

INFLUÊNCIA DO ESTEVIOSÍDIO SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1 *IN VITRO*

Iohana Bianca Pagnoncelli (PIBIC/CNPq), Meliana Borilli Pereira, Silvio C. da Costa, Cecília E. M. da Costa, Sidney Barnabe (Orientador), e-mail: sbperes@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Fisiologia Endócrina

Palavras-chave: obesidade, adipogênese, *Stevia rebaudiana*

Resumo:

O Esteviosídeo é um glicosídeo extraído da planta *Stevia rebaudiana* e tem sido utilizado comercialmente como uma alternativa menos calórica de adoçante. Além do potencial edulcorante, os glicosídeos da *Stevia sp* tem sido investigados por serem possíveis agentes moduladores do tecido adiposo e importantes agentes no combate à obesidade e *Diabetes mellitus* tipo 2. Nesse estudo, a citotoxicidade do Esteviosídeo (Stv) é investigada por meio da exposição do composto à pré-adipócitos de linhagem 3T3L1 às concentrações de 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1, 10, 100, e 500 µM e 1 mM por 24h (exposição aguda) e 48h (exposição crônica), bem como maturação de pré-adipócitos em adipócitos sob influência do esteviosídeo. Embora a exposição aguda tenha aumentado a viabilidade celular nas concentrações de 100 e 500 µM e diminuído a viabilidade à 10 nM, a exposição crônica ao esteviosídeo parece aumentar a viabilidade celular à 10 nM. Em ambos os casos, a concentração de 1 mM diminui a viabilidade celular, sendo um indicativo de que esta concentração é citotóxica nas condições de cultura do experimento.

Introdução

Atualmente, a obesidade tem status de epidemia mundial (OMS, 2005). Indivíduos obesos apresentam aumento de 50 a 100% de risco de mortalidade (Stein & Colditz, 2004; Sullivan et al., 2005). Diante desse cenário as opções de tratamento da obesidade, especialmente as farmacológicas, visam redução da massa adiposa. Entretanto, muitos dos medicamentos disponíveis no mercado estão associados a diversos efeitos colaterais, sendo retirados do mercado (Oben et al, 2006). Por conta disso, pesquisadores têm buscado abordagens alternativas que possam ajudar no tratamento da obesidade.

Desde a primeira descrição feita por Moisés Bertoni em 1899, a *Stevia rebaudiana* vem sendo investigada sob vários aspectos, principalmente com o

objetivo de viabilizar a sua utilização para a produção de adoçantes naturais não calóricos, bem como um estabilizador da glicemia em diabéticos, tendo sido o médico paraguaio Ovídio Miguel o primeiro a constatar efeitos benéficos da *Stevia* sp no tratamento de pacientes diabéticos (Miguel, 1953). O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A (RebA) são os glicosídeos de maior importância da *Stevia* sp, sendo que o esteviosídeo, por estar presente em maior quantidade (9,1% contra 3,8% de RebA), tem-se destacado comercialmente e é o produto mais conhecido e estudado da estevia (Crammer & Ikan, 1986). Entretanto, não há estudos que tenham avaliado o efeito anti-adipogênico do esteviosídeo em pré-adipócitos.

Materiais e métodos

Teste de viabilidade celular. Pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados e mantidos em DMEM suplementado com 10% de CS mantidos em estufa (5% CO₂, 37 °C) até atingirem 75% de sua confluência. Logo após, um grupo de pré-adipócitos foi cultivado em placa de 96 poços na presença de concentrações crescentes de Esteviosídeo (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1, 10, 100, e 500 µM e 1 mM, mais um grupo controle que não foi exposto ao composto) por um período de 24h, para determinação da viabilidade celular sob exposição aguda ao composto, enquanto outro grupo foi cultivado sob as mesmas condições, mas por um período de exposição de 48h após a diferenciação dos pré-adipócitos, para determinação da viabilidade celular sob exposição crônica ao Esteviosídeo. A seguir, as células receberam 5 mg/ml de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) e foram incubadas durante 2 horas. Os cristais de formazan púrpura gerados na reação foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO), sendo a seguir seus valores de absorbância determinados a 540nm.

Diferenciação dos pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1. Pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados em DMEM suplementado com 10% de soro bovino mantidos em estufa 5% CO₂ a 37°C até atingirem a confluência (dia -2). Após 2 dias de confluência, as células foram estimuladas a se diferenciarem (dia 0) mediante seu tratamento com coquetel pró-adipogênico composto de 0,5 mM de 3-isobutyl- 1-methylxanthine, 1 µM de dexametasona e 1,67 µM de insulina e DMEM acrescido de soro bovino fetal-FBS 10%. Após 48 horas, o meio foi trocado por DMEM (10% FBS) contendo 0,4 µM de insulina, sendo renovado a cada 2 dias. A diferenciação ocorreu na presença de esteviosídeo (10nM, 100nM, 1µM, 10µM, 100µM). O grupo controle não foi exposto ao composto.

Resultados e Discussão

Embora a literatura descreva um efeito insulinomimético do esteviol (Bhasker, Madhav et al. 2015), não há estudos na influência do composto em pré-adipócitos. Os resultados obtidos a partir do ensaio à exposição aguda (24h) podem ser observados nas figuras abaixo:

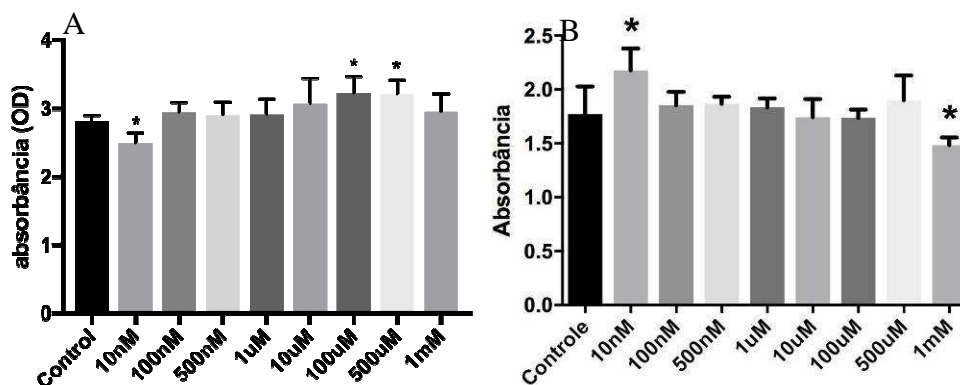


Figura 1: Resultados do teste de viabilidade celular de pré-adipócitos (3T3-L1) após exposição 24h (A) e 48h (B) de exposição à diferentes concentrações do composto Esteviosídeo. Dados mostrados como médio \pm desvio padrão. $n=3$. As diferenças foram consideradas significantes para $p<0,05$.

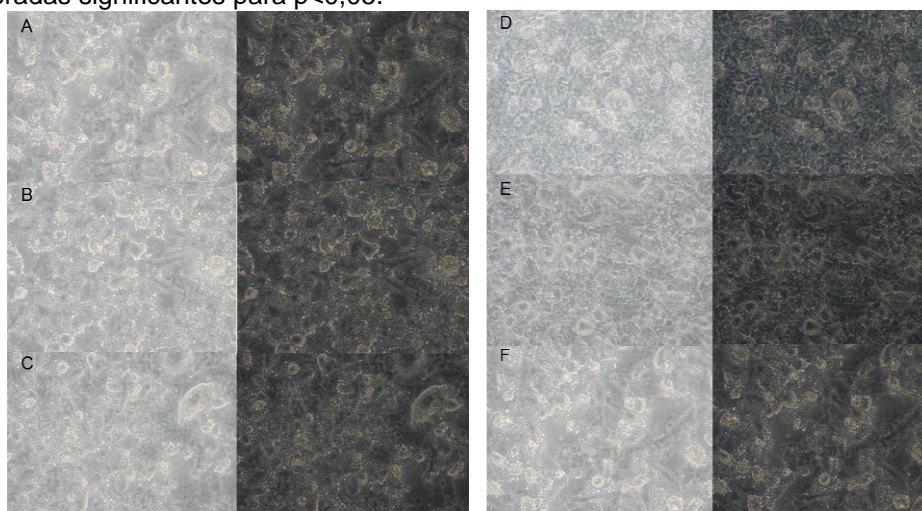


Figura 2: Fotomicrografia de células 3T3L1 após diferenciação e exposição crônica ao Esteviosídeo nas concentrações 10 nM (B), 100 nM (C), 1 μ M (D), 10 μ M (E), 100 μ M (F), e controle (A), sem esteviosídeo. Os parâmetros contraste e brilho das imagens das colunas à direita foram alterados para facilitar a visualização das zonas refringentes (gotículas lipídicas). Todas as imagens foram capturadas em microscópio óptico no aumento de 400x.

Ao analisar a figura 1 é possível perceber que durante o ensaio agudo – exposição ao composto durante 1h – houve redução significativa na viabilidade celular das células expostas à concentração de 10nM, quando comparada ao controle. Contudo, isso não foi observado nas demais concentrações. Na verdade, houve de fato um aumento na viabilidade celular em todas as demais concentrações, sendo significativo em 100 e 500 μ M. Uma sutil diminuição do aumento da viabilidade celular foi observada sob a concentração de 1mM, podendo ser um indicativo para citotoxicidade. Como o composto Esteviosídeo é conhecido na literatura em estudos *in vivo* por diminuição do peso de animais, o aumento da viabilidade celular dos pré-adipócitos não era um resultado esperado.

Curiosamente, uma inversão dos efeitos foi observada quando as células continuaram a ser expostas ao composto: houve aumento significativo

na viabilidade celular à 10nM, seguido de diminuição, embora não significativa, nas demais concentrações, exceto em 500uM (na qual observa-se um sutil aumento da viabilidade) e 1mM, na qual a viabilidade celular diminuiu significativamente. A induzida maturação celular pareceu não sofrer influência da exposição ao esteviosídeo.

Conclusões

O esteviosídeo parece, no geral, não apresentar citotoxicidade relevante em concentrações menores que 1mM em células 3T3L1 nas condições estudadas nem modificar a diferenciação de pré-adipócitos.

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, COMCAP.

Referências

BHASKER, S., H. MADHAV AND M. CHINNAMMA. Molecular evidence of insulinomimetic property exhibited by steviol and stevioside in diabetes induced L6 and 3T3L1 cells. **Phytomedicine** **22**(11): 1037-1044, 2015

CRAMMER, B. & IKAN, R. Sweet glycosides from the stevia plant. **Chemistry in Britain**, London, 22, 915-918, 1986.

MIGUEL, O. Un nuevo hipoglicemiante oral. **Revista Médica del Paraguay**, 7, 200-202, 1966.

MIGUEL, O. Studios sobre el steviosideo. **Tribuna Universitária**, 18, 34-35, 1953.

OBEN, J.; KUATE, D.; AGBOR, G.; MOMO, C.; TALLA, X. The use of a *Cissus quadrangularis* formulation in the management of weight loss and metabolic syndrome. **Lipids in Health and Disease**, 2006.

STEIN, C. J., COLDITZ, G. A. The epidemic of obesity. **The Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, 89(6), 2522-2525, 2004.

SULLIVAN, P. W., MORRATO, E. H., GHUSHCHYAN, V., WYATT, H. R. & HILL, J. O. Obesity, inactivity, and the prevalence of *diabetes* and *diabetes*-related cardiovascular comorbidities in the U.S., 2000-2002. **Diabetes Care**, 28(7), 1599-1603, 2005.