2 agonists as a combination with opioids, and presented similar results. Puke and Wiesenfeld-Hallin [24] created experimental neuropathic pain in rats and then intrathecally administered morphine, morphine+clonidine, and mor-

phine+clonidine+ dexmedetomidine to the rats. For 21 days after drug administration, they looked for auto-amputation of toes and nails. They found that morphine alone was most effective in treating neuropathic pain, and that combination of morphine with $\alpha 2$ agonists was more useful and effective in treating chronic pain. Guneli et al. [25] examined the antinociceptive effects of tramadol and dexmedetomidine that were injected intraperitoneally to rats in whom acute and neuropathic pain had been generated. They found that the combination doses injected intraperitoneally were more effective than stand-alone doses and that HP and TF latencies were significantly higher. In this study they found that the antinociceptive synergistic effect of tramadol and low-dose dexmedetomidine was very strong and there was no sedation effect. However, the analgesic effect of the combination significantly increased. Gunes et al. [26] compared patient- controlled analgesia prepared with morphine+ dexmedetomidine and prepared with morphine alone in patients who underwent a laminectomy. They fitted a morphine pump to the half of the 64 patients and a pump containing morphine+dexmedetomidine to the other half. Morphine consumption was reduced 30% in the combination group patients. They indicated that dexmedetomidine showed a synergistic effect with morphine.

In clinical practice, the analgesic effect of dexmedetomidine has been investigated in studies regarding the effect of reducing the use of opioids [8]. In healthy volunteers, a double-blind, placebo-controlled study was conducted in which ischemic chest pain was evaluated; it was seen that 0.25, 0.5 and 1 μg/kg IV dose of dexmedetomidine showed a similar effect with 2 μg/kg fentanyl [27]. Likewise, a single preoperative dose of dexmedetomidine reduced intraoperative and postoperative opioid analgesic requirements [27]. In a study on patients with mechanical ventilation after surgery that compared dexmedetomidine with placebo, it was found that dexmedetomidine decreased the requirement for morphine more than did the placebo [28]. In these clinical studies it was found that administration of perioperative dexmedetomidine helped to reduce both intraoperative and postoperative opioid and non-opioid analgesic requirements. Despite that, the sedative effect of dexmedetomidine restricts its use as a systemic analgesic [29].

Finally, we conclude that ineffective doses of dexmedetomidine, which is an $\alpha 2$ agonist, potentiate the antinociceptive effects of morphine and fentanyl when dexmedetomidine is combined with these opioids.

REFERENCES

1. Hernández L, Romero A, Almela P, García-Nogales P, Laorden ML, Puig MM. Tolerance to the antinociceptive effects of peripherally administered opioids. Expression of beta-arrestins. *Brain Res.* 2009;1248:31-39.
2. Ballesteros-Yanez I, Ambrosio E, Pérez J, Torres I, Miguéns M, García-Lecumberri C, DeFelipe J. Morphine self-administration effects on the structure of cortical pyramidal cells in addiction-resistant rats. *Brain Res.* 2008;1230:61-72.
3. Lee B, Sur B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Effect of berberine on depression- and anxiety-like behaviors and activation of the noradrenergic system induced by development of morphine dependence in rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012;16:379-386.
4. Pergolizzi J, Böger RH, Budd K, Dahan A, Erdine S, Hans G, Kress HG, Langford R, Likar R, Raffa RB, Sacerdote P. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). *Pain Pract.* 2008;8:287-313.
5. Lanza FL. A guideline for the treatment and prevention of NSAID-induced ulcers. Members of the Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:2037-2046.
6. Nader ND, Li CM, Dogluoglu HH, Ignatowski TA, Spengler RN. Adjuvant therapy with intrathecal clonidine improves postoperative pain in patients undergoing coronary artery bypass graft. *Clin J Pain.* 2009;25:101-106.
7. Carollo DS, Nossaman BD, Ramadhyani U. Dexmedetomidine: a review of clinical applications. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008; 21:457-461.
8. Mantz J. Dexmedetomidine. *Drugs Today (Barc).* 1999;35:151-157.
9. Ramabadran K, Bansinath M, Turndorf H, Puig MM. The hyperalgesic effect of naloxone is attenuated in streptozotocin-diabetic mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1989;97:169-174.
10. Kanaan SA, Saadé NE, Haddad JJ, Abdelnoor AM, Atweh SF, Jabbur SJ, Safieh-Garabedian B. Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain. *Pain.* 1996;66:373-379.
11. Hamurtekin E, Gurun MS. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res.* 2006; 1117:92-100.
12. Sullivan AF, Dashwood MR, Dickenson AH. Alpha 2-adrenoceptor modulation of nociception in rat spinal cord: location, effects and interactions with morphine. *Eur J Pharmacol.* 1987;138:169-177.
13. Coursin DB, Coursin DB, Maccioli GA. Dexmedetomidine. *Curr Opin Crit Care.* 2001;7:221-226.
14. Paalzow L. Analgesia produced by clonidine in mice and rats. *J Pharm Pharmacol.* 1974;26:361-363.
15. Dennis SG, Melzack R, Gutman S, Boucher F. Pain modulation by adrenergic agents and morphine as measured by three pain tests. *Life Sci.* 1980;26:1247-1259.
16. Chan SH, Lai YY. Effects of aging on pain responses and analgesic efficacy of morphine and clonidine in rats. *Exp Neurol.* 1982;75:112-119.
17. Pertovaara A, Hämäläinen MM, Kauppila T, Mecke E, Carlson S. Dissociation of the alpha 2-adrenergic antinociception from sedation following microinjection of medetomidine into the locus coeruleus in rats. *Pain.* 1994;57:207-215.
18. Pertovaara A. Antinociception induced by alpha-2-adrenoceptor agonists, with special emphasis on medetomidine studies. *Prog Neurobiol.* 1993;40:691-709.
19. Sabbe MB, Penning JP, Ozaki GT, Yaksh TL. Spinal and systemic action of the alpha 2 receptor agonist dexmedetomidine in dogs. Antinociception and carbon dioxide response. *Anesthesiology.* 1994;80:1057-1072.
20. Ossipov MH, Suarez LJ, Spaulding TC. Antinociceptive interactions between alpha 2-adrenergic and opiate agonists at the spinal level in rodents. *Anesth Analg.* 1989;68:194-200.
21. Meert TF, De Kock M. Potentiation of the analgesic properties of fentanyl-like opioids with alpha 2-adrenoceptor agonists in rats. *Anesthesiology.* 1994;81:677-688.
22. Slingsby LS, Murrell JC, Taylor PM. Combination of dexmedetomidine with buprenorphine enhances the antinociceptive effect to a thermal stimulus in the cat compared with either agent alone. *Vet Anaesth Analg.* 2010;37:162-170.
23. Przesmycki K, Dzieciuch JA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z. Isobolographic analysis of interaction between intrathecal morphine and clonidine in the formalin test in rats. *Eur J Pharmacol.* 1997;337:11-17.
24. Puke MJ, Wiesenfeld-Hallin Z. The differential effects of morphine and the alpha 2-adrenoceptor agonists clonidine and dexmedetomidine on the prevention and treatment of expe-

rimental neuropathic pain. *Anesth Analg.* 1993;77:104-109.
25. **Guneli E, Karabay Yavasoglu NU, Apaydin S, Uyar M, Uyar M.** Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;88:9-17.
26. **Gunes Y, Ozbek TH, Gunduz HM, Gedik YE, Erman T, Ozcengiz D.** Patient-controlled analgesia: comparison of morphine to dexmedetomidine plus morphine in patients undergoing laminectomy. *Neurosurg Q.* 2008;18:178-181.
27. **Mantz J.** Alpha2-adrenoceptor agonists: analgesia, sedation, anxiolysis, haemodynamics, respiratory function and weaning. *Clinical Anaesthesiology.* 2000;14:433-448.
28. **Bhana N, Goa KL, McClellan KJ.** Dexmedetomidine. *Drugs.* 2000;59:263-268.
29. **Aantaa R, Kallio A, Virtanen R.** Dexmedetomidine, a novel alpha-2-adrenergic agonist. A review of its pharmacodynamic characteristics. *Drugs Future.* 1993;18:49-56.

J Pharmacol Sci 124, 409 – 417 (2014) *Journal of Pharmacological Sciences*

© The Japanese Pharmacological Society

Documento completo

Potenciación Regulada por PKC de la Analgesia de Morfina por la Hierba de San Juan en Roedores y Humanos

Nicoletta Galeotti[1], Mersedeh Farzad[2], Enrica Bianchi[3],*, and Carla Ghelardini[1]

[1]*Department of Neurosciences, Psychology, Drug Area and Child Health, NEUROFARBA, Pharmacology Unit, University of Florence, Viale G. Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy*

[2]*Oncology Department, CORAT, ASL7, 53100 Siena, Italy*

[3]*Department of Medicine, Surgery and Neuroscience, University of Siena, Via A. Moro 6, 53100 Siena, Italy*

Recibido el 6 de noviembre de 2013; aceptado el 7 de enero de 2014

Resumen: Nuestro objetivo fue combinar el uso de morfina con inhibidores clínicamente disponibles de la proteínquinasa C (PKC), Finalmente potenciando la analgesia por morfina en humanos. Las pruebas térmicas fueron realizadas en roedores y humanos a los que previamente se les administró morfina en forma acuda o crónica combinada o no con dosis en aumento del bloqueador de PKD Hierba de San Juan (SJW) o su principal componente hipericina. La fosforilación de la subunidad γ de la enzima PKC fue evaluada por transferencia Western en la materia gris periacueductal (PAG) de roedores que recibieron la coadministración de morfina e hipericina y fue prevenido en PAG de roedor por la SJW o coadministración de hipericina con morfina, induciendo una potenciación de analgesia de morfina en el dolor térmico. La calificación de la evaluación del dolor en voluntarios sanos fue disminuida en un 40% cuando se coadministró la morfina con SJW en una dosis muy por debajo de aquellas usadas para obtener efectos antidepresivos o analgésicos en roedores y humanos. El efecto de potenciación de SJW/hipericina duró en el tiempo y preservó la analgesia de morfina en ratones tolerantes. Nuestros hallazgos indican que, en la práctica clínica, SJW puede reducir la dosis de morfina obteniendo el mismo efecto analgésico. Por lo tanto, la SJW y uno de sus principales componentes, hipericina, parecen ser ideales para potenciar la analgesia inducida por morfina.

Palabras clave: morfina, Hierba de San Juan, proteinquinasa C, nocicepción térmica

Introducción

La morfina actualmente constituye la piedra angular de la terapia para dolor de moderado a severo de muchas etiologías. A pesar de la alta potencia analgésica del alcaloide, el número de efectos secundarios bien conocidos que limitan su uso es igualmente importante. Uno de los aspectos más controvertidos se relaciona con incertidumbre acerca de adaptaciones a uso crónico, lo cual incluye dudas sobre la tolerancia, hiperalgesia, y dependencia, limitando así el potencial de la morfina. La tolerancia a la morfina es un fenómeno farmacológico caracterizado por un desplazamiento de la curva dosis–respuesta a la derecha con una dosis efectiva mayor al 50%. La práctica convencional de la terapia de opioides en presencia de eficacia analgésica en disminución se basa en la escalación de dosis con el fin de restaurar el efecto analgésico. Así, han sido propuestos diversos enfoques que comban otros fármacos con opioides para incrementar su potencia y por ende reducir la dosis de opioide. Uno de estos consiste en administrar un fármaco adyuvante con efectos sinérgicos analgésicos con el fin de minimizar la dosis de opioide mientras se mantienen niveles aceptables de analgesia en combinación con fármacos antiinflamatorios no esteroideos, anticonvulsivos, o bloqueadores del canal de sodio con opioides (1, 2). La administración de agonistas $\alpha 2$ (3), 5-HT7 (4), NMDA (5), o antagonistas σ (6) puede potenciar la analgesia de la morfina. Sin embargo, los ensayos clínicos a veces han encontrado resultados contradictorios y este enfoque puede tener algunas implicaciones clínicas adverscs (7). La co-administración de antagonistas del receptor de NMDA tales como ketamina result en la atenuación del efecto crónico del opioide en animales, aunque los ensayos clínicos dieron resultados mixtos (7, 8).

Pudimos demostrar previamente en ratas que el bloqueo de la proteinquinasa C (PCK) potencia la analgesia de morfina (9). En estos experimentos, la subrregulation de la subunidad γ de PKC (PKCγ) podría inducir una potenciación dramática en el efecto analgésico inducido por morfina, la cual fue observable en el momento más próximo y duró más tiempo. Con estas indicaciones en mente, hemos enfocado nuestra atención en la hipericina y pseudohipericina como agentes potenciadores de la analgesia de morfina (Patente Italiana RM2006A00016). Estos compuestos han sido aislados de plantas de la familia hypericum. *Hypericum perforatum*, comúnmente conocida como Hierba de San Juan (SJW), ha sido usado por siglos como planta medicinal. Dioscorides, el médico más importante de la antigua Grecia, así como Plinio en Roma y Hipócrates, administraban la hierba en el tratamiento de varias enfermedades. En medicina tradicional, la SJW ha sido siempre usada en el tratamiento de heridas, enfermedades del riñón y pulmón y en lo que ahora llamamos depresión. Aunque estudios farmacológicos sobre la SJW se han enfocado en su actividad antidepresiva en depresión moderada, algunos estudios han documentado que el compuesto puede actuar como bloqueador de PKC (10), competitivamente uniéndose al dominio regulatorio de PKC (11). En el presente estudio hemos examinado el efecto potenciador del extracto seco de la SJW y sus constituyentes activos en el efecto analgésico inducido por morfina en roedores con el objetivo de establecer la dosis y después trasladar los resultados en humanos.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones macho suizos albinos y ratas de la granja de reproducción de Morini (San Polo d'Enza, Italia). Diez ratones y cuatro ratas fueron alojados en cada jaula, la cual fue colocada en el cuarto experimental 24 h antes de la prueba para aclimatación. Los animales fueron alimentados con dieta estándar de laboratorio y agua corriente ad libitum y mantenidos a 23°C ± 1°C con un ciclo de 12-h luz/oscuridad. Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva de Consejo de las Comunidades Europeas del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC). Todos los estudios involucrando animales están reportados de conformidad con las guías ARRIVE para experimentos que involucran animales (12). Un total de 170 animales fueron usados en estos experimentos. Con el fin de reducir lo más posible el número de animales usados, los criterios de tamaño de muestra con respecto a la significancia estadística fueron seguidos como se establece en Feinstein (13). Los animales fueron investigados por observadores mantenidos sin información de los tratamientos de los animales.

Protocolo de estudio en voluntarios sanos

El estudio de protocolo fue aprobado por el comité de ética institucional y las autoridades de salud apropiadas del Servicio de Salud Nacional Italiana y fue dirigido de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1964 y las Buenas Guías de la Práctica Clínica. Ocho voluntarios macho sanos asintomáticos entre las edades de 25 y 35 años fueron reclutados entre el staff. Ellos reportaron que no consumían drogas. Además, se les pidió a los sujetos que no hicieran ejercicio físico y evitaran consumir cafeína, alcohol, o nicotina en los días del experimento. Todos los sujetos informaron su consentimiento antes del comienzo del estudio. Antes de involucrarse en el estudio, a los participantes les fueron proporcionados panfletos de información que explican el procedimiento. Posibles riesgos tales como riesgos después de la inmersión, la garantía sobre el anonimato, y la posibilidad de detener la participación en el estudio, fueron mencionados.

A los voluntarios sanos se les dio una solución de morfina oral (10 mg/5 ml) (Oramorph; MOLTENI & C. F.LLI ALITTI SpA, Florencia, Italia) in presencia o ausencia de tabletas de SJW (300 mg) que contienen 0.3% de hipericina (Quiens; Mario Antonetto Farmaceutici, Torino; AIC No. 034870028). La dosis de SJW administrada a los voluntarios se obtuvo de acuerdo a un estudio en roedores y se normalizó a kg considerando un individuo que pesa 70 kg.

Procedimiento de Inmersión

Una sesión consistió de la inmersión gradual del brazo dominante en agua caliente no nociva circulante (46°C).La temperatura del agua se mantuvo a 46°C usando un termostato y fue constantemente monitoreada con un termómetro digital. La temperatura del agua de 46°C se seleccionó específicamente de acuerdo con el estudio de Staud et al. (14). Los sujetos, después de un periodo de aclimatación en el cuarto de prueba, se les pidió sumergir el antebrazo incluyendo el codo de su brazo en agua circulante nociceptiva caliente por 2 min y para medir la intensidad y

displacer de dolor percibido cada 30 s durante ese tiempo. El dolor percibido fue medido con una calificación entre 0, indicando no dolor en lo absoluto, y 100 como dolor intolerable. Se administró la morfina 30 min antes de comenzar el proceso de inmersión de acuerdo a los estudios de farmacocinética/farmacodinamia de la morfina después de administración oral (15). La SJW fue administrada 60 min después de la morfina.

Administración de fármaco a roedores

Los animales fueron aleatoriamente asignados a grupos de tratamiento. El extracto seco de la SJW que contenía 0.32% del total de hipericina (Indena Research Laboratories, Milan, Italia), hiperforina, hiperosido, quercetinay amentoflavona (Sigma, Milan, Italia) fueron disueltos en 1% de solución de carboximetilcelulosa inmediatamente antes de usar y administrar por administración oral. Las dosis de hipericina (0.016 mg/kg), hiperforina (0.21 mg/kg), quercetina (0.0415 mg/kg), amentoflavona (0.0029 mg/kg), e hiperósido (0.3175 mg/kg) aproximado a la cantidad de cada componente presente en una 5 preparación de mg/kg de extracto seco de SJW. La SJW y los componentes se administraron 60 min antes de la morfina (morfina clorhidrato; SALARS, Como, Italia) de acuerdo a un protocolo previamente establecido (22). La morfina se administró subcutánea a los roedores a una dosis de 5 y 7 mg/kg. La hipericina (0.15 mg por ratón) y calfostina C fueron administrados intracerebroventricularmente (i.c.v.) inmediatamente antes morfina. Se les administró a las ratas materia gris intra–periacueductal (PAG) como se reportó previamente (16) con hipericina (0.4 mg por rata). El bloqueador PKC de calfostina C (Calbiochem, Milan, Italia) se disolvió en 0.5% DMSO y se usó a 0.2 mg por ratón. Los vehículos usados para dissolver los fármacos fueron probados para determinar la ausencia de cualquier efecto en el umbral de dolor en comparación con ratones control y tratados con salina.

Tolerancia nociceptiva a la morfina

La tolerancia de la morfina fue inducida en ratones con un esquema de 4-día. Los animales recibieron 2 inyecciones diarias de morfina alas 10:00 am y 8:00 pm. Las dosis individuales fueron 10 mg/kg subcutánea en el día 1, 15 mg/kg subcutánea en el día 2, 20 mg/kg subcutánea en el día 3, y 30 mg/kg subcutánea en el día 4 de acuerdo a un esquema validado previamente (17).

Placa caliente

Las ratas fueron colocadas dentro de un contenedor de acero inoxidable, el cual fue ajustado termostáticamente a 52.5°C ± 0.1°C en un baño de agua de precisión de KW Mechanical Workshop, Siena, Italia. Usamos una temperatura más baja (52.5°C en lugar de 54°C) para revelar potencial, alteraciones sutiles que pudieran ocurrir en nocicepción térmica basal. Los tiempos de reacción(s) fueron medidos con un cronómetro antes y después de la administración de los compuestos investigados. El punto terminal usado fue la lamida de las patas trasera o frontal. Fue adoptado un tiempo arbitrario de corte de 60 s.

Análisis de Transferencia Western

Las muestras de PAG de los ratones fueron homogenizados en un amortiguador de homogenización que contienen 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2.5 mM EDTA, 2 mM NaPP, 4 mM PNFF, 1 mM Na3VO4, 1 mM PMSF, 20 mg/ml leupeptina, 50 mg/ml aprotinina, and 0.1% SDS. El homogenado fue centrifugado a 9,000 × g por 15 min a 4°C, y la baja velocidad del pellet fue descartado. La concentración de proteína fue cuantificada usando el método de Bradford (kit de ensayo de proteína; Bio-Rad Laboratories, Milan, Italia). Los homogenados de membrana (10 mg) fueron separados en SDS-PAGE al 10% y transferidos sobre membranas de nitrocelulosa (90 min a 120 V) usando procedimientos estándar. Las membranas fueron bloqueadas en PBST (PBS conteniendo 0.1% Tween) conteniendo 5% de leche seca descremada por 120 min. Después de los lavados, las transferencias fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos contra PKCγ fosforilada en Thr514 (pPKCγ, dilución 1:1000) (Biosource, Camarillo, CA, EEUU); b-actina (dilución 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EEUU). Después de ser lavada con PBS conteniendo 0.1% Tween, la membrana de nitrocelulosa fue incubada con antisuero secundario conjugado de peroxidasa de cabra anti-ratón rábano picante (1:10,000) y se dejó por 1 h a temperatura ambiente. Las transferencias fueron entonces extensivamente lavadas de acuerdo con la instrucción del fabricante y desarrolladas usando un sistema de detección por quimioluminescencia (Pierce, Milan, Italia). El tiempo de exposición y desarrollo usado fue estandardizado por todas las transferencias. Las mediciones de densidad óptica fueron desarrolladas mediante la división de la intensidad de las bandas por la intensidad de la proteína protectora β-actina, usada como control de carga. A las mediciones en muestras control les fue asignado un valor relativo de 100%.

Fig. 1. Dosis bajas de SJW incrementaron la antinocicepción de morfina en la prueba de la placa caliente. La actividad antinociceptiva de la morfina [A: $F(2,135)49.19$, $P < 0.0001$] y la SJW [B: $F(3,179)27.67$, $P < 0.0001$]; la diferencia significativa se presenta como la diferencia desde el grupo de salina en el punto de tiempo correspondiente: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, comparado con el grupo tratado. En el panel C, una dosis inefectiva de la SJW (1 mg/kg) hizo efectiva una dosis de morfina (2 mg/kg) libre de propiedades antinociceptivas [$F(1,90)41.97$, $P < 0.0001$] e incrementó la antinocicepción inducida por una dosis efectiva de morfina (5 mg/kg) [D: $F(1,90)42.78$, $P < 0.0001$]. Un desplazamiento a la izquierda de la curva dosis–respuesta de morfina por una dosis muy baja de la SJW se muestra en el panel E [$F(1,99)141.30$, $P < 0.0001$]. La curva dosis–respuesta del efecto potenciador de morfina en la SJW está representado en el panel F [$F(3,144)662.30$, $P < 0.0001$]. La prueba nociceptiva en los paneles E y F fue desarrollado 30 min después de la administración de morfina. La comparación post hoc en C – F: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. el grupo tratado con morfina correspondiente.

Fig. 2. Intensidades de dolor reportadas en sujetos tratados con morfina co-administrados con la SJW. La calificación principal media a partir de la evaluación repetida de respuesta nociceptiva fueron reportados para cada voluntario sano evaluado con respecto a un tratamiento diferente (no tratamiento, morfina, cotratamiento de morfina/SJW). ANOVA de una vía para medidas repetidas dio un efecto principal significativo para el tratamiento de morfina con la SJW comparado con la morfina sola en la disminución de la calificación nociceptiva [$F(2, 24)21.7$, $P < 0.0001$].

Fig. 3. Efecto de la administración oral de los components de la SJW en la antinocicepción de la morfina. En las pruebas de la placa caliente [A: F(5,59)3.18, P < 0.0001] y en la placa fría [B: F(5,59)6.99, P < 0.0001] , la hipericina (HYP) mostró un perfil potenciador similar a la SJW. Por el contrario, la quercetina (QUER), el hiperósido (HYS), y la hiperforina (HYF) estuvieron libres de cualquier efecto. La evaluación nociceptiva fue desarrollada 30 min después de la inyección de morfina. Prueba Post hoc Tukey: *P < 0.001, comparada con ratones tratados con salina °P < 0.001 vs. Grupo tratado con morfina en el punto de tiempo correspondiente.

Fig. 4. Efecto potenciador de hipericina inyectada i.c.v. sobre antinocicepción de morfina. A: administración i.c.v. de hipericina (hyp, 0.15 mg por ratón) hizo que la dosis de morfina inefectiva fuera antinociceptiva (2 mg/kg) [F(3,180)27.98, P < 0.001]. Comparación post hoc: *P < 0.05, **P < 0.01 vs. grupo tratado con morfina en el punto temporal correspondiente. B, C: hipericina i.c.v. potenció la antinocicepción inducida por morfina a una dosis de 5 mg/kg [F(3,180)11.6, P < 0.001] y 7 mg/kg [F(4,225)103.8, P < 0.001]. La comparación post hoc: *P < 0.05, **P < 0.01 vs. salina; °P < 0.05, °°P < 0.01 vs. grupo tratado con morfina en el punto temporal correspondiente. D: hipericina sola estuvo libre de cualquier efecto en el umbral de dolor del ratón.

Fig. 5. Efecto de la hipericina en la morfina indujo la fosforilación de PKCγ. Los experimentos de transferencia Western desarrollados en el área PAG mostraron que la hipericina intra-PAG (hyp, 0.4 mg) previno la fosforilación incrementada de PKCγ inducida por administración de morfina i.p. (morph) a dosis de 5 mg/kg (A). La comparación post hoc: ***P < 0.001 vs. grupo tratado con salina, °°°P < 0.001 vs. Grupo tratado con morfina. En el panel B, la hipericina intra-PAG y la calfostina C (CC) potenciaron la antinocicepción térmica inducida por morfina [F(3,180)29.4, P < 0.001]. La comparación post hoc :*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. grupo tratado con morfina en el punto de tiempo correspondiente.

Fig. 6. El efecto de hipericina en el efecto antinociceptivo crónico de morfina en la prueba de la placa caliente. A) Curso temporal de efecto anti-nociceptivo de administración repetida de morfina administrada dos veces al día [F(1,72)446.37, P < 0.0001]. La prueba nociceptiva fue desarrollada 30 min después de cada inyección. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. grupo tratado con salina; °P < 0.05, °°P < 0.01 vs. efecto de morfina en el día 1. Efecto en el curso temporal de la combinación morfina-salina y morfina-hipericina en el día 5 (B) y se muestra para cada uno de los 5 días (en el tiempo 30 min) en animales que han recibido tratamiento crónico con estos fármacos [F(2,108)119.74, P < 0.0001]. La diferencia significativa de morfina en el mismo punto de tiempo: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001; morph = morfina, hyp = hipericina.

Análisis estadísticos

Todos los resultados experimentales son dados como la media ± S.E.M. Análisis de varianza de una vía y de dos vías, seguidos, respectivamente, por la prueba de Tukey y Bonferroni post hoc, fueron usados para el análisis estadístico.

Resultados

Estudio de la dosis de SJW en roedores

En la prueba de la placa caliente en los ratones, la morfina mostró propiedades antinociceptivas empezando por la dosis de 5 mg/kg, mientras que las dosis más bajas no fueron efectivas. El efecto antinociceptivo de la morfina alcanzó su máximo a los 30 min después de la administración de morfina, y los umbrales nociceptivos térmicos regresaron a los valores de línea base 60 min después de la inyección del fármaco (Fig. 1A). La morfina provocó una respuesta antinociceptiva pico a los 30 min después de la inyección del fármaco, y los umbrales nociceptivos térmicos regresaron a los valores de la línea base a los 60 min después de la inyección del fármaco (Fig. 1A). La SJW fue dotada también con propiedades antinociceptivas. La administración oral de una dosis de 10 mg/kg de la SJW incrementó el umbral de dolor 60 min después de la inyección, con un pico a los 90 min, y todavía fue significativa después de 120 min. Las dosis más bajas fueron estuvieron desprovistas de cualquier efecto (Fig. 1B). La coinyección de morfina con una dosis inefectiva de SJW (1 mg/kg) potenció la actividad antinociceptiva de la morfina. La SJW incrementó los valores de latencia de lamida después de la administración de una dosis inefectiva de morfina (2 mg/kg) (Fig. 1C) y potenció el efecto antinociceptivo inducido por la morfina a 5 mg/kg (Fig. 1D). La respuesta de la combinación de la morfina con SJW permaneció elevada significativamente por encima de la producida por la morfina sola hasta el final del periodo de prueba. Un desplazamiento a la izquierda de la curva dosis–respuesta de la morfina fue observado después de la co-administración con una dosis baja de la SJW, drásticamente reduciendo la dosis de morfina necesaria para alcanzar el efecto máximo antinociceptivo (Fig. 1E). Los experimentos dosis–respuesta mostraron que las dosis más bajas de la SJW (0.03 mg/kg) no fueron capaces de modificar la antinocicepción de la morfina y que no se detectó más actividad potenciadora al incrementar la concentración de la SJW (5 mg/kg) (Fig. 1F).

La co-administración de morfina y la SJW no alteró la coordinación motriz y la movilidad espontánea (datos no mostrados).

Pruebas en Humanos

Ocho voluntarios sanos sumergieron su antebrazo en agua caliente circulante nociceptiva por 2 min y valoraron la intensidad y displacer del dolor percibido. La principal intensidad de dolor de todas las calificaciones, registrada cada 30 s durante 2 min de inmersión del brazo, se muestra en la Fig. 2 para cada sujeto después de la administración de morfina en presencia o ausencia de la SJW a dosis baja. La calificación fue evaluada en diferentes días para la línea base, tratamiento con morfina sola y coadministración de morfina con la SJW. Un análisis de potencia post hoc se llevó a cabo para las diferencias significativas en calificaciones de dolor. La calificación total media de intensidad de dolor fue significativamente diferente entre morfina sola y coadministración de morfina con la SJW lo que indica una mejor calificación cuando a los sujetos sanos se les administró morfina en presencia de la SJW.

Involucramiento diferencial de los componentes de la SJW en la potenciación de la eficacia analgésica de morfina

Investigamos los efectos producidos por algunos de los componentes principales de este fármaco vegetal administrado en una concentración correspondiente al contexto presente en una preparación de 5mg/kg de la SJW. La administración de hipericina aumentó el efecto de la morfina con un perfil similar a la SJW (Fig. 3A). Por el contrario, la administración de flavonoides quercetina, hiperósido o hiperforina estuvo libre de cualquier efecto (Fig. 3A). La coadministración de morfina con hipericina e hiperósido no modificó la potenciación antinocicpetiva inducida por morfina con hipericina sola (Fig. 2: A,B).

Potenciación de antinocicepción térmica aguda de morfina por el componente hipericina de la SJW

La coadministración intracerebroventricular de hipericina a ratones provocó que una dosis no efectiva de morfina fuera antinociceptiva (2mg/kg, Fig. 4A) y mejoró la antincicepción térmica inducida por morfina a dosis antinociceptivas de 5 mg/kg (Fig. 4B) y 7 mg/kg (Fig. 4C) en la prueba de la placa caliente. La hipericina sola estuvo libre de cualquier efecto (Fig. 4D).

La SJW y la hipericina afectan la fosforilacion de PKC

Conducimos experimentos de transferencia Western ex vivo en el área PAG para detectar cómo la coadministración de morfina con el componente de la SJW hipericina afecta la expresión de la isoforma PKC principalmente involucrado en la potenciación de morfina. La fosforilación de PKCγ fue incrementada en PAG de rata a 30 min después de administración i.p. (interaperitoneal) de morfina (5mg/kg). La coadministración de hipericina intra-PAG con morfina revirtieron completamente la sobreexpresión de pPKCγ en PAG de rata (Fig. 5A). Un resultado similar podría obtenerse al inyectar calfostina C, un bloqueador selectivo de PKC, en PAG de rata (Fig. 5A). La inyección intra-PAG de hipericina combinada con morfina a 5 mg/kg produjo una respuesta antinociceptiva térmica muy por encima de la producida por el alcaloide solo (Fig. 5B). La coadministración de calfostina C intra-PAG potenció la antinocicepción de morfina con un perfil antinociceptivo similar a la de hipericina (Fig. 5B). CC y SJW solas no indujeron algún cambio en la fosforilación de PKCγ (datos no mostrados).

Efecto de la SJW sobre la tolerancia crónica a la morfina

Las respuestas antinociceptivas producidas por dosis incrementadas de morfina, administradas dos veces al día por cuatro días, en la prueba de la placa caliente se muestran en la figura 6A). La administración de morfina en el día 1 produjo un efecto antinociceptivo máximo, pero inyecciones diarias sucesivas de morfina resultaron en una pérdida progresiva de la respuesta antinociceptiva

inducida por el fármaco, el cual se aproximó al valor de la línea base en el día 4. La administración diaria de hipericina sola produjo una respuesta comparable con la producida por salina (datos no mostrados). La figura 6B ilustra el curso temporal de la respuesta antinociceptiva en el día 5. Como se muestra, la morfina no produjo algún efecto antinociceptivo significativo en comparación con el grupo control tratado con solución salina. En contraste agudo, la respuesta a la combinación hipericina-morfina pudo mantener el efecto antinociceptivo de la morfina como se muestra en los valores de latencia de lamida comparable a aquellos obtenidos por administración aguda de morfina.

Discusión

Nuestros hallazgos muestran que la SJW incrementa el efecto antinociceptivo de la morfina en animales sin tratamiento y tolerantes a la morfina. Como un modelo experimental para medir el umbral algogénico, escogimos la prueba de la placa caliente que produce dolor sin inflamación. La nocicepción fue evaluada considerando el tiempo de reacción del animal hacia un estímulo térmico. Un incremento significativo de los valores de latencia de lamida podrían ser observados después de la coadministración de morfina con una dosis baja de SJW en ratones sometidos a esta prueba, drásticamente reduciendo la dosis de morfina necesaria para alcanzar el efecto antinociceptivo máximo. Cuando la dosis baja de SJW fue coadministrada con tratamiento repetido con morfina, la respuesta antinociceptiva a la morfina no fue modificada en animales tolerantes, estableciendo que la SJW podría disminuir el requerimiento de opioide en los animales que exhiben tolerancia crónica nociceptiva al alcaloide. Estos resultados podrían ser trasladados a humanos. Consistente con los requisitos éticos y por tanto limitado a administración aguda, la SJW fue coadministrada con la dosis analgésica de morfina a una muestra pequeña de vountarios sanos a la misma dosis baja usada en experimentos con animales. La eficacia de la inhibición del dolor fue evaluada por estímulo con calor, y los resultados mostraron que la eficacia fue significativamente incrementada cuando los sujetos sanos fueron tratados con morfina en presencia de la SJW comparado con la morfina sola. Estos resultados indican que en la práctica clínica, la SJW podría reducir la dosis de morfina mientras se obtiene el mismo efecto analgésico.

El extracto seco de la SJW contiene numerosos componentes activos (18). Los efectos producidos por los principales constituyentes fueron investigados con el fin de identificar el componente responsable de la potenciación de la antinocicepción de la morfina. Las dosis usadas fueron estimadas con base en los porcentajes de cada constituyente solo usualmente presente en la dosis de SJW administrada en nuestros experimentos. Entre los numerosos componentes de la SJW solamente la hipericina purificada incrementó la antinocicepción de la morfina en ambos modelos animales de nocicepción aguda térmica y en tolerancia nociceptiva con una eficacia en el curso de tiempo similar a la de la SJW. Por el contrario, la hipericina sola estuvo libre de algún efecto. Hemos reportado aquí la actividad potenciadora de la morfina por parte de la hipericina, sugiriéndola como el componente de la SJW que es responsable de la potenciación analgésica de la morfina.

De manera notablee, en nuestros experimentos, dosis relativamente bajas de la SJW significativamente potenciaron el efecto analgésico de la morfina en roedores y humanos. Ha sido reportado que las drogas antidepresivas tricíclicas poseen eficacia clínica en el tratamiento de estados de dolor crónico tales como analgésico adyuvante. Sin embargo, no sería racional que la SJW incremente el efecto analgésico de la morfina al tener efecto antidepresivo debido a que las dosis usadas en estos experimentos no podrían ser suficientes para ejercer acción antidepresiva en ambos roedores y humanos (19). A la SJW también se le han asignado propiedades antinociceptivas en modelos animales (20). El efecto potenciador mostrado por esta medicina herbal no fue secundario a su actividad antinociceptiva, ya que el incremento en el efecto analgésico de la morfina fue producido a dosis libres de cualquier capacidad de modular el umbral de dolor en roedores.

Se ha reportado que la SJW incrementa la actividad de la enzima citocromo P450 (CYP3A4) (21). Diversos reportes han documentado niveles disminuidos de sustratos de CYP3A4 en sangre/plasma, tales como indinavir y ciclosporina A, en pacientes que toman de manera concomitante la SJW, finalmente reduciendo el efecto del fármaco considerablemente. En un estudio previo, las concentraciones de morfina en plasma y cerebro después de inyección s.c. de morfina en ratones previamente tratados con la SJW no fueron significativamente diferentes de aquellas en los ratones tratados con morfina sin este fármaco herbal (22). Por lo tanto, se puede excluir que la SJW podría alterar la farmacodinamia de la morfina.

Entre la familia de PKC, el isotipo gamma de PKC (PKCγ) es único entre los miembros de la familia de PKC clásica en su distribución neuronal exclusiva en el SNC y parece ser la isoforma con un papel prominente en la modulación de la percepción del dolor (23). En nuestras investigaciones previas, hemos podido mostrar que la subregulación de PKCγ podría potenciar la analgesia de morfina (9). En los presentes experimentos, la administración de morfina a ratones indujo la fosforilación de PKCγ en PAG, un área crítica del cerebro en el procesamiento de señales de dolor y un sitio de acción primaria de muchos compuestos analgésicos (24). Cuando el componente principal de la SJW hipericina fue inyectado directamente en el PAG de ratas a las que se les administró morfina, la fosforilación de PKCγ fue evitada en esta área cerebral y la respuesta antinociceptiva térmica fue mejorada, apoyando adicionamente que la PGA está directamente implicada en la potenciación de morfina inducida por la SJW a través de la activación de PKCγ. La SJW ha mostrado jugar también el papel de un inhibidor de PKC específico como se demostró previamente de acuerdo con ensayos de enzimas desarrollados en el cerebro de rata (10) y un estudio previo en células cultivadas apoyó la idea de que la SJW podría unirse competitivamente para el dominio regulatorio de PKC (11). Es por tanto concebible que la SJW juega este papel en la potenciación de la morfina.

Los opioides, y particularmente la morfina, son considerados como el "estándar de oro" para el manejo de dolor. Sin embargo, diversos efectos secundarios severos asociados con dosis de morfina repetida y/o en incremento, incluyendo constipación, sedación, depresión respiratoria y náusea, representan inconvenientes considerables para su uso. Tan lejos como podemos discutir en términos éticos, farmacológicos y estudios clínicos, la morfina permanece como la más eficaz y

eficiente (en términos costo-efectivos) para la terapia de dolor en pacientes con cáncer y terapia paliativa en general. Sin embargo, está todavía vivo el sentido de ansiedad en pacientes acerca de los efectos de morfina que previenen el acceso adecuado al tratamiento del dolor. Entre las principales razones de esta supervivencia no confiable, la primera es el miedo del fenómeno de habituación, un riesgo que de acuerdo a la literatura permanece por debajo del 0.01%, pero asusta tanto a pacientes como también a veces a los profesionales. De otro modo, es por tanto un caso típico de confianza plena que hace posible escoger una cura natural herbal porque uno piensa que lo que es natural es siempre bueno. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que el 80% de las personas en las naciones desarrolladas confía en la medicina herbal para algo del cuidado de su salud. El complemento con morfina con una sustancia natural como la SJW puede inducir un mejor cumplimiento en pacientes sometidos a terapia paliativa.

La eficacia de opioides disminuida durante el curso de la terapia con opioides ha sido considerada como un signo de tolerancia farmacológica a los opioides. De ese modo, la escalación de la dosis de opioides es un enfoque lógico para restaurar la efectividad de la analgesia de opioides. Nuestros experimentos ofrecen una razón para esperar que esta práctica pueda ser revisitada usando morfina en combinación con la SJW y su componente hipericina como una perspectiva terapéutica más segura para disminuir los requerimientos de opioides.

Reconocimientos

Este trabajo fue apoyado por MiUR GRants, Projecto PAR.

Conflictos de Interés

Los autores del presente documento declaran que no existen relaciones personales o financieras con otras personas u organizaciones influenciadas de manera apropiada en nuestro trabajo.

Referencias

1 Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27:520–523.

2 Mao J, Gold MS, Backonja MM. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. J Pain. 2011; 12:57–166.

3 Milne B, Sutak M, Cahill CM, Jhamandas K. Lowdoses of a2-adrenoceptor antagonists augment spinal morphine analgesia and inhibit development of acute and chronic tolerance. Br J Pharmacol. 2008;155:1264–1278.

4 Brenchat A, Ejarque M, Zamanillo D, Vela JM, Romero L. Potentiation of morphine analgesia by adjuvant activation of 5-HT7 receptors. J Pharmacol Sci. 2011;116:338–391.

5 Campos AR, Santos FA, Rao VS. Ketamine-induced potentiation of morphine analgesia in rat tail-flick test: role of opioids, a2-adrenoceptors and ATP-sensitive potassium channels. Biol Pharm Bull. 2006;29:86–89.

6 Sánchez-Fernández C, Nieto FR, González-Cano R, Artacho-Cordón A, Romero L, Montilla-García A, et al. Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by s1 receptor inhibition: Role of peripheral s1 receptors. Neuropharmacology. 2013;70:348–358.

7 Carstensen M, Møller AM. Adding ketamine to morphine for intravenous patient-controlled analgesia for acute postoperative pain: a qualitative review of randomized trials. Br J Anaesth. 2010;104:401–406.

8 Subramaniam K, Subramaniam B, Steinbrook RA. Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review. Anesth Analg. 2004;2:482–495.

9 Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperal-gesia in mice. Pain. 2006;123:194–305.

10 Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. Biochem Biophys Res Commun. 1989;165:1207–1212.

11 Kocanova S, Hornakova T, Hritz J, Jancura D, Chorvat D, Mateasik A, et al. Characterization of the interaction of hypericin with protein kinase C in U-87 MG human glioma cells. Photochem Photobiol. 2006;82:720–728.

12 Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. Br J Pharmacol. 2010;160:1577–1579.

13 Feinstein A. Sample size and the other side of statistical significance. In: Clinical Biostatistics. C.V. Saint Louis; Mosby Company: 1977. pp. 320–335.

14 Staud R, Vierck CJ, Robinson ME, Price DD. Spatial summation of heat pain within and across dermatomes in fibromyalgia patients and pain-free subjects. Pain. 2004;111:342–350.

15 Ing Lorenzini K, Daali Y, Dayer P, Desmeules J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of opioids in healthy human volunteers. A minireview. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012; 110:219–226.

16 Ghelardini C, Galeotti N, Vivoli E, Norcini M, Zhu W, Stefano GB, et al. Molecular interaction in the mouse PAG between NMDA and opioid receptors in morphine-induced acute thermal nociception. J Neurochem. 2008;105:91–100.

17 Way EL, Loh HH, Shen FH. Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. J Pharmacol Exp Ther. 1969;167:1–8.

18 Greeson JM, Sanford B, Monti DA. St. John's wort (hypericum-perforatum): a review of the current pharmacological, toxicologi-cal, and clinical literature. Psychopharmacology. 2001;153: 402–414.

19 Kasper S, Caraci F, Forti B, Drago F, Aguglia E. Efficacy and tolerability of Hypericum extract for the treatment of mild to moderate depression. Neuropsychopharmacology. 2010;20: 747–765.

20 Galeotti N, Vivoli E, Bilia AR, Bergonzi MC, Bartolini A, Ghelardini C. A prolonged Protein Kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's Wort in mice. J Pain. 2010;11:149–159.

21 Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC,

Meier PJ, et al. St John's wort induces intestinal P-glycoprotein/ MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. Clin Pharmacol Ther. 2000;68:598–604.

22 Uchida S, Hirai K, Hatanaka J, Hanato J, Umegaki K, Yamada S. Antinociceptive effects of St. John's wort, Harpagophytum procumbens extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. Biol Pharm Bull. 2008;31:240–245.

23 Velazquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. Pharmacol Res. 2007; 55:578–689.

24 Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. Annu Rev Neurosci. 1984;7:309–338.

J Pharmacol Sci 124, 409 – 417 (2014)

Journal of Pharmacological Sciences
© The Japanese Pharmacological Society

Full Paper

PKC-Mediated Potentiation of Morphine Analgesia by St. John's Wort in Rodents and Humans

Nicoletta Galeotti[1], Mersedeh Farzad[2], Enrica Bianchi[3,*], and Carla Ghelardini[1]

[1]*Department of Neurosciences, Psychology, Drug Area and Child Health, NEUROFARBA, Pharmacology Unit, University of Florence, Viale G. Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy*
[2]*Oncology Department, CORAT, ASL7, 53100 Siena, Italy*
[3]*Department of Medicine, Surgery and Neuroscience, University of Siena, Via A. Moro 6, 53100 Siena, Italy*

Received November 6, 2013; Accepted January 7, 2014

Abstract. Our purpose was to combine the use of morphine with clinically available inhibitors of protein kinase C (PKC), finally potentiating morphine analgesia in humans. Thermal tests were performed in rodents and humans previously administered with acute or chronic morphine combined or not with increasing doses of the PKC-blocker St. John's Wort (SJW) or its main component hypericin. Phosphorylation of the γ subunit of PKC enzyme was assayed by western blotting in the periaqueductal grey matter (PAG) from rodents co-administered with morphine and hypericin and was prevented in rodent PAG by SJW or hypericin co-administration with morphine, inducing a potentiation of morphine analgesia in thermal pain. The score of pain assessment in healthy volunteers were decreased by 40% when morphine was co-administered with SJW at a dose largely below those used to obtain an antidepressant or analgesic effect in both rodents and humans. The SJW/hypericin potentiating effect lasted in time and preserved morphine analgesia in tolerant mice. Our findings indicate that, in clinical practice, SJW could reduce the dose of morphine obtaining the same analgesic effect. Therefore, SJW and one of its main components, hypericin, appear ideal to potentiate morphine-induced analgesia.

Keywords: morphine, St. John's wort, protein kinase C, thermal nociception

Introduction

Morphine currently constitutes the cornerstone therapy for moderate-to-severe pain of many etiologies. Despite the high analgesic potency of the alkaloid, the number of well-known side effects that limit its use are equally important. One of the more controversial aspects relates to uncertainties about adaptations to chronic use, which include concerns over tolerance, hyperalgesia, and dependence, thus limiting morphine clinical potential. Morphine tolerance is a pharmacological phenomenon characterized by a shift of the dose–response curve to the right with a larger 50% effective dose. The conventional practice of opioid therapy in the presence of diminishing analgesic efficacy is based on dose-escalation in order to restore analgesic effect. Thus, several approaches combining other drugs with opioids to increase their potency and thus reduce the opioid doses, have been proposed. One of these is to administer an adjuvant drug with synergistic analgesic effects in order to minimize the dose of the opioid while maintaining acceptable levels of analgesia as combination of non-steroidal anti-inflammatory drugs, anticonvulsants, or sodium-channel blockers with opioids (1, 2). The administration of $\alpha 2$ (3), 5-HT_7 (4) agonists, NMDA (5), or σ antagonists (6) can potentiate morphine analgesia. However, clinical trials have sometimes found contradictory results and this approach may have some adverse clinical implications (7). Co-administration of NMDA-receptor antagonists such as ketamine resulted in the attenuation of the chronic opioid effect in animals, although clinical trials gave mixed results (7, 8).

We could previously demonstrate in rats that blockade of protein kinase C (PKC) potentiates morphine analge-

*Corresponding author. enrica.bianchi@unisi.it
Published online in J-STAGE
doi: 10.1254/jphs.13226FP

sia (9). In these experiments, the downregulation of the γ subunit of PKC (PKCγ) could induce a dramatic potentiation in morphine induced analgesic effect, which was observable at the earlier time and lasted longer. With these indications in mind, we have focused our attention on hypericin and pseudohypericin as potentiating agents of morphine analgesia (Italian Patent RM2006A00016). These compounds have been isolated from plants of the hypericum family. *Hypericum perforatum*, commonly called St. John's Wort (SJW), has been used for centuries as a medicinal plant. Dioscorides, the physician most important in ancient Greece, as well as Pliny in Rome and Hippocrates, were administering the herb in the treatment of many diseases. In folk medicine, SJW has always been used in the treatment of wounds, kidney, and lung diseases and in what we now call depression. Although pharmacological studies on SJW have focused on its antidepressant activity in mild depression, some studies have documented that the compound can act as PKC blocker (10), competitively binding to the regulatory domain of PKC (11). In the present study we examine the potentiating effect of SJW dried extract and its active constituents on the morphine-induced analgesic effect in rodents with the aim to establish the dose and then translate the results to humans.

Materials and Methods

Animals

Adult male Swiss albino mice and rats from the Morini (San Polo d'Enza, Italy) breeding farm were used. Ten mice and four rats were housed per cage, which were placed in the experimental room 24 h before the test for acclimatization. The animals were fed a standard laboratory diet and tap water ad libitum and kept at 23°C ± 1°C with a 12-h light/dark cycle. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for experiments involving animals (12). A total of 170 animals were used in these experiments. In order to reduce as much as possible the number of animals used, sample size criteria as regard to statistical significance were followed as set out in Feinstein (13). Animals were investigated by observers kept unaware of the treatment of the animals.

Study protocol in healthy volunteers

The study protocol was approved by the appropriate institutional ethics committee and health authorities of the Italian National Health Service and was conducted in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice Guidelines. Eight male healthy asymptomatic volunteers between the ages of 25 and 35 years were recruited among the staff. They reported that they did not consume drugs. Furthermore, subjects were asked not to undertake physical exertion and to refrain from consuming caffeine, alcohol, or nicotine on the days of the experiment. All subjects gave informed consent prior to study commencement. Before their involvement in the study, the participants were provided with an information leaflet explaining the procedure. Possible risks such as redness after the immersion, the guarantee on anonymity, and the possibility to stop study participation, were mentioned.

Healthy volunteers were given a morphine oral solution (10 mg/5 ml) (Oramorph; MOLTENI & C. F.LLI ALITTI SpA, Florence, Italy) in the presence or absence of SJW (300 mg) tablets containing 0.3% hyperycin (Quiens; Mario Antonetto Farmaceutici, Torino; AIC No. 034870028). The dose of SJW administered to volunteers was obtained according to a study in rodents and was normalized to kg considering an individual weighting 70 kg.

Immersion procedure

A session consisted of the gradual immersion of the dominant arm in circulating noxious hot water (46°C). Water temperature was maintained at 46°C using a thermostat and was constantly monitored with a digital thermometer. The water temperature of 46°C was specifically chosen in accordance with the study of Staud et al. (14). The subjects, after a period of acclimatization in the test room, were asked to immerse the forearm including elbow of his arm in circulating nociceptive hot water for 2 min and to rate the intensity and unpleasantness of pain perceived every 30 s during that time. Perceived pain was rated with a score between 0, indicating no pain at all, and 100 intolerable pain. Morphine was administered 30 min before starting of the immersion procedure according to morphine pharmacokinetic/pharmacodynamic studies after oral administration (15). SJW was administered 60 min before morphine.

Drug administration to rodents

Animals were randomly assigned to treatment groups. SJW dried extract containing 0.32% of total hypericin (Indena Research Laboratories, Milan, Italy), hyperforin, hyperoside, quercetin, and amentoflavone (Sigma, Milan, Italy) were dissolved in 1% carboxymethylcellulose solution immediately before use and administered by oral gavage. The doses of hypericin (0.016 mg/kg), hyperforin (0.21 mg/kg), quercetin (0.0415 mg/kg), amentoflavone (0.0029 mg/kg), and hyperoside (0.3175 mg/kg) approximate the amount of each component

present in a 5 mg/kg preparation of SJW dried extract. SJW and components were administered 60 min before morphine (morphine hydrochloride; SALARS, Como, Italy) according to a previous established protocol (22). Morphine was administered s.c. to rodents at a dose of 5 and 7 mg/kg. Hypericin (0.15 μg per mouse) and calphostin C were administered intracerebroventricularly (i.c.v.) immediately before morphine. Rats were administered intra–periaqueductal grey matter (PAG) as previously reported (16) with hypericin (0.4 μg per rat). The PKC-blocker calphostin C (Calbiochem, Milan, Italy) was dissolved in 0.5% DMSO and used at 0.2 μg per mouse. Vehicles used to dissolve drugs were tested for the absence of any effect on pain threshold in comparison with saline-treated and naïve mice.

Morphine nociceptive tolerance

Morphine tolerance was induced in mice with a 4-day scheme. The animals received 2 daily injections of morphine at 10:00 am and 8:00 pm. The individual doses were 10 mg/kg s.c. on day 1, 15 mg/kg s.c. on day 2, 20 mg/kg s.c. on day 3, and 30 mg/kg s.c. on day 4 according to a previous validated scheme (17).

Hot plate

Mice were placed inside a stainless steel container, which was set thermostatically at 52.5°C ± 0.1°C in a precision water-bath from KW Mechanical Workshop, Siena, Italy. We used a lower temperature (52.5°C instead of 54°C) to reveal potential, subtle alterations that may occur in basal thermal nociception. Reaction times (s) were measured with a stopwatch before and after administration of the investigated compounds. The endpoint used was the licking of the fore or hind paws. An arbitrary cut-off time of 60 s was adopted.

Western blot analysis

PAG samples from mice were homogenized in an homogenization buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2.5 mM EDTA, 2 mM NaPP, 4 mM PNFF, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 20 μg/ml leupeptin, 50 μg/ml aprotinin, and 0.1% SDS. The homogenate was centrifuged at 9,000 × g for 15 min at 4°C, and the low speed pellet was discarded. Protein concentration was quantified using Bradford's method (protein assay kit; Bio-Rad Laboratories, Milan, Italy). Membrane homogenates (10 μg) were separated on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (90 min at 120 V) using standard procedures. Membranes were blocked in PBST (PBS containing 0.1% Tween) containing 5% nonfat dry milk for 120 min. Following washings, blots were incubated overnight at 4°C with specific antibodies against PKCγ phosphorylated on Thr514 (pPKCγ, 1:1000 dilution) (Biosource, Camarillo, CA, USA); β-actin (1:1000 dilution) (Santa Cruz Biothechnology, Inc., CA, USA). After being washed with PBS containing 0.1% Tween, the nitrocellulose membrane was incubated with goat anti-rabbit horseradish peroxidase–conjugated secondary antisera (1:10,000) and left for 1 h at room temperature. Blots were then extensively washed according to the manufacturer's instruction and developed using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Milan, Italy). Exposition and developing time used was standardized for all the blots. Optical density measurements were performed by dividing the intensity of the bands by the intensity of the house-keeping protein β-actin, used as loading control. Measurements in control samples were assigned a relative value of 100%.

Statistical analyses

All experimental results are given as the mean ± S.E.M. One-way and two-way analysis of variance, followed, respectively, by the Tukey and Bonferroni post hoc test, were used for statistical analyses.

Results

SJW dose study in rodents

In the mouse hot plate test, morphine showed antinociceptive properties starting from the dose of 5 mg/kg, whereas lower doses were ineffective. The morphine-induced antinociceptive effect reached its maximum at 30 min after morphine administration, and thermal nociceptive thresholds returned to baseline values 60 min post-drug injection (Fig. 1A). Morphine elicited a peak antinociceptive response at 30 min post-drug injection, and thermal nociceptive thresholds returned to baseline values by 60 min post-drug injection (Fig. 1A). SJW was endowed with antinociceptive properties as well. Oral administration of a 10 mg/kg dose of SJW increased the pain threshold 60 min after injection, peaked at 90 min, and was still significant after 120 min. Lower doses were devoid of any effect (Fig. 1B). The co-injection of morphine with an ineffective SJW dose (1 mg/kg) potentiated morphine antinociceptive activity. SJW increased the licking latency values following the administration of an ineffective dose of morphine (2 mg/kg) (Fig. 1C) and potentiated the antinociceptive effect induced by morphine at 5 mg/kg (Fig. 1D). The response of the combination of morphine with SJW remained elevated significantly above that produced by morphine alone until the end of the test period. A shift to the left of the dose–response curve of morphine was observed after co-administration with a low dose of SJW, drastically reducing the dose of morphine necessary to

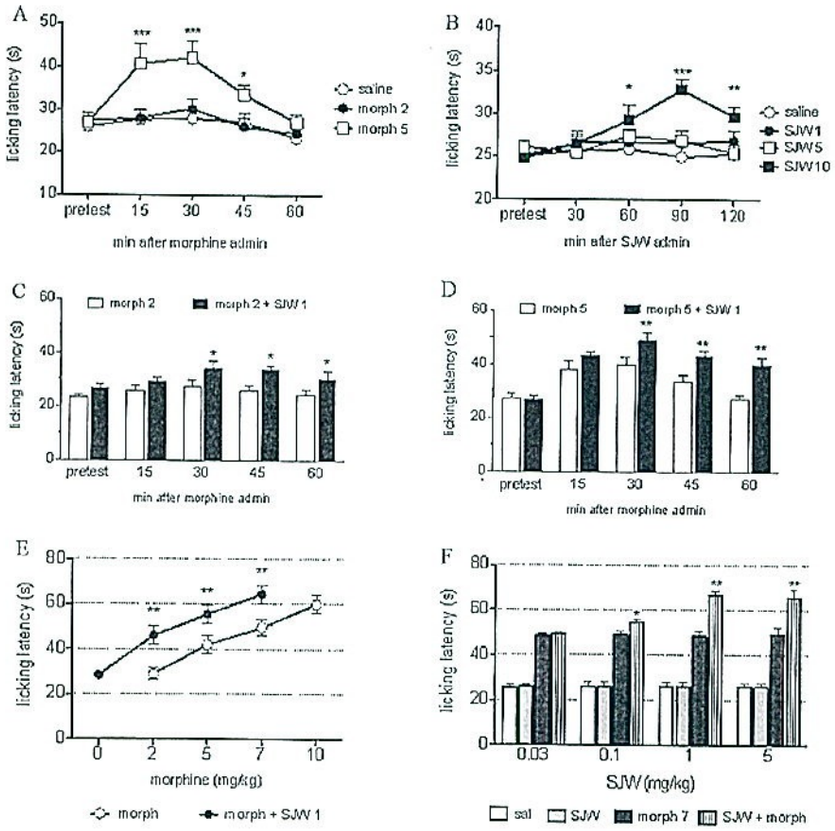


Fig. 1. Low doses of SJW increased morphine antinociception in the hot plate test. Antinociceptive activity of morphine [A: $F(2,135)49.19$, $P < 0.0001$] and SJW [B: $F(3,179)27.67$, $P < 0.0001$]; significant difference is presented as difference from the saline group at the corresponding time point: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, compared with the treated group. In panel C, an ineffective dose of SJW (1 mg/kg) rendered effective a dose of morphine (2 mg/kg) devoid of antinociceptive properties [$F(1,90)41.97$, $P < 0.0001$] and increased the antinociception induced by a morphine (5 mg/kg) effective dose [D: $F(1,90)42.78$, $P < 0.0001$]. Shift to the left of the dose–response curve of morphine by a very low dose of SJW is shown in panel E [$F(1,99)141.30$, $P < 0.0001$]. Dose–response curve of the morphine potentiating effect of SJW is represented in panel F [$F(3,144)662.30$, $P < 0.0001$]. Nociceptive testing in panels E and F was performed 30 min after morphine administration. Post hoc comparison in C – F: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. corresponding morphine-treated group.

reach the maximal antinociceptive effect (Fig. 1E). Dose–response experiments showed that lower doses of SJW (0.03 mg/kg) were unable to modify morphine antinociception and that no further potentiating activity was detected by increasing the SJW concentration (5 mg/kg) (Fig. 1F).

Co-administration of morphine and SJW did not alter motor coordination and spontaneous mobility (data not shown).

Human test

Eight health volunteers immersed forearm in circulating nociceptive hot water for 2 min and rated the intensity and unpleasantness of perceived pain. The mean pain intensities of all scores, registered every 30 s during 2-min arm immersion, are shown in Fig. 2 for each subject after morphine administration in presence or absence of SJW at low dose. The score was assessed on different days for the baseline, treatment with morphine alone and morphine co-administration with SJW. A post hoc power analysis was performed for the significant differences in pain scores. Total mean pain intensity score

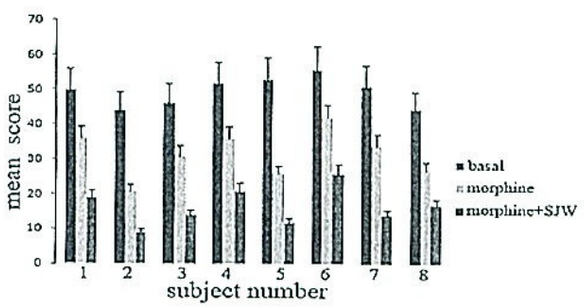


Fig. 2. Reported pain intensities in morphine-treated subjects co-administered with SJW. Mean pain score from repeated assessment of nociceptive response are reported for each single evaluated healthy volunteer as regards different treatment (no treatment, morphine, morphine/SJW co-treatment). One-way ANOVA for repeated measures yielded a significant main effect for morphine co-treatment with SJW as compared to morphine alone in decreasing the nociceptive score [$F(2, 24)21.7$, $P < 0.0001$].

was significantly different between single morphine and morphine co-administration with SJW indicating a better score when healthy subjects were administered with morphine in the presence of SJW.

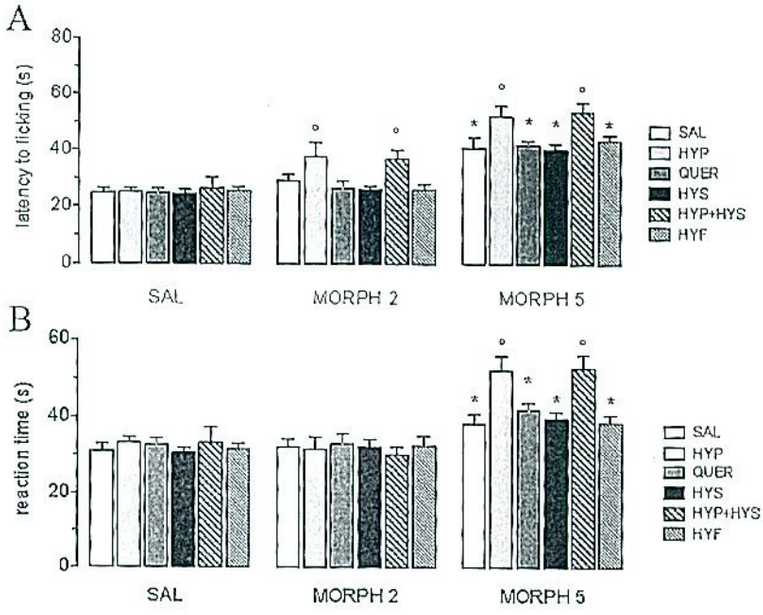


Fig. 3. Effect of oral administration of SJW components on morphine antinociception. In the hot plate [A: $F(5,59)3.18$, $P < 0.0001$] and in the cold plate [B: $F(5,59)6.99$, $P < 0.0001$] tests, hypericin (HYP) showed a potentiating profile similar to SJW. Conversely, quercetin (QUER), hyperoside (HYS), and hyperforin (HYF) were devoid of any effect. Nociceptive testing was performed 30 min after morphine injection. Post hoc Tukey test: $^{*}P < 0.001$, compared to saline-treated mice. $^{\circ}P < 0.001$ vs. morphine-treated group at the corresponding time point.

Differential involvement of SJW components in the potentiation of morphine analgesic efficacy

We investigated the effects produced by some of the main components of this herbal drug administered in a concentration corresponding to the content present in a 5 mg/kg preparation of SJW. The administration of hypericin augmented the morphine effect with a profile similar to SJW (Fig. 3A). Conversely, oral administration of the flavonoids quercetin, hyperoside, or hyperforin was devoid of any effect (Fig. 3A). Co-administration of morphine with hypericin and hyperoside did not modify the antinociceptive potentiation induced by morphine with hypericine alone (Fig. 3: A, B). Similar results were obtained in the cold plate test (Fig. 3B).

Potentiation of acute morphine thermal antinociception by hypericin component of SJW

Intracerebroventricular co-administration of hypericin to mice rendered antinociceptive an ineffective dose of morphine (2 mg/kg, Fig. 4A) and enhanced the thermal antinociception induced by morphine at antinociceptive doses of 5 mg/kg (Fig. 4B) and 7 mg/kg (Fig. 4C) in the hot plate test. Hypericin alone was devoid of any effect (Fig. 4D).

SJW and hypericin affect PKC phosphorylation

We conducted western blotting experiments *ex vivo* in the PAG area to detect how morphine co-administration with the SJW component hypericin affects the expression of the PKC isoform mainly involved in morphine potentiation. Phosphorylation of PKCγ was increased in rat PAG at 30 min after i.p. (intraperitoneally) morphine administration (5 mg/kg). Co-administration of intra-PAG hypericin with morphine completely reversed the pPKCγ overexpression in rat PAG (Fig. 5A). A similar result could be obtained by injecting calphostin C, a selective PKC-blocker, into rat PAG (Fig. 5A). Intra-PAG injection of hypericin combined with morphine at 5 mg/kg produced a thermal antinociceptive response largely above that produced by the alkaloid alone (Fig. 5B). Co-administration of intra-PAG calphostin C potentiated morphine antinociception with an antinociceptive profile similar to the hypericin one (Fig. 5B). CC and SJW alone did not induce any change on PKCγ phosphorylation (data not shown).

Effect of SJW on chronic morphine tolerance

The antinociceptive responses produced by increasing doses of morphine, administered twice daily for 4 days, in the hot plate test are shown in Fig. 6A. The administration of morphine on day 1 produced a maximal antinociceptive effect, but successive daily injections of morphine resulted in a progressive loss of the drug-induced antinociceptive response, which approached baseline value on day 4. Daily administration of hypericin alone produced a response comparable with that produced by saline (data not shown). Figure 6B illustrates the time course of the antinociceptive response on day 5. As shown, morphine did not produce any significant antinociceptive effect in comparison to the saline-treated control group. In sharp contrast, the response to the hypericin–morphine combination could maintain the

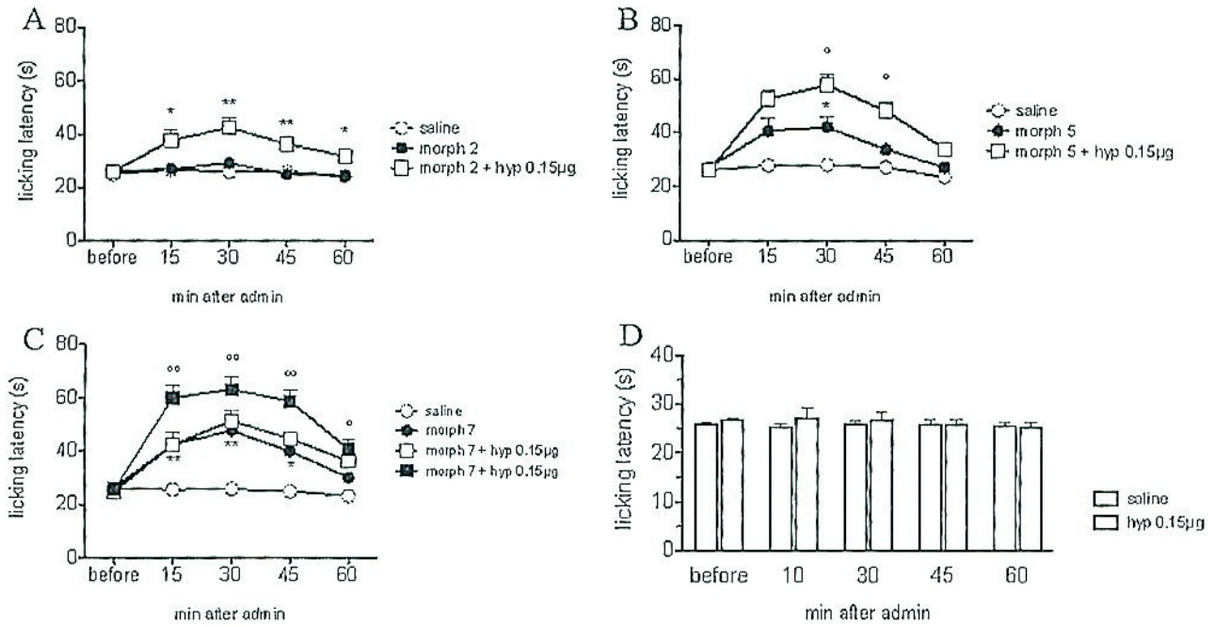


Fig. 4. Potentiating effect of i.c.v.-injected hypericin on morphine antinociception. A: i.c.v. administration of hypericin (hyp, 0.15 μg per mouse) rendered antinociceptive an ineffective dose of morphine (2 mg/kg) [$F(3,180)27.98$, $P < 0.001$]. Post hoc comparison: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. morphine-treated group at the corresponding time point. B, C: i.c.v. hypericin potentiated the antinociception induced by morphine at a dose of 5 mg/kg [$F(3,180)11.6$, $P < 0.001$] and 7 mg/kg [$F(4,225)103.8$, $P < 0.001$]. Post hoc comparison: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. saline; $^{\circ}P < 0.05$, $^{\circ\circ}P < 0.01$ vs. morphine-treated group at the corresponding time point. D: hypericin alone was devoid of any effect on mouse pain threshold.

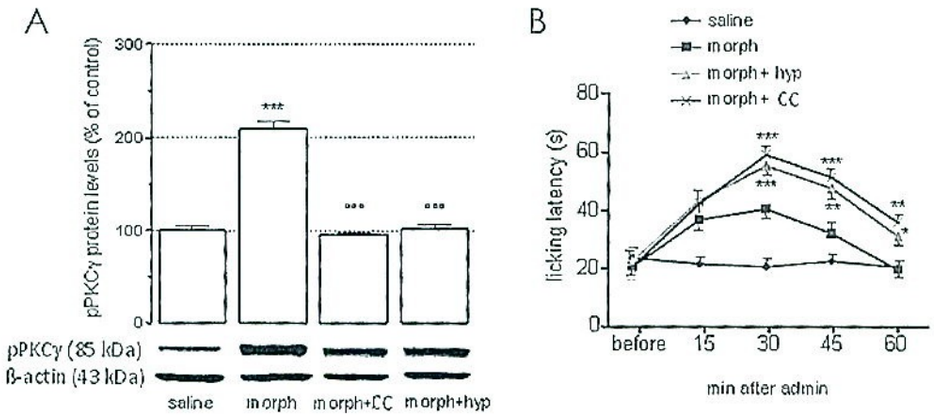


Fig. 5. Effect of hypericin on morphine induced PKCγ phosphorylation. Western blotting experiments performed in the PAG area showed that intra-PAG hypericin (hyp, 0.4 μg) prevented the increased phosphorylation of PKCγ induced by i.p. morphine (morph) administration at 5 mg/kg dose (A). Post hoc comparison: $^{***}P < 0.001$ vs. saline-treated group, $^{\circ\circ\circ}P < 0.001$ vs. morphine-treated group. In panel B, intra-PAG hypericin and calphostin C (CC) potentiated the thermal antinociception induced by morphine [$F(3,180)29.4$, $P < 0.001$]. Post hoc comparison: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. morphine-treated group at the corresponding time point.

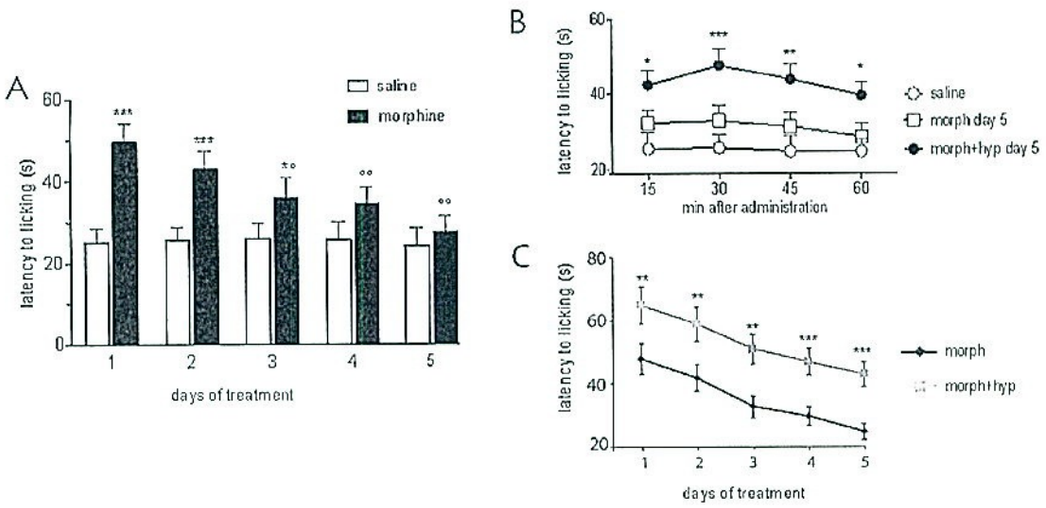


Fig. 6. Effect of hypericin on the chronic antinociceptive effect of morphine in the hot plate test. A) Time course of the antinociceptive effect of repeated administration of morphine delivered twice daily [$F(1,72)446.37$, $P < 0.0001$]. Nociceptive testing was performed 30 min after each injection. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ vs. saline-treated group; $^{\circ}P < 0.05$, $^{\circ\circ}P < 0.01$ vs. morphine effect on day 1. Time-course effect of morphine-saline and morphine-hypericin combination on day 5 (B) and is shown for each of the 5 days (at time 30 min) in animals that had received chronic treatment with these drugs [$F(2,108)119.74$, $P < 0.0001$]. Significant difference from morphine at the same time point: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; morph = morphine, hyp = hypericin.

antinociceptive effect of morphine as shown by licking latency values comparable to those obtained by morphine acute administration (Fig. 6C).

Discussion

Our findings show that SJW increases the antinociceptive effect of morphine in both naïve and morphine-tolerant animals. As an experimental model to measure the algogenic threshold, we chose the hot plate test that produces pain without inflammation. Nociception was evaluated considering the reaction time of the animal to a thermal stimulus. A significant increase of the licking latency values could be observed after morphine co-administration with a low dose of SJW in mice submitted to this test, drastically reducing the dose of morphine necessary to reach the maximal antinociceptive effect. When SJW low dose was co-administered with repeated treatment with morphine, the antinociceptive response to morphine was not modified in the tolerant animals, establishing that SJW could decrease opioid requirement in animals exhibiting chronic nociceptive tolerance to the alkaloid. These results could be translated to humans. Consistent with ethical requirements and therefore limited to the acute administration, SJW was co-administered with the morphine analgesic dose to a small sample of healthy volunteers at the same low dose used in animal experiments. The efficacy of pain inhibition was evaluated by heat stimuli, and the results showed that efficacy was significantly increased when healthy subjects were treated with morphine in the presence of SJW as compared to morphine alone. These results indicate that in clinical practice, SJW could reduce the dose of morphine while obtaining the same analgesic effect.

SJW dried extract contains numerous active components (18). The effects produced by the main constituents were investigated in order to identify the component responsible for the potentiation of morphine antinociception. The doses used were estimated based on the percentages of each single constituent usually present in the SJW dose administered in our experiments. Among the numerous SJW components, only purified hypericin increased morphine antinociception in both animal models of acute thermal nociception and in nociceptive tolerance with an efficacy and time course similar to that of SJW. Conversely, hypericin alone was devoid of any effect. We here report the morphine-potentiating activity of hypericin, suggesting it as the component of SJW that underlies morphine analgesia potentiation.

Notably, in our experiments, relatively low dose of SJW significantly potentiated the analgesic effect of morphine in rodents and humans. It has been reported that tricyclic antidepressant drugs possess clinical efficacy in the treatment of chronic pain states such as

adjuvant analgesic. However, it would not be rational that SJW enhances the analgesic effect of morphine by having an antidepressant effect because the doses used in these experiments would not be sufficient to exert antidepressant action in both rodents and humans (19). SJW is also endowed with antinociceptive properties in animal models (20). The potentiating effect shown by this herbal medicine was not secondary to its antinociceptive activity, since the increase of the morphine analgesic effect was produced at doses devoid of any capability to modulate the pain threshold in rodents.

It has been reported that SJW increases the activity of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) enzyme (21). Several reports have documented decreased blood/plasma levels of CYP3A4 substrates, such as indinavir and cyclosporin A, in patients concomitantly taking SJW, finally reducing the drug effect considerably. In a previous study, the concentrations of morphine in plasma and brain after s.c. injection of morphine in mice pretreated with SJW were not significantly different from those in morphine-treated mice without this herbal drug (22). Therefore, it can be excluded that SJW could alter morphine pharmacodynamics.

Among the PKC family, the gamma isotype of PKC (PKCγ) is unique amongst the members of classical the PKC family in its exclusive neuronal distribution in the CNS and appears to be the isoform with a prominent role in the modulation of pain perception (23). In our previous investigations, we could show that PKCγ downregulation could potentiate morphine analgesia (9). In the present experiments, morphine administration to mice induced the phosphorylation of PKCγ in PAG, a critical brain area in processing pain signals and a primary site of action of many analgesic compounds (24). When the SJW main component hypericin was injected directly into the PAG of rats administered with morphine, PKCγ phosphorylation was prevented in this brain area and the thermal antinociceptive response was enhanced, further supporting that PAG is directly implicated in SJW-induced morphine potentiation through PKCγ activation. SJW has been shown to play also the role of a specific PKC inhibitor as previously demonstrated according to enzyme assays performed on rat brain (10) and a previous study on cultured cells supported the idea that SJW might competitively bind to the regulatory domain of PKC (11). It is therefore conceivable that SJW plays this role in morphine potentiation.

Opioids, and particularly morphine, are considered to be the "gold standard" for pain management. However, several serious side effects associated with repeated and/or increasing morphine doses, including constipation, sedation, respiratory depression and nausea, represent substantial drawbacks to its use. As far as we can discuss ethical terms, pharmacological, and clinical studies, morphine remains the most effective and efficient (in terms of cost-effectiveness) for pain therapy in cancer patients and palliative therapy in general. Nevertheless, it is still alive the sense of anxiety in patients about the effects of morphine that prevents adequate access to pain treatment. Among the main reasons for this distrust survival, the first is the fear of the phenomenon of habituation, a risk that according to the literature remains below 0.01%, but it scares both the patients and sometimes professionals. Otherwise, it is therefore a typical case of full trust that makes choosing a herbal natural cure possible because one thinks that what is natural is always good. The World Health Organization has estimated that 80% of people in the advanced nations rely on herbal medicines for some of their health care. Complement morphine with a natural substance as SJW might induce a better compliance in patients submitted to palliative therapy.

Diminished opioid efficacy during the course of opioid therapy has been considered a sign of pharmacological opioid tolerance. Thus, opioid dose escalation is a logical approach to restoring effectiveness of opioid analgesia. Our experiments offer reason to hope that this practice might be revisited using morphine in combination with SJW and its component hypericin as a safer therapeutic perspective for decreasing opioid requirements.

Acknowledgments

This work was supported by MiUR Grants, PAR project.

Conflicts of Interest

The authors of the present paper declare that no financial or personal relationship with other people or organization inappropriately influenced our work.

References

1 Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27:520–523.

2 Mao J, Gold MS, Backonja MM. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. J Pain. 2011; 12:57–166.

3 Milne B, Sutak M, Cahill CM, Jhamandas K. Lowdoses of α2-adrenoceptor antagonists augment spinal morphine analgesia and inhibit development of acute and chronic tolerance. Br J Pharmacol. 2008;155:1264–1278.

4 Brenchat A, Ejarque M, Zamanillo D, Vela JM, Romero L. Potentiation of morphine analgesia by adjuvant activation of 5-HT7 receptors. J Pharmacol Sci. 2011;116:338–391.

5 Campos AR, Santos FA, Rao VS. Ketamine-induced potentiation

of morphine analgesia in rat tail-flick test: role of opioids, α2-adrenoceptors and ATP-sensitive potassium channels. Biol Pharm Bull. 2006;29:86–89.
6 Sánchez-Fernández C, Nieto FR, González-Cano R, Artacho-Cordón A, Romero L, Montilla-García A, et al. Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by σ1 receptor inhibition: Role of peripheral σ1 receptors. Neuropharmacology. 2013;70:348–358.
7 Carstensen M, Moller AM. Adding ketamine to morphine for intravenous patient-controlled analgesia for acute postoperative pain: a qualitative review of randomized trials. Br J Anaesth. 2010;104:401–406.
8 Subramaniam K, Subramaniam B, Steinbrook RA. Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review. Anesth Analg. 2004;2:482–495.
9 Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. Pain. 2006;123:194–305.
10 Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. Biochem Biophys Res Commun. 1989;165:1207–1212.
11 Kocanova S, Hornakova T, Hritz J, Jancura D, Chorvat D, Mateasik A, et al. Characterization of the interaction of hypericin with protein kinase C in U-87 MG human glioma cells. Photochem Photobiol. 2006;82:720–728.
12 Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. Br J Pharmacol. 2010;160:1577–1579.
13 Feinstein A. Sample size and the other side of statistical significance. In: Clinical Biostatistics. C.V. Saint Louis; Mosby Company: 1977. pp. 320–335.
14 Staud R, Vierck CJ, Robinson ME, Price DD. Spatial summation of heat pain within and across dermatomes in fibromyalgia patients and pain-free subjects. Pain. 2004;111:342–350.
15 Ing Lorenzini K, Daali Y, Dayer P, Desmeules J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of opioids in healthy human volunteers. A minireview. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012; 110:219–226.
16 Ghelardini C, Galeotti N, Vivoli E, Norcini M, Zhu W, Stefano GB, et al. Molecular interaction in the mouse PAG between NMDA and opioid receptors in morphine-induced acute thermal nociception. J Neurochem. 2008;105:91–100.
17 Way EL, Loh HH, Shen FH. Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. J Pharmacol Exp Ther. 1969;167:1–8.
18 Greeson JM, Sanford B, Monti DA. St. John's wort (hypericum-perforatum): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. Psychopharmacology. 2001;153: 402–414.
19 Kasper S, Caraci F, Forti B, Drago F, Aguglia E. Efficacy and tolerability of Hypericum extract for the treatment of mild to moderate depression. Neuropsychopharmacology. 2010;20: 747–765.
20 Galeotti N, Vivoli E, Bilia AR, Bergonzi MC, Bartolini A, Ghelardini C. A prolonged Protein Kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's Wort in mice. J Pain. 2010;11:149–159.
21 Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, et al. St John's wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. Clin Pharmacol Ther. 2000;68:598–604.
22 Uchida S, Hirai K, Hatanaka J, Hanato J, Umegaki K, Yamada S. Antinociceptive effects of St. John's wort, Harpagophytum procumbens extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. Biol Pharm Bull. 2008;31:240–245.
23 Velazquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. Pharmacol Res. 2007; 55:578–689.
24 Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. Annu Rev Neurosci. 1984;7:309–338.