

EFEITOS DO ISOSTEVIOL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE PRÉ ADIPÓCITOS 3T3-L1 *IN VITRO*

Meliana Borilli Pereira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Iohana B. Pagnoncelli, Silvio C. da Costa, Cecilia E. M. da Costa, Sidney Barnabé Peres, e-mail: sbperes@gmail.com

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

Ciências Biológicas

Palavras-chave: Stevia Rebaudiana, adipogênese, obesidade

Resumo:

A obesidade está relacionada intimamente ao surgimento de doenças (comorbidades) que causam grande mortalidade. Diante deste cenário, têm-se procurado isolar substâncias com potencial farmacológico que ajudem no tratamento da obesidade. A *Stevia rebaudiana*, planta nativa da região limítrofe Brasil e Paraguai, é uma fonte de glicosídeos como o esteviosídeo, e o rebaudiosídeo A, ambos já avaliados quanto. Entretanto, outro composto extraído da folha, o Isosteviol, ainda não teve seu papel biológico determinado de maneira satisfatória. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo determinar os efeitos do Isosteviol sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 mantidos em cultura celular. Para tal os adipócitos foram expostos a concentrações crescentes de isosteviol, por 1 ou 48 horas visando avaliar o efeito citotóxico do composto (ensaio com MTT) bem como determinar a adipogênese na presença e ausência do composto. O composto exibiu efeito citotóxico na exposição de 1h na concentração de 100 nM enquanto que na exposição de 48 horas nas doses de 1, 10, 20, 50 e 100 nM. No que diz respeito ao processo de adipogênese, as células foram induzidas a diferenciação em meio contendo concentrações crescentes de isosteviol, havendo potente efeito inibidor em todas as concentrações testadas. Desta forma, o isosteviol foi capaz de inibir a adipogênese em células 3T3-L1, porém apresenta efeito citotóxico.

Introdução

Atualmente, a obesidade tem status de epidemia mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2005 havia cerca de 1,6 bilhões de adultos e 20 milhões de crianças acima do peso, sendo 400 milhões desses adultos obesos (IMC > 30). Indivíduos obesos apresentam aumento de 50 a 100% de risco de mortalidade, pela associação entre excesso de peso e doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 e câncer. O excesso de peso e a obesidade resultam da interação entre diversos fatores, como genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. (Stein & Colditz, 2004).

Diante desse cenário as opções de tratamento da obesidade, especialmente as farmacológicas, visam a redução da massa adiposa. Entretanto, muitos dos medicamentos disponíveis no mercado estão associados a diversos efeitos colaterais, sendo invariavelmente, retirados do mercado (Oben, et al, 2006). Por conta disso, pesquisadores têm buscado nas plantas alternativas que possam ajudar no tratamento contra obesidade, como a *Stevia rebaudiana*, nativa de regiões subtropicais do Brasil e do Paraguai (Rizzo et al., 2013). O esteviosídeo é um glicosídeo diterpenóide que ocorre abundantemente nas folhas de *Stevia rebaudiana Bertoni*, e tem sido amplamente utilizado como substituto do açúcar em países como Coréia, Japão e Brasil. A sua hidrólise com ácidos minerais gera isosteviol, o qual possui propriedades anti-hipertensivas, anti-hiperglicêmicas, anti-inflamatórias, diuréticas, neuro e cardioprotetoras (Khaybullin et al., 2014; Ukiya et al., 2013).

Materiais e métodos

1. Estudos *in vitro* com células 3T3-L1

1.1. Teste de Viabilidade Celular. Pré-adipócitos clonados a partir de embriões desagregados de camundongos (células Swiss 3T3-L1) foram cultivados e mantidos em DMEM suplementado com 10% de CS mantidos em estufa 5% CO₂ a 37°C. Logo após, os pré-adipócitos foram cultivados na presença de concentrações crescentes de Isosteviol (1, 10, 20, 50 e 100 nM) por um período de 1 ou 48 horas para determinação de sua viabilidade celular. Após este período as células receberam 5 mg/ml de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio brometo (MTT) e foram incubadas durante 1 hora. Os cristais de formazan púrpura gerados na reação foram, em seguida, dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO), sendo a seguir seus valores de absorvância determinados a 540 nm.

1.2. 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 MIX (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 para o mesmo DMEM (10% FBS) contendo 0,4 µM de insulina, sendo este renovado a cada 2 dias. A diferenciação ocorreu na presença de duas concentrações de Isosteviol, ou seja, a mínima e a máxima usadas nos testes de citotoxicidade. Um grupo controle diferenciado sem o composto foi usado como placebo.

2. Análise Estatística.

Os dados obtidos foram analisados por teste *t*-student sendo consideradas significativas os valores de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Ao analisar os dados da figura 1 obtidos a partir do ensaio agudo – exposição ao composto durante 1 hora – é possível estabelecer que a concentração que mostrou uma redução significativa na viabilidade celular, quando comparada ao controle, foi a de 100nM. Desta forma, levando em consideração apenas estes resultados seria possível a utilização da concentração de 50nM para a realização das próximas etapas do projeto.

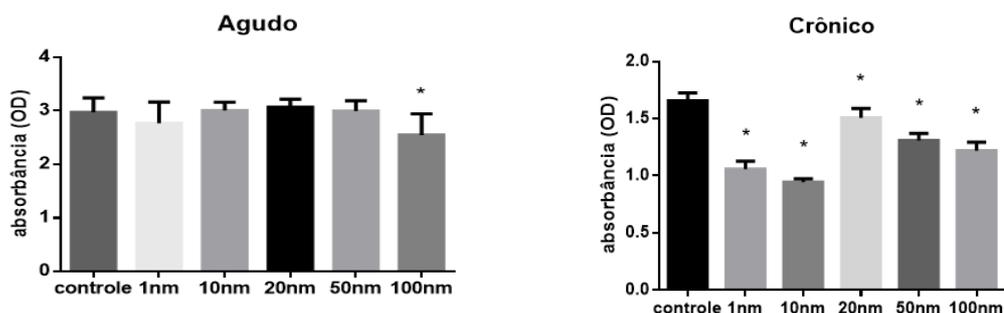


Figura 1 – Resultados do ensaio agudo e crônico com Isosteviol. Dados mostrados como médio \pm desvio padrão. n=3

Entretanto, o ensaio crônico ocasionou redução significativa na viabilidade celular em todas as concentrações testadas, quando comparadas com o controle. Este efeito crônico na viabilidade celular pode ser causado por duas razões: aumento da citotoxicidade e/ou diminuição da proliferação celular.

Os resultados obtidos após a diferenciação dos pré-adipócitos na presença do Isosteviol foram analisados qualitativamente através de imagens obtidas em microscópio ótico no oitavo dia da diferenciação. Ao analisar as imagens é possível observar que as células controle (A) sofreram o processo de diferenciação completo, enquanto que as células induzidas a diferenciação em meio contendo 100 nM de isosteviol (B) sofreram inibição significativa do processo adipogênico, constatada pela diminuição da quantidade de células esféricas e com conteúdo lipídico multilocular, a qual também pode ser observada nas células incubadas com a concentração de 1nM (C).



Figura 2 – A) Adipócitos controle; B) Adipócitos com 100nM de Isosteviol; C) Adipócitos com 1nM de Isosteviol. Imagens obtidas em microscópio ótico. Ampliação de 400x.

Após a análise dos resultados é possível perceber o potente efeito inibidor do isosteviol sobre a adipogênese que o Isosteviol possui, uma vez que mesmo uma concentração extremamente baixa foi capaz de inibir significativamente o processo de diferenciação dos pré-adipócitos. Além do efeito inibidor da adipogênese, é importante lembrar do efeito citotóxico que concentrações altas do Isosteviol possuem, o qual deve ser levado em consideração na sua aplicação prática deste como um composto com potencial farmacológico no combate a obesidade.

Conclusões

É indubitável o potente efeito anti-adipogêncio que o Isosteviol possui sobre as células 3T3-L1, contudo, é necessário considerar o efeito citotóxico que o composto possui. Desta forma, novos estudos devem ser realizados para determinar a dose exata não citotóxica, e para uma melhor análise dos efeitos anti-adipogênicos do Isosteviol.

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto e ao meu orientador pela confiança e pelo aprendizado neste ano de pesquisa.

Referências

- STEIN, C. J., COLDITZ, G. A. The Epidemic of Obesity. **J Clin Endocrinol Metab**; v. 89, n.6, p. 2522-2525, 2004.
- 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**, v. 5, n. 24, 2006.
- RIZZO, B., ZAMBONIN, L., ANGELONI, C., et al., Steviol Glycosides Modulate Glucose Transport in Different Cell Types. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- KAYBULLIN, R. N., ZHANG M., FU, J., LIANG, X., LI, T., KATRITZKY, A. R., et al. Design and Syntesis of Isosteviol Triazole Conjugates for Cancer Therapy. **Molecules** v.19, p.18676-18689, 2014.
- UKIYA, M., SAWADA, S., KIKUCHI, T., KUSHI, Y., FUKATSU, M., AKIHISA, T. Cytotoxic and Apoptosis Inducing Activities of Steviol and Isosteviol Derivatives Against Human Cell Lines. **Chemistry & Biodiversity** v. 10, p.177-188, 2013.