

DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA CAFEÍNA E CAFEÍNA COM ALGINATO SILOXANETRIOL EM ADIPÓCITOS HUMANOS OBTIDOS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO

LOPES, Patricia Santos¹, LUCO, Dayane Piffer², OLIVEIRA, Pedro Gonçalves³,
MATHOR, Monica Beatriz⁴, LEITE-SILVA, Vânia Rodrigues¹

¹Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, Diadema SP, Brasil;

²University of São Paulo, São Paulo, SP, Brasil;

³Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP, Brasil;

⁴IPEN/CNEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil.

e-mail de contato: **patricia.lopes@unifesp.br**

Resumo

A utilização de modelos animais para testes nas indústrias cosmética e farmacêutica vem sendo bastante questionada, tanto pela dor e desconforto causados, quanto pelas diferenças fisiológicas entre animais e humanos, as quais, causam respostas nem sempre coincidentes com a resposta humana. O uso de adipócitos humanos é uma alternativa viável para a avaliação da ação de ativos na redução de gordura reduzindo a utilização de animais para testes de segurança e eficácia de cosméticos e medicamentos em geral. O lipoaspirado foi adquirido de pacientes do sexo feminino submetidas a lipoaspiração, sendo o isolamento de células tronco mesenquimais (CTM) realizado por técnicas mecânicas. As células isoladas foram submetidas a processo de diferenciação para obtenção de adipócitos, os quais foram utilizados nos experimentos de citotoxicidade. Foram avaliadas quatro concentrações de cafeína (30, 15, 7,5, 3,75 mg/mL) e de cafeína com Alginato Siloxanetriol (50, 25, 12,5, 6,25 mg/mL), em placas de 96 poços, incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por meio do corante vital Vermelho Neutro em leitora de Microplacas (540nm). A fotomicrografia dos poços revelou que as concentrações mais elevadas da cafeína reduzem os grânulos de gordura no interior dos adipócitos, e que estas mesmas concentrações podem levar ao decréscimo da viabilidade celular. Com relação à cafeína com Alginato Siloxanetriol, a viabilidade celular é maior, mesmo em concentrações mais altas (70%). Este fato se deve a menor concentração efetiva de cafeína presente no ativo. Ressalta-se que, embora os resultados sejam positivos, os mesmos foram obtidos com o contato direto do ativo com as células, sendo necessário, portanto, estudos que mimetizem a permeação destes mesmos ativos na pele, chegando até as camadas subcutâneas onde estão alojados os adipócitos, desta forma reduzindo a toxicidade e comprovando a efetividade da cafeína como ativo redutor de gordura.

Palavras chaves: cafeína, adipócitos, mesenquimais, citotoxicidade

1- Introdução

No mercado cosmético, vários produtos utilizam a substância pura ou modificada da cafeína para tratamento estético contra a celulite (hidrolipodistrofia ginoide). Essa alteração estética é um sistema complexo, que envolve as linfas e a microcirculação, caracterizando-se pela presença de depressões na pele, assemelhadas à textura de “casca de laranja”, as quais são observadas mais comumente nas coxas e nádegas das mulheres (RAWLINGS, 2006)

A cafeína é um composto químico de fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$ muito utilizado para tratamentos estéticos da celulite. Trata-se de um alcaloide do grupo das xantinas, designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina. É largamente utilizada como um potencializador da resposta lipolítica, pois inibe a fosfodiesterase, que degrada o AMPc (TARNOPOLSKY 1989). Além disso, estudos *in vitro* têm revelado a redução no tamanho dos adipócitos quando em contato com a cafeína, (RAMALHO & CURVELO, 2006).

Artigos mostram que a cafeína pura tem dificuldade em atravessar a barreira cutânea, etapa limitante da penetração. De acordo com Rubio *et al.* (2011), por volta de 95% da cafeína pura permanece sobre a superfície da pele, sendo mantida a função da barreira cutânea. Em ensaios *in vitro*, a penetração transfolicular permitiu maior passagem da cafeína para as regiões epidérmicas (51%) e dérmicas (63,9%) (TRAUER *et al.*, 2008). Ainda, a absorção percutânea depende de muitos fatores: características físico-químicas, tamanho da molécula, coeficiente de partição, solubilidade e atividade termodinâmica, entre outros (WILLIAMS, 2003).

No sentido de ultrapassar o estrato córneo, que constitui a principal barreira à penetração da cafeína, e atingir o tecido subcutâneo, inúmeras propostas relacionadas aos fatores físico-químicos da cafeína têm sido apresentadas, como por exemplo, o aumento de solubilidade, da estabilidade e/ou de permeação cutânea para, por fim, atingir a camada subcutânea para cumprir com a sua atividade lipolítica. Entretanto, há poucos estudos que apontam quais são os níveis de permeação (porcentagem que atinge em cada camada da pele) da cafeína.

Visando avaliar novos métodos para aumentar a permeação cutânea da cafeína, é necessário, em um primeiro momento avaliar a ação do ativo sobre seu principal alvo, ou seja, os adipócitos, verificando seu efeito biológico e tóxico. Assim, o presente estudo

avaliou a ação da cafeína e da cafeína com Alginato Siloxanetriol diretamente sobre adipócitos obtidos por meio da diferenciação *in vitro* de células mesenquimais humanas obtidas de lipoaspirado.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi determinar a citotoxicidade da cafeína e cafeína com Alginato Siloxanetriol em adipócitos diferenciados a partir de células mesenquimais humanas visando a subsequente montagem de um sistema tridimensional equivalente a pele humana para testar potenciais métodos de aumento da permeação da cafeína em modelos *in vitro*.

3. Material e Métodos

Para o preparo das amostras, foram solubilizados 3% (p/v) de cafeína anidra e 5% (p/v) de cafeína com Alginato Siloxanetriol em meio específico para adipócitos (descrito a seguir). Foram testadas 4 concentrações de cafeína (30, 15, 7,5, 3,75 mg/mL) e de cafeína com Alginato Siloxanetriol (50, 25, 12,5, 6,25 mg/mL).

As células mesenquimais derivadas de gordura (ADSC) foram isoladas como descrito previamente por Chung (2013). Resumidamente, os lipoaspirados foram lavados e tratados com 0,075% de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich) em DMEM (Gibco) durante 1 hora a 37°C em banho com agitação suave a cada 5 min. A digestão por colagenase foi então inativada pela adição de um volume igual de meio padrão de cultura de células (DMEM – Low Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone: Fetal Clone III) e 1 % de penicilina/estreptomicina (todos da marca Gibco)). A fração do estroma vascular foi sedimentada por meio de centrifugação a 1200g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o botão celular ressuspensionado e submetido a um filtro de células de 100 µm para remoção dos fragmentos de tecido não digeridos. As células foram novamente centrifugadas e o botão celular ressuspensionado em meio padrão de cultura de células a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. As ADSC's foram cultivadas até à confluência e passadas com tripsina a 0,05%, sendo utilizadas até à passagem 4 para todos os ensaios de cultura *in vitro*.

Para a etapa de diferenciação das ADSC em adipócitos, estas foram semeadas em placas multiplacas na densidade de 1×10^4 células/cm² em meio padrão para este tipo celular (DMEM – Low Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone: Fetal Clone III), 2% de Glutamina e 1 % de penicilina/estreptomicina (todos da marca Gibco)) a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ por 3 dias. Passado este período, as trocas de meio foram efetuadas a cada 3-4 dias por 14 dias com o meio completo para diferenciação adipogênica StemPro® Adipogenesis Differentiation kit (Invitrogen) (STACEY et al., 2009).

Após 24 horas de contato entre as amostras e as células, foi adicionado o corante vital Vermelho Neutro (NR) e as placas foram incubadas por 3 horas para a captura pelo corante pelas células viáveis. Após esse período foi realizada a medida de absorbância, a 540 nm, em espectrofotômetro de placa Multiskan EX 355, Thermo Electron Corporation (NIH, 2001; ICCVAM, 2006; OECD/GD 129, 2010).

4. Resultados e Discussão

Os adipócitos tem um papel crítico no fornecimento de energia do organismo, e seu crescimento envolve tanto o aumento do tamanho das células quando a formação de novos adipócitos. Vários hormônios e fatores de crescimento interferem na diferenciação dos adipócitos, tanto positiva, quanto negativamente. Somente extensivos estudos sobre os adipócitos podem esclarecer aspectos fisiológico, patofisiológicos e os mecanismos do desenvolvimento do tecido adiposo (GREGOIRE et al, 1998).

Atualmente o método mais comumente utilizado para o estudo de agentes antilipolíticos e a utilização de células mesenquimais que após serem diferenciadas em adipócitos são submetidas a diversos ativos, sintéticos ou naturais (RAYALAM et al., 2008; SÖHLE et al, 2009, SU et al., 2013).

A construção de uma pele equivalente contendo inclusive o tecido adiposo pode ser uma alternativa aos testes em animais para o estudo farmacológico de moléculas relacionadas ao emagrecimento ou mesmo no estudo de substâncias ativas para o tratamento estético da celulite (LEQUEUX et al, 2011).

Com a finalidade de eleger um parâmetro de comparação para determinar a equivalência dos modelos *in vitro*, foi realizado um teste de citotoxicidade em adipócitos diferenciados a partir de células mesenquimais humanas obtidos de lipoaspirado (figura 1).



Figura 1. Lipoaspirado obtido de cirurgia plástica Fonte: autor.

Os testes de citotoxicidade devem ser realizados a fim de avaliar se substâncias em teste apresentam comportamento citotóxico. É um teste onde células são expostas a substâncias químicas podendo-se obter taxa de morte celular (apoptose) ou taxa de viabilidade celular e prever o potencial tóxico *in vivo* (OECD 129, 2010; OECD 194, 2014). Este teste permite averiguar os efeitos tóxicos ou anti-proliferativos da amostra-teste em culturas celulares.

O NR é um corante vital responsável por incorporar o corante em lisossomos, assim quanto mais intensa a cor na leitura da absorbância maior a viabilidade celular e menor a toxicidade (OECD 129, 2010).

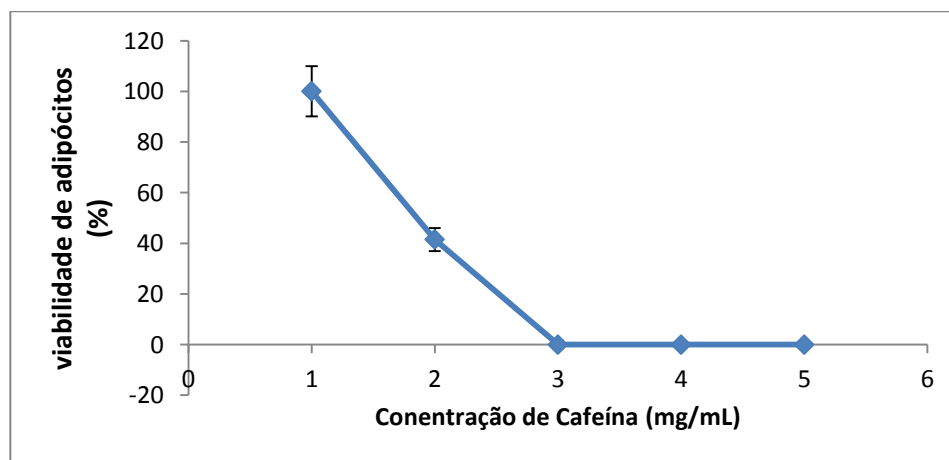


Figura 2. Gráfico representando a citotoxicidade da cafeína em adipócitos utilizando como corante vital o NR.

Na figura 2 podemos notar que a concentração citotóxica IC 50 (concentração tóxica para 50% das células) da cafeína em adipócitos é de 3,83 mg/mL, enquanto a concentração segura IC10 (age apenas sobre 10% das células) é de 14,934 mg/mL.

No entanto, ao avaliarmos a curva de citotoxicidade da cafeína com Alginato Siloxanetriol podemos notar que esses valores aumentam, passando a IC 50 para 30,530 mg/mL enquanto a IC10 é de 14,910 mg/mL (figura 3).

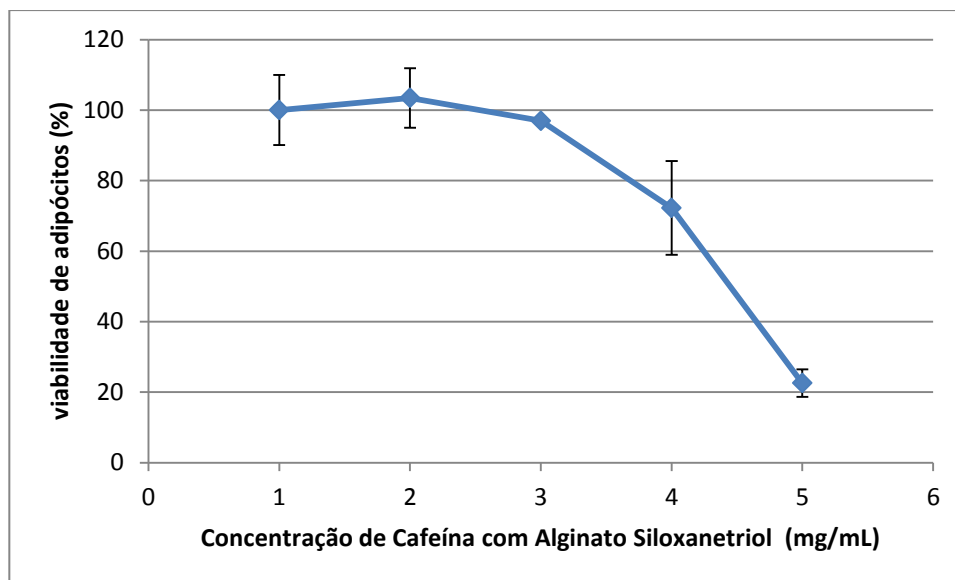
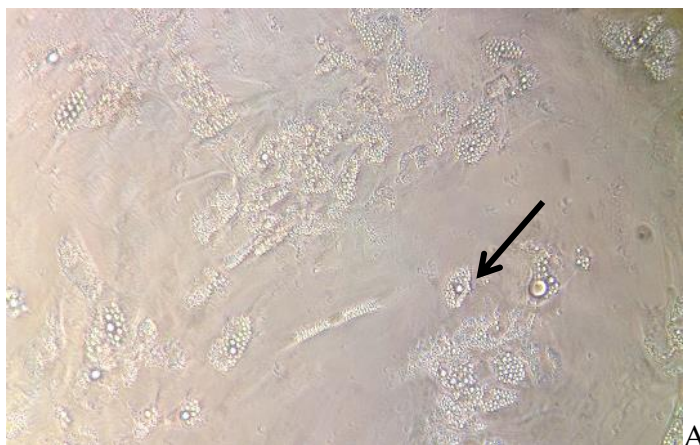


Figura 3. Gráfico representando a citotoxicidade da cafeína com Alginato Siloxanetriol em adipócitos utilizando como corante vital o NR.

Este fato pode ser explicado pela quantidade real de cafeína presente no complexo, o que levaria a uma menor citotoxicidade, já que a diferença entre as duas amostras foi de apenas 2%, porém a quantidade de cafeína presente no complexo pode ser menor.



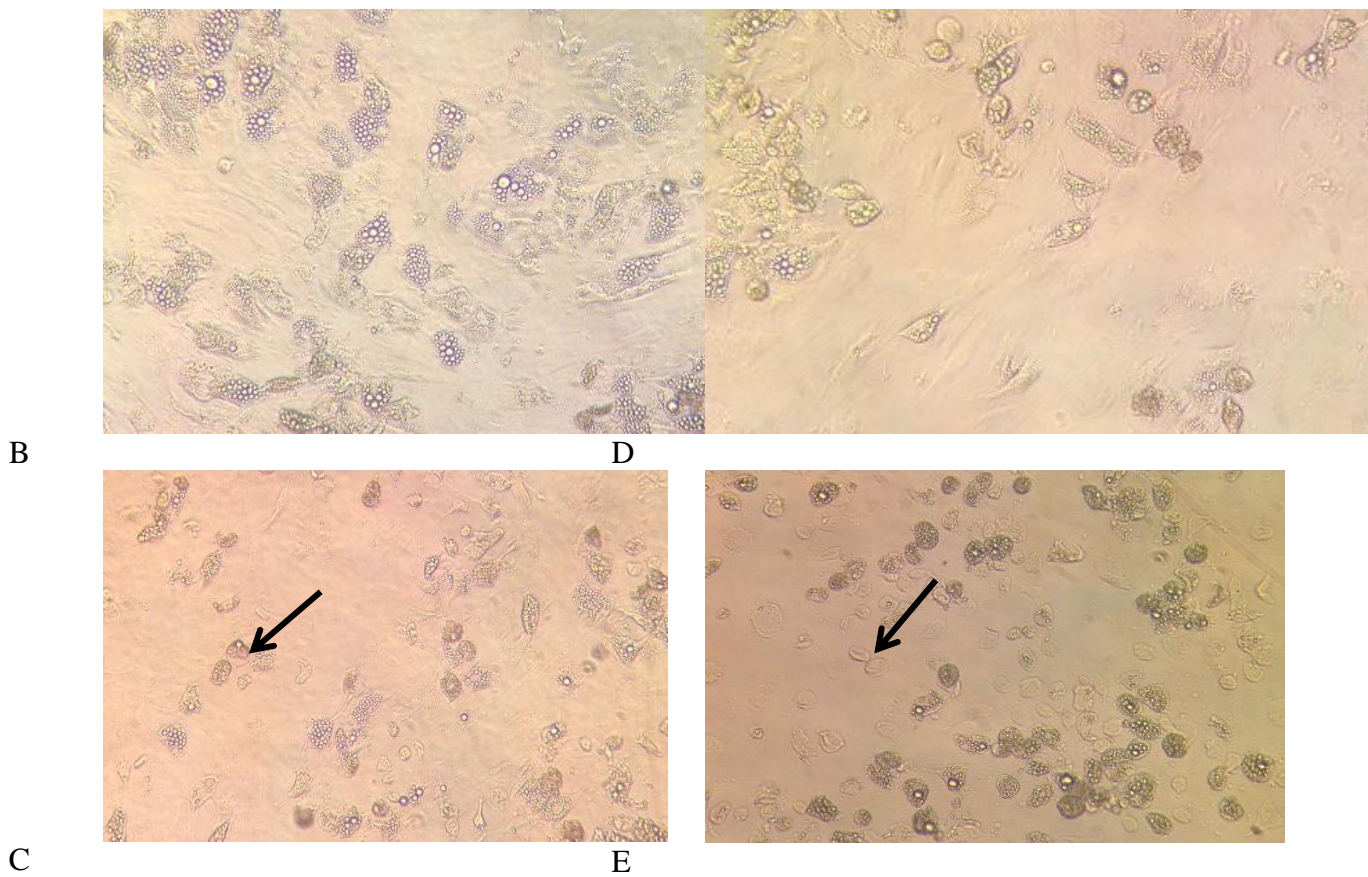


Figura 4. Fotomicrografias dos adipócitos após a realização do teste de citotoxicidade, sendo (A) o controle sem tratamento onde a seta indica a célula repleta de gordura, (B) adipócitos submetidos a concentração de 6,25 mg/mL de cafeína com Alginato Siloxanetriol, (C) adipócitos submetidos a concentração de 25 mg/mL de cafeína com Alginato Siloxanetriol onde a seta indica início da morte celular com diminuição dos grânulos de gordura, (D) adipócitos submetidos a concentração de 3,75 mg/mL de cafeína anidra e (E) adipócitos submetidos a concentração de 30 mg/mL de cafeína anidra onde a seta indica células mortas já sem grânulos de gordura.

Ao analisarmos as fotomicrografias da figura 4 é possível notar uma diminuição proporcional da quantidade de grânulos de gordura dentro das células conforme aumenta a concentração dos ativos, indicando que antes da morte celular ocorre uma eliminação da gordura, efeito esse devido a ação da cafeína, um inibidor da fosfodiesterase que degrada o AMPc (SHUM et al., 1997; MAGALHÃES et al, 2012).

Silverberg et al (2012) desenvolveu um trabalho relacionado a ação da cafeína sobre fibroblastos humanos, concluindo que a cafeína possui um efeito protetor sobre as células humanas, não correlacionado ao efeito antioxidante do ativo.

Já Mori et al (2009) estudou a ação de diversos extratos sobre o tecido adiposo de ratos Wistar comparando-os a atividade da cafeína. Os resultados mostraram que no modelo utilizado o extrato aumentava a ação da lipólise.

Utilizando também adipócitos de ratos Nakabayashi et al (2008) investigou a ação da cafeína como um agente anti-obesidade e concluiu que a cafeína e seus metabolitos reduzem o lipídeo intracelular e estimulam a entrada de glicose pelos adipócitos 3T3 – L1.

Por fim, Velasco et al (2008) avaliou a ação cafeína e da cafeína com Alginato Siloxanetriol *in vivo* utilizando ratos Wistar de 21 dias. A avaliação histológica determinou que a cafeína gerou uma redução de 17% no diâmetro das células quando comparados ao controle, e que o tecido adiposo dos animais tratados com a cafeína com Alginato Siloxanetriol apresentou uma diminuição de 16 % no diâmetro das suas células, reduzindo 26% do numero de células adiposas.

Diante do exposto é possível notar que não existe uma metodologia especifica e já padronizada para determinar a ação da cafeína ou outros agentes lipolíticos sobre os adipócitos o que torna o presente trabalho importante, já que padroniza um método específico para determinar se após a construção de um equivalente dermo-epidêmico acrescido de tecido subcutâneo poderá ser utilizado para avaliar promotores de penetração cutânea físicos na permeação de cafeína.

5. Conclusão

A cafeína anidra apresentou citotoxicidade nas concentrações de 3,86 mg/mL, enquanto a cafeína com Alginato Siloxanetriol apenas na concentração de 30,530 mg/mL, quando aplicadas diretamente sobre adipócitos humanos diferenciadas a partir de células mesenquimais obtidas de lipoaspirado.

6. Referências Bibliográficas

1. CHUNG MT, ZIMMERMANN AS, PAIK KJ, MORRISON SD, HYUN JS, LO DD, MCARDLE A, MONTORO DT, WALMSLEY GG, SENARATH-YAPA K, SORKIN M, RENNERT R, CHEN HH, CHUNG AS, VISTNES D, GURTNER GC, LONGAKER MT, WAN DC. Isolation of human adipose-derived stromal cells

- using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2013.
2. GREGOIRE, F.M., SMAS, C.M., SUL, H.S. Understanding Adipocyte Differentiation. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS.* Vol. 78, No. 3, July 1998.
 3. ICCVAM, 2006. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. NIH publication n°: 07-4519. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2010.
 4. LEQUEUX, C., AUXENFANS, C., THEPOT, A., GELOEN, A., ANDRE, V., DAMOUR, O., MOJALLAL, A. A Simple Way to Reconstruct a Human 3-D Hypodermis: A Useful Tool for Pharmacological Functionality Skin Pharmacol Physiol 2012;25:47–55 2011.
 5. MORI, S., TAKIZAWA, M., SATOU, M., SAKASAI, M., KUSUOKU, H., NOJIRI, H., YOSHIZUKA, N., HOTTA, M., KITAHARA, T., HASE, T., TAKEMA, Y., SAITO, M., YADA, T. Enhancement of Lipolytic Responsiveness of Adipocytes by Novel Plant Extract in Rat. DOI: 10.3181/0904-RM-1231535-3702/09/23412-1445\$15.00. Copyright 2009 by the Society for Experimental Biology and Medicine.
 6. NAKABAYASHI, H., HASHIMOTO, T., ASHIDA, H., NISHIUMI, S., KANAZAWA, K. Inhibitory effects of caffeine and its metabolites on intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 adipocytes. *BioFactors* 34 (2008) 293–302 293.
 7. NIH Publication. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity. No. 01-4500, 2001.
 8. OECD. 2010. Test No. 129. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. ENV/JM/MONO(2010)20
 9. OECD. 2014. Test No. 194: OECD Guidance on Grouping of Chemicals, Second Edition. Series on Testing & Assessment. ENV/JM/MONO.
 10. RAMALHO, A.T.; CURVELO, S.; Substâncias Cosmetologicamente Activas Caracterização, Indicação, Eficácia e Segurança: Cafeína, *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, Ano 3, nº2 (2006)

11. RAWLINGS, A.V. Cellulite and its treatment. *International Journal of Cosmetic Science*, 2006, v. 28, p. 175–190, 2006.
12. RAYALAMA, S., DELLA-FERAA, M.A., BAILEA, C.A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19 (2008) 717–726.
13. RUBIO, L.; ALONSO, C.; LOPEZ, O.; RODRIGUES, G.; CODERCH, L.; NOTARIO, J.; MAZA, A.; PARRA, J.L. Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. *Pharmacology and therapeutics*, v. 50, p. 881-889, 2011.
14. SILVERBERG, J. I., PATEL, M. BRODY, N. JAGDEO, J. Caffeine protects human skin fibroblasts from acute reactive oxygen species-induced necrosis. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 11, p. 1342-1346, 2012.
15. SÖHLE, J., KNOTT, A., HOLTZMANN, U., SIEGNER, R., GRÖNNIGER, E., SCHEPKY, A., GALLINAT, S., WENCK, H., STÄB F., WINNEFELD, M. White Tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in human subcutaneous (pre)-adipocytes. *Nutrition & Metabolism* 2009, 6:20 doi:10.1186/1743-7075-6-20.
16. STACEY, D. H., HANSON, S. E., LAHVIS, G., GUTOWSKI, K. A., MASTERS, K. S. In vitro adipogenic differentiation of preadipocytes varies with differentiation stimulus, culture dimensionality, and scaffold composition. *Tissue Eng. Part A* 15, 3389-3399, (2009).
17. SU, S-H., SHYU, H-W., YEH, Y-T., CHEN, K-M., YEH, H, SU, S-J. Caffeine inhibits adipogenic differentiation of primary adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells. *Toxicology in Vitro* 27 (2013) 1830–1837.
18. TARNOPOLSKY, M.A. et al. Physiological responses to caffeine during endurance running in habitual caffeine users. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1989; 21(4): 418- 424
19. TRAUER, S.; PATZELT, A.; OTBERG, N.; KNORR, F.; ROZYCKI, C.; BALIZS, G.; BÜTTEMEYER, R.; LINSCHIED, M.; LIEBSCH, M.; LADERMANN, J. Permeation of topically applied caffeine through human skin – a comparison of in vivo and in vitro data. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 68 (2), p. 181-186, 2009.
20. VELASCO, M.V.R., TANO, C.T.N., MACHADO-SANTELLI, G.M., CONSIGLIERI, V.O., KANEKO. T.M., BABY, A.R. Effects of caffeine and

siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7, 23–29, 2008.

21. WILLIAMS, A. *Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice*. London: Pharmaceutical Press, 2003.