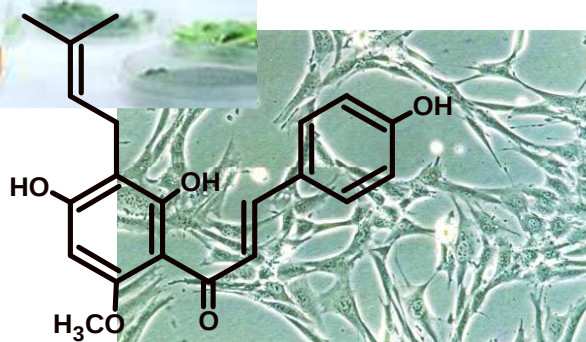


Regulação da proliferação, diferenciação e apoptose de pré-adipócitos pelo

Xanto-humol



Vanda Rafaela Maio de Sousa Mendes

Orientação: Maria do Rosário Barbosa Monteiro

Ao meu Pai

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Bebidas e Saúde (iBeSa), pelo apoio financeiro do projecto.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Isabel Azevedo, Directora do Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, por me ter acolhido no Serviço e permitido a realização deste trabalho.

Aos restantes membros do Serviço de Bioquímica, pela disponibilidade e simpatia que demonstraram ao longo do meu estágio.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Dra. Maria do Rosário Barbosa Monteiro, que sem o seu apoio este trabalho não teria sido possível.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	3
Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Objectivos	12
Material e métodos	13
Resultados	19
Discussão	27
Conclusões	35
Bibliografia	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC – AMP cíclico

ANOVA – análise de variância

BSA – albumina de soro bovino

DAPI – di-hidrocloreto de 4',6-diamidino-2'-fenilindol

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

EDTA – ácido etileno-diaminotetracético

EPM – erro padrão da média

EUA – Estados Unidos da América

FITC – isotiocianato de fluoresceína

IBMX – isobutilmetilxantina

IC – intervalo de confiança

IC₅₀ – concentração necessária para inibição em 50%

IGF – *insulin-like growth factor*

PBS – solução amortecedora de fosfatos

SRB – sulforrodamina B

TA – tecido adiposo

TAG – triacilgliceróis

Tris-HCl – hidrocloreto de tris-hidroxi-aminometano

TUNEL – *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling*

XN – xanto-humol

RESUMO

Actualmente, a obesidade é considerada uma epidemia em todo o mundo. O tecido adiposo (TA) é um órgão endócrino especializado no armazenamento do excesso de energia na forma de triacilgliceróis e tem também a capacidade de segregar citocinas e adipocitocinas. O TA pode ser classificado de acordo com a morfologia dos adipócitos que o compõem em hiperplásico, quando tem um grande número de adipócitos, ou em hipertrófico, quando os adipócitos são de grande tamanho. As complicações metabólicas, que normalmente acompanham a obesidade, parecem estar associadas à hipertrofia dos adipócitos.

O xanto-humul (XN) é um flavonóide prenilado do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) que se pode encontrar na cerveja. A este composto têm sido associadas múltiplas actividades biológicas, nomeadamente quanto ao seu potencial anti-carcinogénico. Com este estudo, pretendeu-se explorar o efeito do XN no TA, utilizando uma linha celular de pré-adipócitos de Ratinho, 3T3-L1. Para isso, testou-se o efeito do XN na proliferação, diferenciação e apoptose dos pré-adipócitos. Para avaliar a proliferação celular utilizaram-se dois métodos: quantificação das proteínas celulares com sulforrodamina B (SRB) e identificação do marcador de proliferação celular Ki67 por imuno-fluorescência. A diferenciação foi avaliada através da quantificação do conteúdo lipídico nos adipócitos e para estimar a apoptose utilizou-se o método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling*). O XN demonstrou ter capacidade anti-proliferativa, com um IC₅₀ de 26 (19,9-34,5) µM, 12 (9,1-16,6) µM e 17 (11,6-27,9) µM após 24, 48 e 72 h, respectivamente. Na concentração de 5 µM, o XN reduziu significativamente a expressão do Ki67 nos pré-adipócitos. Quanto à diferenciação, o XN reduziu o

conteúdo lipídico dos adipócitos e esta redução foi mais marcada quando as células foram pré-incubadas antes do início da diferenciação (46% do controlo, $p < 0,05$) ou durante o período de diferenciação (47% do controlo, $p < 0,05$). Nos estudos de apoptose, verificou-se que o XN (5 μM) aumentou o número de pré-adipócitos e adipócitos em apoptose, nestes últimos com significado estatístico.

Segundo estes resultados, o XN tem a capacidade de reduzir o número de adipócitos, contribuindo para a sua hipertrofia. Tendo em conta as consequências metabólicas resultantes da hipertrofia dos adipócitos, o XN não parece contribuir para a melhoria do perfil metabólico associado à obesidade.

Palavras-chave: Adipócitos, apoptose, diferenciação, flavonóides, hipertrofia, obesidade, pré-adipócitos, xanto-humol.

ABSTRACT

Obesity is currently considered a global epidemic. Adipose tissue (AT) is an endocrine organ specialized in the storage of energy excess as triacylglycerols, also possessing the ability of secreting cytokines and adipocytokines. AT may be categorized according to the characteristics of the adipocytes that compose it as hyperplastic, when there are a great number of small adipocytes, or hypertrophic when there are adipocytes of larger size. The metabolic complications which are usually associated with obesity seem to be more linked with AT adipocyte hypertrophy.

Xanthohumol (XN) is a hop (*Humulus lupulus* L.) prenylflavonoid that may be found in beer. Several biological activities are being attributed to this compound, namely related to its anti-carcinogenic potential. In the present study, we aimed at studying the effect of XN in the AT, using a mouse preadipocyte cell line, 3T3-L1. To do so, preadipocyte proliferation, differentiation and apoptosis were measured after XN treatment. Two methods were used to assess proliferation: the quantification of whole culture protein content and the identification of the proliferation marker protein Ki67 through immunofluorescence. Differentiation was measured by assessing culture lipid content and apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL). XN was able to decrease cell proliferation, displaying an IC_{50} of 26 (19.9-34.5) μ M, 12 (9.1-16.6) μ M and 17 (11.6-27.9) μ M after 24, 48 and 72 h, respectively. At 5 μ M, XN significantly reduced preadipocyte Ki67 expression. Concerning differentiation, XN reduced adipocyte lipid content and this effect was more pronounced when cells were pre-treated before differentiation (46% of control, $p < 0.05$) or during

differentiation procedure (47% of control, $p < 0.05$). As to apoptosis, XN (5 μM) increased the number of apoptotic preadipocytes and adipocytes, the difference being significant in the later.

These results suggest that XN is able to reduce adipocyte number, which may contribute to their hypertrophy. Knowing the metabolic consequences of adipocyte hypertrophy, XN does not seem to contribute to the improvement of the metabolic profile associated with obesity.

Keywords: Adipocytes, apoptosis, differentiation, flavonoids, hypertrophy, obesity, preadipocytes, xanthohumol.

INTRODUÇÃO

A incidência de obesidade, já considerada uma das grandes epidemias da sociedade moderna, tem aumentado de uma forma vasta em todo o mundo⁽¹⁾. O actual ambiente obesogénico, caracterizado pela disponibilidade de alimentos hipercalóricos e pelo sedentarismo, é apontado como a sua principal causa⁽²⁾. Esta situação resulta num balanço energético positivo em que o excesso de energia é armazenado no tecido adiposo (TA) sob a forma de triacilgliceróis (TAG), para utilização posterior em momentos de escassez alimentar, praticamente inexistentes hoje em dia⁽³⁾.

Desde a descoberta da leptina e da sua produção pelo TA que este começou a ser encarado como órgão endócrino⁽⁴⁾. Desde então, outras hormonas derivadas do TA, designadas em conjunto como adipocitocinas, têm sido descritas. Outra característica do TA que ultimamente tem ganho relevo é a presença de outro tipo de células além dos adipócitos, como células endoteliais, pericitos, monócitos, macrófagos e células pluripotentes, todas elas com um papel fundamental na regulação da função do TA⁽⁵⁾.

Nos indivíduos obesos e com excesso de peso, a acumulação de TA resulta no aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e/ou no aumento do número de adipócitos (hiperplasia)⁽¹⁾. Deste modo, o TA pode ser caracterizado de duas formas: hiperplásico – com um grande número de adipócitos, ou hipertrófico – com adipócitos de grande tamanho⁽⁶⁾. Embora se acreditasse que o número de adipócitos de um indivíduo era determinado à nascença ou em idades mais precoces e que o crescimento do TA se devia principalmente à hipertrofia das

células adiposas⁽⁷⁾, esta ideia tem sido refutada. Foi já demonstrada a capacidade de células do TA de Rato incorporarem ³H-timidina, o que está associado à sua necessidade de sintetizarem ácidos nucleicos essenciais durante o processo de proliferação⁽⁸⁾. Assim, a proliferação das células precursoras, mesmo durante a idade adulta, será importante para a determinação do número de adipócitos de um indivíduo.

Um outro processo essencial ao desenvolvimento do TA é a diferenciação dos pré-adipócitos em células com capacidade de exercerem a função de armazenamento de lípidos, os adipócitos⁽⁷⁾. Embora não seja muito claro quais os estímulos que ocorrem *in vivo* para esta transformação, é possível promover a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros por incubação com insulina, glicocorticóides e factores que aumentam o AMP cíclico (AMPC)⁽⁷⁾. Assim, do balanço entre a proliferação e a diferenciação, será determinado não só o número de adipócitos mas também o seu tamanho, uma vez que a mesma quantidade de gordura pode ser armazenada num grande número de adipócitos de pequeno tamanho ou num número reduzido de adipócitos de maiores dimensões.

A obesidade hipertrófica é a mais comum nos adultos⁽⁶⁾. Este tipo de obesidade está correlacionada com as complicações metabólicas que ocorrem num indivíduo obeso, tais como resistência à insulina e diabetes de tipo 2, dislipidemias, hipertensão e doenças cardiovasculares^(6, 9). Segundo alguns autores, a origem destas complicações está associada a inflamação existente no TA⁽¹⁰⁾. Ao contrário da ideia anterior de que para se reduzir as complicações associadas à obesidade seria necessário impedir a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, é cada vez mais comum uma outra visão deste

problema. A modulação do tamanho do adipócito tem ganho relevo, uma vez que tem sido sugerido que o rebentamento dos adipócitos constitui um factor iniciador da inflamação com génese no TA e que os adipócitos de maior tamanho são mais susceptíveis à rotura⁽¹¹⁾. Assim, parece de extrema importância o conhecimento de factores que possam contribuir para a redução do tamanho dos adipócitos.

Alguns nutrientes e outros componentes da alimentação são capazes de modular o metabolismo do TA, como por exemplo o ácido linoleico conjugado, a epigallocatequina-3-galato e outras catequinas, a capsaicina e a genisteína^(12, 13).

O xanto-humol (XN) é um flavonóide prenilado do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) (**Figura 1**), que pode estar presente em pequenas quantidades na cerveja, sendo em parte responsável pelo sabor amargo característico desta bebida⁽¹⁴⁾. A cerveja é a principal fonte alimentar de XN, no entanto, a sua concentração é baixa. A concentração de XN e iso-XN (isómero do XN) na cerveja é cerca de 0,69 mg/L (1,95 μ M) e 3,44 mg/L (9,7 μ M), respectivamente, e o conteúdo total de prenilflavonóides na cerveja pode atingir os 4 mg/L (11 μ M)⁽¹⁵⁾.

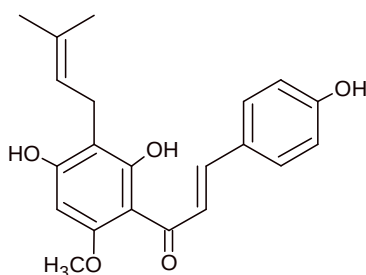


Figura 1 – Estrutura química do xanto-humol.

O XN é adicionado durante a produção da cerveja na forma de extracto de lúpulo. O teor final de XN depende de vários factores do processo produtivo, como por exemplo, o momento de adição do lúpulo, a eficácia da extracção do XN da planta, isomerização térmica do XN em iso-XN, e também das perdas durante

a fermentação e a filtração, fases finais do fabrico. Tendo por base o potencial dos flavonóides na melhoria da saúde, a indústria alimentar procura aperfeiçoar o processo produtivo da cerveja para minimizar as perdas de XN⁽¹⁶⁾.

São já reconhecidas algumas actividades biológicas do XN: inibição da bioactivação de carcinogéneos presentes na dieta⁽¹⁷⁾; indução da actividade das enzimas de fase II da biotransformação de xenobióticos⁽¹⁷⁾; inibição da produção de prostaglandinas e de monóxido de azoto⁽¹⁸⁾; actividade anti-tumoral em células tumorais em hipoxia⁽¹⁹⁾. A juntar a estes resultados, está o seu potencial anti-proliferativo e pró-apoptótico demonstrado em diferentes linhas celulares tumorais⁽²⁰⁾ e a sua capacidade anti-angiogénica⁽²¹⁾.

OBJECTIVOS

Embora os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-tumorais do XN estejam a ser alvo de estudos recentes, a possibilidade deste polifenol interferir com o metabolismo do TA tem sido pouco explorada. Com este estudo pretendemos analisar a interacção do XN no desenvolvimento do TA, com o intuito de prever a sua potencial utilização na prevenção e/ou tratamento da obesidade. Para isso, analisou-se a influência do XN na proliferação e na apoptose na linha celular de pré-adipócitos de Ratinho, 3T3-L1, e o seu efeito na acumulação de lípidos em diferentes fases da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Linha celular de pré-adipócitos 3T3-L1 de Ratinho (CL-173) obtida na *American Type Culture Collection*, através da LGC Promochem (Barcelona, Espanha). Albumina de soro bovino (BSA), meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), *oil red O*, solução antibiótica e anti-micótica, solução de 0,25% de tripsina-ácido etileno-diaminotretacético (EDTA), soro de feto bovino, sulforrodamina B (SRB) e Tris-HCl (hidrocloreto de tris-hidroxi-aminometano) adquiridos à Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, EUA). Gelatina, Triton X-100 e *p*-formaldeído adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). Di-hidrocloreto de 4',6-diamidino-2'-fenilindol (DAPI) e *kit* para determinação da apoptose por *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling* (TUNEL) adquiridos à Roche Applied Science (Basel, Suíça). Anticorpo primário (*goat polyclonal immunoglobulin G anti-Ki67*) e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*donkey anti-goat immunoglobulin G-FITC*) obtidos na Santa Cruz Biotechnologies (CA, EUA). XN fornecido pela Hopsteiner (Mainburg, Alemanha) através do Instituto de Bebidas e Saúde.

Cultura celular

A linha celular de pré-adipócitos 3T3-L1 foi mantida em meio de cultura DMEM com vermelho de fenol suplementado com 2,5 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1,5 g/L de NaHCO₃ e 10% de soro de feto bovino (inativado a 56°C, 30 min), 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina, numa atmosfera modificada com 5% CO₂ – 95% em placas de

cultura de poliestireno até atingirem 80% de confluência. Nesta altura, a cultura celular era dividida de 1:3. Para tal, o meio de cultura era removido e as células eram incubadas com 500 µL de solução de tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C.

Para estudos em adipócitos maduros as células foram diferenciadas dois dias após a confluência com isobutilmetilxantina (IBMX, 0,5 mM), dexametasona (0,25 µM) e insulina (10 µg/mL) dissolvidas no meio de cultura (dia 0). Dois dias após o início da diferenciação, as células eram cultivadas em meio de cultura normal. Ao fim de 7-8 dias de cultura, cerca de 80% das células encontram-se diferenciadas⁽¹⁾.

Efeito do XN

Preparou-se uma solução *stock* de XN na concentração de 100 mM dissolvido em etanol que foi mantida a -80°C até ao seu uso. Todas as soluções de menor concentração utilizadas neste estudo foram diluídas a partir de alíquotas da solução concentrada. O XN ou o solvente foram adicionados ao meio de cultura para estudo do seu efeito nos diferentes parâmetros. Em todas as situações, a concentração de solvente no meio de cultura foi inferior a 0,1%.

Proliferação celular de pré-adipócitos

O efeito do XN na proliferação celular foi determinado recorrendo a dois métodos. O primeiro consistiu na coloração das proteínas celulares com o corante SRB e quantificação espectrofotométrica⁽²⁰⁾, enquanto que o segundo consistiu na identificação por imuno-fluorescência de uma proteína celular que é expressa no núcleo de células que se encontram em proliferação^(20, 22).

Quantificação das proteínas celulares

Para a coloração das proteínas celulares totais, as células foram semeadas em placas de 96 poços, numa densidade de 8000 células por poço. Após 24 h as células foram incubadas com diferentes concentrações finais de XN (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 35 e 50 μM) adicionado ao meio de cultura (200 μL de volume final) durante 24, 48 e 72 h. No final do tempo de tratamento, as células eram fixadas com 25 μL de ácido tricloroacético a 50% (m/v) adicionado ao conteúdo de cada poço durante 1 h a 4°C. As células fixadas nas placas foram lavadas 4 vezes com água destilada e depois de deixar a placa secar, coraram-se as proteínas celulares adicionando a cada poço 50 μL de solução de 0,4% (m/v) de SRB em solução de 1% (v/v) de ácido acético, durante 15 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado com 5 lavagens com solução de ácido acético a 1% e secaram-se novamente as placas. O corante ligado às proteínas foi dissolvido em 150 μL de Tris-HCl 10 mM (pH 10,5) com agitação e quantificado por espectrofotometria a 550 nm com referência a 650 nm.

Identificação do marcador de proliferação celular Ki67 por imuno-fluorescência

Os pré-adipócitos foram semeados em lamelas revestidas com 0,2% (m/v) de gelatina, e colocadas em placas de 24 poços, numa densidade de 40000 células por poço. Após 24 h em cultura, os pré-adipócitos foram tratados com XN durante 24 h. No final do tratamento as células foram fixadas com solução de *p*-formaldeído a 4% (m/v), bloqueadas com BSA 4% (m/v) em solução amortecedora de fosfatos (PBS; 137 mM de NaCl, 10 mM de fosfatos e 2,7 M de KCl, pH 7,4) e incubadas com o anticorpo primário anti-Ki67 (diluído de 1:50 em PBS com BSA). Após lavagem do anticorpo primário em excesso com PBS, as

lamelas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com FITC (diluído de 1:200 em PBS com BSA). Os núcleos foram contrastados com DAPI (1 µg/mL em metanol) para contagem das células totais. As lamelas foram montadas em lâminas e visualizadas ao microscópio de fluorescência com ampliação de 400×. A proliferação foi expressa em percentagem de células em proliferação (com o núcleo marcado com Ki67) relativamente ao número de núcleos totais (com o núcleo marcado com DAPI).

Diferenciação celular

A diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos foi determinada através da quantificação dos lípidos acumulados no interior das células maduras com o corante *oil red O*, conforme descrito anteriormente⁽²³⁾.

Para tal, as células foram semeadas em placas de 24 poços revestidas com 0,2% de gelatina (40000 células por poço) até atingirem confluência. Os tratamentos com XN foram realizados em diferentes períodos da diferenciação celular, conforme se encontra esquematizado na **Figura 2**. Sete dias após o início da diferenciação, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e fixadas com *p*-formaldeído (4% em PBS) durante 1 h à temperatura ambiente. As células foram então coradas com solução de *oil red O* a 0,3% (m/v) em isopropanol:água destilada (3:2). Após 4 lavagens com água destilada e secagem da placa, o corante foi dissolvido em 150 µL de isopropanol e mediu-se a absorvância a 492 nm com referência a 650 nm.

Para fotografar as células sujeitas aos diferentes tratamentos após coloração com *oil red O*, foram cultivadas em lamelas revestidas com gelatina e sujeitas a um procedimento semelhante de tratamento e coloração. No final do período de

coloração com *oil red O*, as lamelas foram montadas em lâminas, visualizadas e fotografadas ao microscópio (Nikon 50i, Nikon, Japão) com uma ampliação de 200× ou 400×.

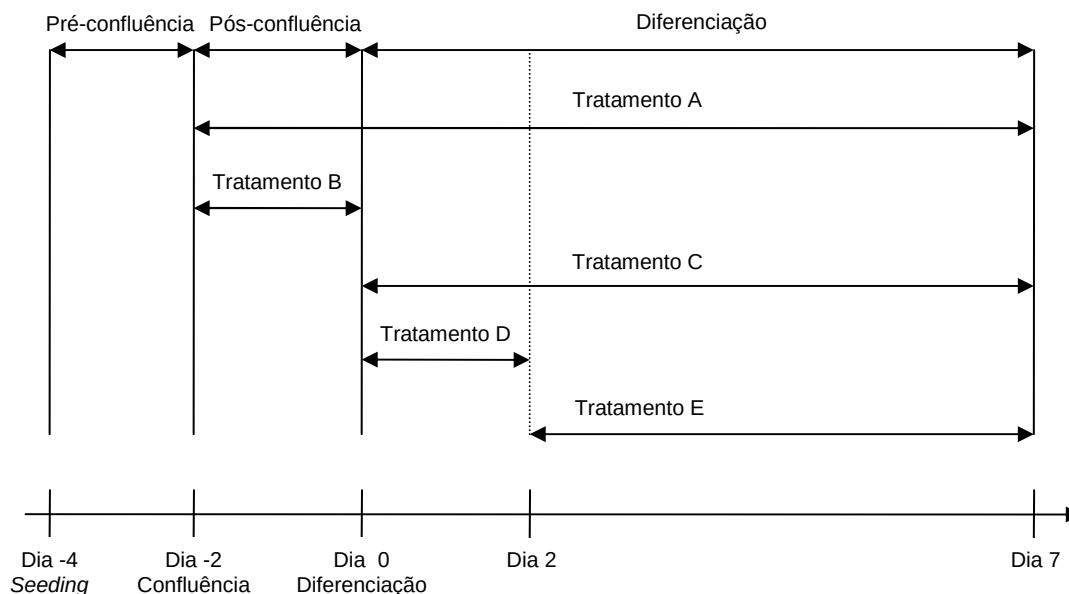


Figura 2 – Esquema de tratamento das células 3T3-L1 com várias concentrações de XN (A) desde a confluência dos pré-adipócitos até ao final do período de diferenciação (dia -2 ao dia 7); (B) apenas nos dois dias anteriores ao dia de diferenciação (dia -2 ao dia 0); (C) desde o início da diferenciação até ao final do período de diferenciação (dia 0 ao dia 7); (D) apenas nos dois primeiros dias do período de diferenciação (dia 0 ao dia 2); (E) desde o segundo dia do período de diferenciação (dia 2 ao dia 7).

Apoptose de pré-adipócitos e de adipócitos

Os pré-adipócitos foram semeados em lamelas revestidas com 0,2% de gelatina colocadas em placas de 24 poços. Para ensaios com pré-adipócitos, as células foram tratadas com XN (5 μ M) ou com solvente (etanol 0,1%) após cultura durante 24 h. No caso dos adipócitos, as células foram diferenciadas e tratadas 7 dias após a indução da diferenciação, durante 24 h.

A apoptose de pré-adipócitos e adipócitos foi determinada pelo método de TUNEL de acordo com as instruções do fabricante, que passo a descrever brevemente. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com *p*-

formaldeído (4% em PBS) durante 30 minutos. De seguida foram incubadas com solução de permeabilização [0,1% (m/v) de citrato de sódio com 0,1% (v/v) de Triton X-100] durante 8 minutos à temperatura ambiente. As preparações celulares foram incubadas em câmara húmida a 37°C durante 1 hora com a mistura de reacção do TUNEL numa proporção de 1:10 em solução amortecedora fornecida no *kit*. Após incubação, os núcleos foram contrastados com DAPI (1 µg/mL em metanol) durante 5 minutos para marcação dos núcleos totais. A apoptose foi determinada pela contagem ao microscópio de fluorescência do número de núcleos marcados com TUNEL (em apoptose) relativamente ao número de núcleos totais.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados na forma de médias aritméticas e respectivo erro padrão da média (EPM). Os resultados relativos aos IC₅₀ estão apresentados na forma de média aritmética com respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%. As diferenças entre dois grupos foram avaliadas através da utilização do teste *t* de Student. Quando se compararam mais de dois grupos, efectuou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

O XN reduziu a proliferação dos pré-adipócitos

A quantificação das proteínas celulares pelo método de SRB é uma forma indirecta de medir a proliferação celular em que se assume que quanto maior a concentração de proteínas na cultura, maior será o número de células na cultura. Assim, ao corar as proteínas com o corante SRB, quanto maior a intensidade da cor, maior será a proliferação celular. Como se observa na **Figura 3**, com o aumento da concentração de XN houve uma diminuição da proliferação celular em todos os tempos de tratamento. Para todos os tempos de tratamento, esta redução na proliferação foi estatisticamente significativa a partir de 10 μM . O tratamento das células com XN na concentração de 50 μM , durante 48 ou 72 h, provocou citotoxicidade, evidenciada pela presença de menos proteínas celulares em comparação com o início do tratamento.

A partir destes valores calculou-se o IC_{50} do XN em relação à proliferação para cada período de tratamento. O IC_{50} representa a concentração de XN que reduziu em 50% a proliferação celular em comparação com o controlo. O IC_{50} do XN para inibição da proliferação celular nas 24, 48 e 72 h foi de 26 (19,9-34,5) μM , 12 (9,1-16,6) μM e 17 (11,6-27,9) μM , respectivamente (**Tabela 1**).

Para avaliar o efeito do XN na proliferação celular, utilizou-se ainda uma outra técnica, mais específica, em que se recorre a um anticorpo para marcar selectivamente as células que se encontram em proliferação. O anticorpo identifica uma proteína nuclear, Ki67, que é expressa nos núcleos celulares durante a proliferação⁽²²⁾.

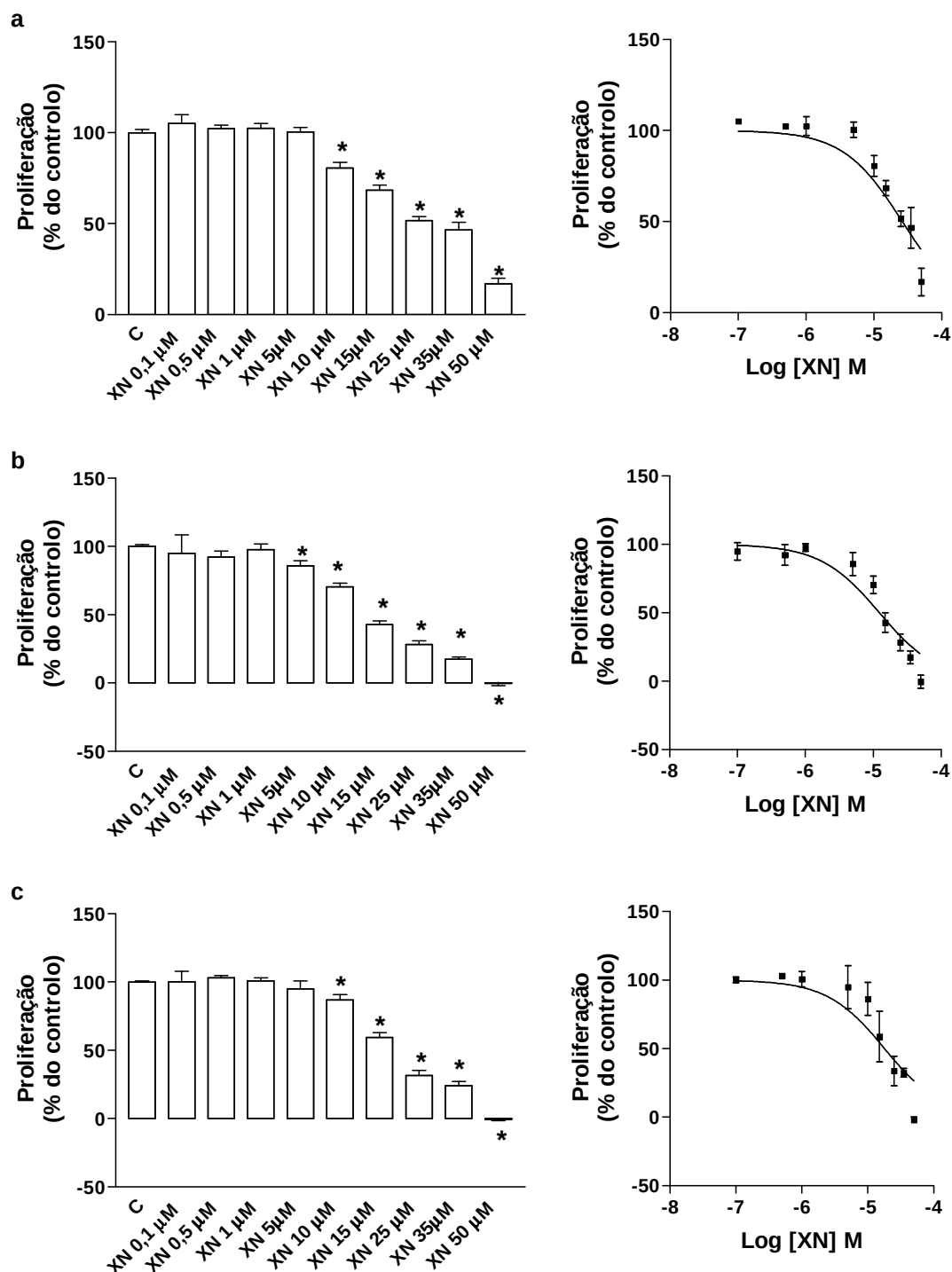


Figura 3 – Efeito do xanto-humol (XN) na proliferação dos pré-adipócitos. A proliferação foi estimada através da quantificação das proteínas celulares com SRB, após tratamento com diferentes concentrações de XN durante 24 (a), 48 (b) ou 72 h (c). Os gráficos da direita mostram as curvas concentração-efeito utilizadas para calcular os IC_{50} . Os resultados representam a média $\pm$ EPM de pelo menos três experiências independentes realizadas em triplicado ou médias aritméticas com respectivos IC a 95%. * $p < 0,05$ vs respectivo controle.

Tempo de incubação (h)	IC ₅₀ (IC 95%) μ M do XN
24	26 (19,9-34,5)
48	12 (9,1-16,6)
72	17 (11,6-27,9)

Tabela 1 – IC₅₀ do xanto-humol (XN) na inibição da proliferação dos pré-adipócitos para os diferentes tempos de incubação. Os resultados estão expressos em média geométrica com o respectivo IC.

Na **figura 4** é possível observar fotografias obtidas em microscopia de fluorescência de pré-adipócitos tratados durante 24 h com o veículo (**Figuras 4a e 4b**) em comparação com os pré-adipócitos tratados com XN (5 μ M) (**Figuras 4c e 4d**). Os núcleos totais estão corados de azul e os núcleos das células em proliferação estão corados de verde. Através da contagem dos núcleos marcados com o anticorpo anti-Ki67 (corados de verde) foi possível verificar que o XN reduziu significativamente a expressão deste marcador quando adicionado às células na concentração de 5 μ M (**Figura 5**).

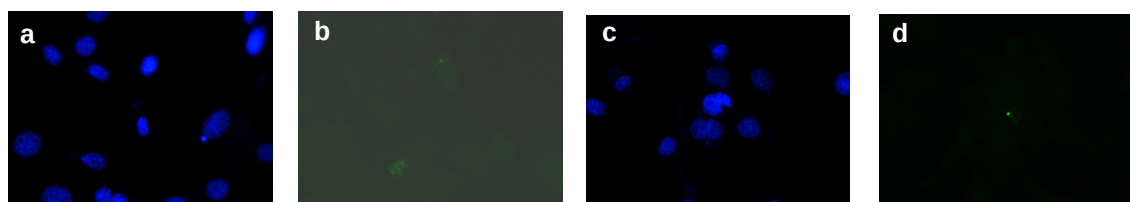


Figura 4 – Fotografias de microscopia de fluorescência de pré-adipócitos marcados com anticorpo anti-Ki67 sujeitos a tratamento com veículo (**b**) ou xanto-humol 5 μ M (**d**). A azul (**a** e **c**) encontram-se os núcleos totais, corados com DAPI, contados para a normalização dos resultados. As fotografias foram obtidas com uma ampliação de 400 $\times$.

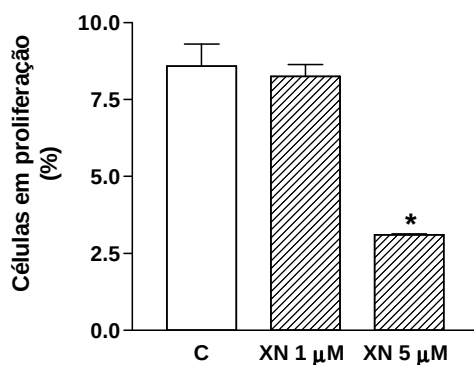


Figura 5 – Efeito do xanto-humol (XN) na proliferação dos pré-adipócitos. A proliferação foi determinada através da identificação da expressão do marcador de proliferação nuclear Ki67 por imuno-fluorescência em células tratadas com XN ou veículo (C, etanol) durante 24 h. Os resultados representam a média $\pm$ EPM da razão entre o número de núcleos em proliferação e o número de núcleos totais de 3 experiências independentes. * $p < 0,05$ vs respectivo controlo.

O XN reduziu a diferenciação dos pré-adipócitos

Os pré-adipócitos apresentavam uma morfologia fibroblástica, que era mantida no início do período de diferenciação. No segundo dia após a indução da diferenciação, os adipócitos tinham uma forma arredondada e apresentavam algumas gotículas lipídicas no citoplasma. No final do período de diferenciação (dia 7 ou 8), as gotículas lipídicas eram mais abundantes e maiores, chegando a ocupar todo o citoplasma.

Como forma de medida de diferenciação, determinou-se a quantidade de lípidos acumulados no interior dos adipócitos. Assim, quanto mais diferenciados estavam os adipócitos, maior o seu conteúdo lipídico. Para quantificar o conteúdo lipídico utilizou-se um corante lipossolúvel *oil red O* e assim a intensidade da cor será proporcional à quantidade de lípidos.

Na **figura 6** estão os resultados dos tratamentos com XN durante a diferenciação. O tratamento com XN resultou numa diminuição da acumulação de

lípidos no interior dos adipócitos. Quando adicionado ao meio de cultura durante todo o período de diferenciação (tratamento A), na concentração de 20 μM , este composto induziu a maior redução do conteúdo lipídico em relação aos outros períodos de tratamento, para cerca de 39,3% do controlo (**Figura 7**).

Para compreender em que período da diferenciação o XN exercia maior efeito na redução do conteúdo lipídico, trataram-se as células em diferentes fases da diferenciação. O tratamento com XN 20 μM desde o dia -2 ao dia 0 (tratamento B) ou desde o dia 0 ao dia 2 (tratamento D) diminuiu o conteúdo lipídico para 46,4% e 47,0% do controlo ($p < 0,05$) respectivamente. Não houve alteração significativa do conteúdo lipídico em relação ao controlo quando as células foram tratadas apenas após a indução da diferenciação, ou seja, do dia 2 ao dia 7 (tratamento E).

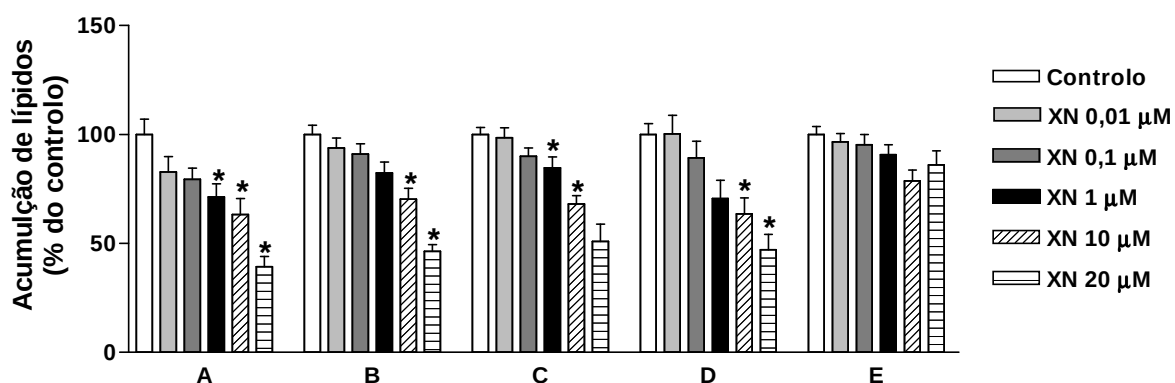


Figura 6 – Efeito do xanto-humol (XN) em diferentes fases da diferenciação. Tratamento A (dia -2 ao dia 7); tratamento B (dia -2 ao dia 0); tratamento C (dia 0 ao dia 7); tratamento D (dia 0 ao dia 2); tratamento E (dia 2 ao dia 7). Os pré-adipócitos estavam em confluência ao dia -2 e a diferenciação foi induzida 2 dias depois (dia 0) com 0,5 mM de IBMX, 0,25 μM de dexametasona e 10 $\mu\text{g/mL}$ de insulina (dia 0). Dois dias mais tarde (dia 2), o meio foi substituído por meio de cultura sem agentes de diferenciação. Sete dias após o início da diferenciação (dia 7), efectuou-se a coloração e doseamento dos lípidos acumulados no interior das células com *oil red O* por espectrofotometria a 492 nm com referência a 650 nm. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três experiências independentes realizadas em triplicado. * $p < 0,05$ vs respectivo controlo.

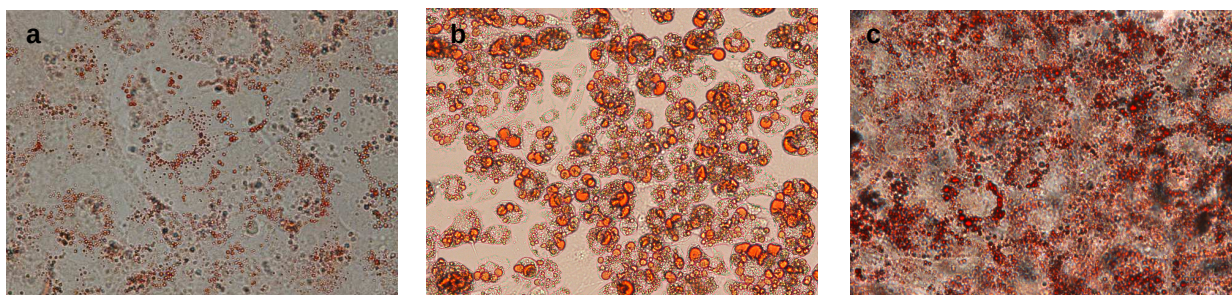


Figura 7 – Adipócitos em diferentes fases de diferenciação corados com *oil red O* (Tratamento A). (a) Adipócitos controlo ao dia 0 da diferenciação (ampliação 400×). (b) Adipócitos controlo ao dia 7 da diferenciação (ampliação 200×). (c) Adipócitos sujeitos ao tratamento com XN 20 μ M ao dia 7 da diferenciação (ampliação 400×).

O XN aumentou a apoptose

Avaliou-se a apoptose de pré-adipócitos e de adipócitos tratados com XN durante 24 h. Durante a apoptose ocorre a quebra da molécula de ADN originando pequenos fragmentos com a extremidade 3'-OH livre. Estes fragmentos podem ser identificados pela ligação de nucleotídeos marcados com fluoresceína à extremidade livre da molécula fragmentada. De seguida, os núcleos marcados são detectados por microscopia de fluorescência. Os núcleos totais são corados de azul (DAPI), enquanto que os núcleos das células em apoptose são corados de verde (**Figuras 8 e 9**). Além disso, nos tratamentos com XN, também foi possível verificar a presença de núcleos com a cromatina condensada e com menores dimensões, o que também é indicador da ocorrência de apoptose.

O tratamento com XN aumentou o número de núcleos apoptóticos em cerca de 50% nos pré-adipócitos, embora esta diferença não tenha atingido significado estatístico (**Figura 10a**). Nos adipócitos, o tratamento com XN aumentou significativamente a apoptose, cerca de 6 vezes em relação ao controlo ($p < 0,05$) (**Figura 10b**).

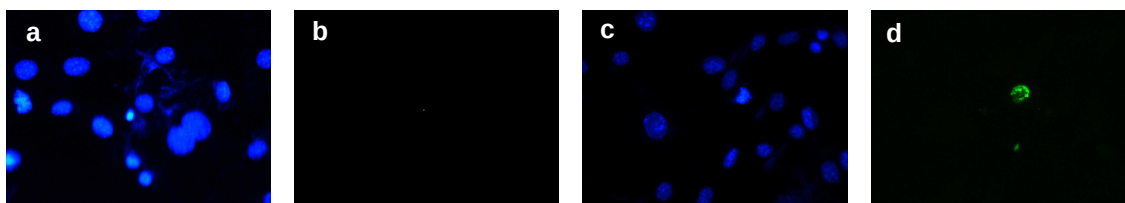


Figura 8 – Fotografias de microscopia de fluorescência de pré-adipócitos sujeitos a tratamento com veículo (b) ou com xanto-humol 5 μ M (d) em apoptose. Coradas de azul (a e c) aparecem todas as células enquanto que a verde aparecem os núcleos de células em apoptose. As fotografias foram obtidas com uma ampliação de 400 $\times$.

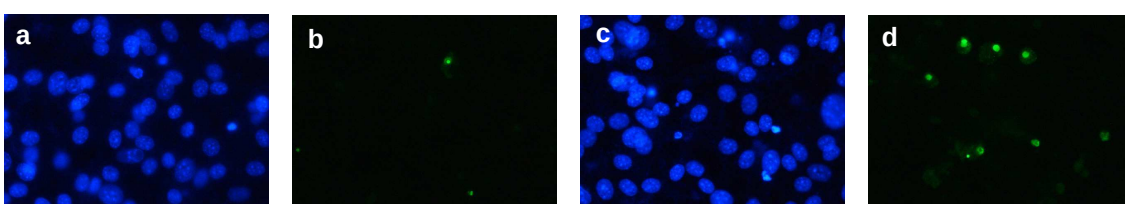


Figura 9 – Fotografias de microscopia de fluorescência de adipócitos sujeitos a tratamento com veículo (b) ou com xanto-humol 5 μ M (d) em apoptose. Coradas de azul (a e c) aparecem todas as células enquanto que a verde aparecem os núcleos de células em apoptose. As fotografias foram obtidas com uma ampliação de 400 $\times$.

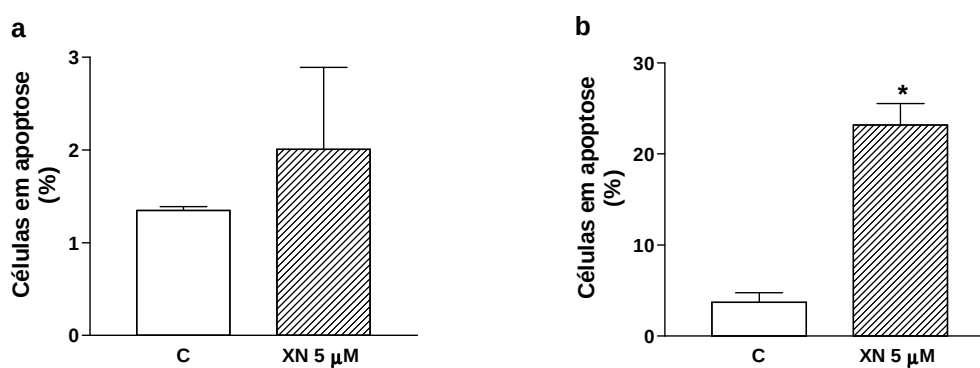


Figura 10 – Efeito do xanto-humol (XN) na apoptose de pré-adipócitos (a) e adipócitos (b). Os pré-adipócitos foram tratados 24 h após a cultura e os adipócitos foram tratados 7 dias após a diferenciação com XN durante 24 h. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de três experiências independentes realizadas em triplicado. * $p < 0,05$ vs respectivo controle.

DISCUSSÃO

Actualmente, a investigação de compostos alimentares com actividade biológica de interesse para o tratamento ou prevenção da obesidade tem aumentado. É o caso do chá verde (e dos seus componentes epigallocatequina-3-galato e catequinas), da soja (genisteína) e do pimento vermelho (capsaicina), entre outros^(3, 12). Para muitos deles foi já demonstrada uma associação positiva entre o seu consumo e a redução do risco de ocorrência de obesidade⁽²⁴⁾ em que os seus efeitos directos no TA justificam, com frequência, esta associação.

A obesidade resulta no aumento do TA devido ao excesso de ingestão energética, conjugado com o baixo gasto energético⁽¹²⁾. A associação entre a obesidade e a activação de vias de sinalização celulares envolvidas na resposta ao stresse e à inflamação começa a ser cada vez mais conhecida⁽²⁵⁾. Os indivíduos obesos apresentam níveis plasmáticos elevados de citocinas inflamatórias⁽⁶⁾. O adipócito é capaz de segregar muitas dessas citocinas, como o factor de necrose tumoral alfa, interleucina-6 e factor de quimiotaxia para monócitos-1, mas também adipocitocinas, exclusivamente expressas pelo TA, como a leptina, adiponectina e resistina^(6, 26). O tamanho do adipócito parece ser importante para a origem da inflamação no TA, existindo uma relação entre o tamanho do adipócito e o perfil de secreção de citocinas. Adipócitos de pequeno tamanho segregam mais adiponectina, proteína com propriedade anti-inflamatória, do que os adipócitos de grande tamanho, enquanto que estes segregam mais factor de necrose tumoral alfa, uma citocina inflamatória, em relação aos de menores dimensões⁽⁶⁾. Poderá ser por este motivo que a obesidade hipertrófica, caracterizada pela presença de adipócitos de grande tamanho, está relacionada com as complicações metabólicas da obesidade, como a resistência à insulina,

dislipidemias, hipertensão resultando aumento da incidência de doenças cardiovasculares e diabetes de tipo 2⁽²⁷⁾. Esta característica morfológica do TA pode explicar alguns casos em que indivíduos magros desenvolvem alterações nos seus perfis metabólicos. De facto, de acordo com Bernstein (1975) concluiu que o único parâmetro de composição corporal que distinguia indivíduos magros saudáveis de indivíduos magros com hiperlipoproteinemia, era o tamanho dos adipócitos⁽²⁸⁾. Deste modo, parece prioritário reduzir o tamanho do adipócito para reduzir o risco de inflamação no TA, e assim minorar as complicações metabólicas associadas à obesidade.

Neste estudo, exploraram-se os efeitos do XN na linha celular 3T3-L1 de pré-adipócitos de Ratinho. Este flavonóide pode encontrar-se em alguns tipos de cerveja, embora em concentrações reduzidas, sendo proveniente do lúpulo⁽¹⁴⁾. Ultimamente têm sido documentados diferentes efeitos celulares deste composto, mas os seus efeitos no TA são ainda pouco conhecidos. No presente estudo, demonstrou-se que o XN reduziu a proliferação dos pré-adipócitos de uma forma dependente da concentração. O efeito anti-proliferativo deste flavonóide já tinha sido anteriormente demonstrado em diversas linhas de células tumorais humanas de carcinoma da mama (MCF-7), carcinoma do cólon (HT-29) e carcinoma do ovário (A2780)⁽²⁰⁾.

Os pré-adipócitos são células com uma morfologia fibroblástica com elevada capacidade proliferativa em que, quando atingem a confluência, o contacto entre as células resulta na inibição da proliferação⁽⁷⁾. Por esta razão os ensaios de proliferação celular foram efectuados na pré-confluência, tendo as células sido semeadas numa densidade previamente determinada para que não atingissem a confluência durante as 72 h de tratamento. O efeito do XN foi mais marcado

quando as células foram incubadas com o composto durante 48 e 72 h, em comparação com a incubação de 24 h. Estes resultados, obtidos a partir da medição das proteínas celulares, foram também confirmados pela identificação do Ki67, marcador de proliferação celular, após tratamento com 5 μ M de XN. Embora nesta concentração, após 24 h de tratamento, não se verificasse redução do conteúdo proteico da cultura, a expressão do marcador envolvido na proliferação já estava reduzida.

Diferentes propriedades biológicas do XN têm sido relacionadas com o seu efeito anti-proliferativo. Num ensaio *in vitro*, o XN inibiu a actividade da enzima polimerase α humana do ADN, enzima responsável pelos passos iniciais da síntese de ADN, apresentando um IC_{50} de $23 \pm 3,5 \mu M$ ⁽¹⁸⁾. Além disso, está descrita a relação entre a capacidade anti-oxidante de vários compostos fenólicos e o seu efeito na proliferação celular de pré-adipócitos 3T3-L1, tendo sido demonstrado que quanto maior a capacidade anti-oxidante, menor a proliferação celular dos pré-adipócitos⁽²⁹⁾. Como os demais flavonóides, o XN é também um potente anti-oxidante. Tanto o XN como o seu produto de oxidação desmetil-XN são anti-oxidantes eficazes na prevenção da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade⁽³⁰⁾. No entanto, uma dose excessiva de anti-oxidantes poderá desequilibrar o estado redox celular⁽³¹⁾, favorecendo um ambiente oxidado e aumentando a sua resistência aos indutores da proliferação⁽³²⁾. Este efeito poderá ser mais evidente para as concentrações mais elevadas de XN, que para além de terem reduzido a proliferação de forma acentuada, também induziram citotoxicidade.

Um outro dado importante deste trabalho está relacionado com a observação de que o XN foi capaz de reduzir a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos.

Para se tentar compreender a forma de actuação deste flavonóide no processo de diferenciação, as células foram tratadas em diferentes períodos da diferenciação. Quando os pré-adipócitos atingem a confluência, o contacto entre as células activa vias de sinalização que vão interromper o ciclo celular. Esta é uma fase importante na transição entre a proliferação celular e a diferenciação, apesar de não constituir um pré-requisito no processo de conversão em adipócitos maduros⁽⁷⁾. Nessa fase alguns pré-adipócitos começam a expressar factores de diferenciação precoces envolvidos na diferenciação destas células. No entanto, para activar o programa de diferenciação nos pré-adipócitos *in vitro*, de forma sincronizada, é necessário utilizar uma mistura de indutores adipogénicos, que consiste habitualmente em IBMX, dexametasona e insulina⁽⁷⁾. Passadas 24 h do início da diferenciação ocorre uma amplificação clonal. Nesta fase, os pré-adipócitos, que tinham o ciclo celular interrompido, prosseguem o ciclo celular e passam por uma mitose pós-confluência e uma expansão clonal, que consiste em duplicação celular. Estes dois acontecimentos são cruciais na diferenciação⁽³³⁾. Os genes necessários para o início da adipogénese começam a ser expressos. Dois dias após a indução da diferenciação há novamente a interrupção do ciclo celular nos pré-adipócitos. Neste momento estão comprometidos a diferenciarem-se em adipócitos maduros. Ao fim de 3 dias já expressam marcadores de diferenciação tardios, e entre o dia 5º e o 7º ficam mais esféricos e começam a acumular gotículas lipídicas, estando completamente diferenciados no final deste período⁽⁷⁾.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o XN teve um efeito anti-adipogénico, revelado pela diminuição do conteúdo de lípidos no interior das células, de forma dependente da concentração. No entanto, este efeito só foi

evidente quando o XN esteve em contacto com as células durante a pós-confluência e/ou durante a fase de indução da diferenciação. Este resultado parece sugerir que o efeito anti-proliferativo, anteriormente evidenciado, do XN poderá estar implicado na inibição da adipogénese, uma vez que, conforme já foi referido, a mitose pós-confluência e a expansão clonal são fundamentais para a diferenciação. O facto deste composto não ter alterado a acumulação de lípidos quando incubado com as células após a indução da diferenciação parece apoiar esta suposição. Este é um efeito similar ao da genisteína, que bloqueia a diferenciação dos pré-adipócitos apenas quando está presente nas 72 h após o início da diferenciação, e este facto foi justificado pelo seu efeito anti-proliferativo nos pré-adipócitos pós-confluentes⁽³³⁾.

Por outro lado, é ainda possível que o XN tenha interferido na sinalização celular dos agentes de diferenciação. A acção do IBMX decorre através da inibição da fosfodiesterase, com o consequente aumento dos níveis de AMPc que posteriormente activa o factor de transcrição *cyclic AMP response element-binding protein*, um dos eventos mais precoces na diferenciação⁽⁷⁾. A dexametasona, tal como os glicocorticóides endógenos, actua nos receptores de glicocorticóides facilitando a expressão de novos factores de transcrição⁽⁷⁾. A sinalização pela insulina parece ser mediada pela sua interacção com o receptor para o IGF-1 (*insulin-like growth factor*), já que os pré-adipócitos não expressam o receptor da insulina⁽³³⁾.

As prostaglandinas estimulam a ciclase do adenilato aumentando a produção do AMPc que está envolvido no processo de adipogénese⁽³⁴⁾. Sabe-se que o XN inibe a ciclo-oxigenase tipo 1 (constitutiva) e a ciclo-oxigenase tipo 2 (indutível) reduzindo a produção de prostaglandinas⁽³⁵⁾. Assim, esta propriedade do XN

poderá constituir um mecanismo adicional para explicar a inibição da diferenciação, apesar da adição do inibidor da fosfodiesterase, o IBMX.

Da mesma forma, o XN poderá ter interferido na sinalização da insulina. O XN inibe a activação do Akt⁽²¹⁾. O Akt pertence à família das cínases de resíduos serina/treonina e é um mediador intracelular que é activado quando a insulina se liga ao seu receptor ou ao IGF-1^(21, 36). Estas vias de sinalização são essenciais no controlo dos mecanismos envolvidos na diferenciação celular⁽²¹⁾. Alguns polifenóis bloqueiam a adipogénese, e este facto foi justificado com a sua interferência na via de sinalização activada pela insulina, através da sua capacidade de inibir as cínases de tirosina, impedindo a fosforilação do receptor da insulina e sua consequente activação⁽³⁷⁾.

A fosfátase alcalina é uma enzima expressa em diversos tipos celulares que parece estar envolvida na diferenciação celular e no desenvolvimento tecidual⁽²²⁾. Recentemente foi demonstrada a expressão desta enzima nos pré-adipócitos 3T3-L1, possivelmente na membrana da gotícula lipídica, tendo um papel importante na acumulação de lípidos⁽³⁸⁾. A inibição da sua actividade bloqueou a acumulação lipídica, reduzindo a adipogénese nas 3T3-L1, que leva a crer que a sua actividade é importante para a diferenciação⁽³⁸⁾. Já foi demonstrado que o XN inibe a expressão e a actividade da fosfátase alcalina nouro tipo de células⁽²²⁾. Um estudo preliminar realizado no nosso laboratório também demonstrou que a actividade da fosfátase alcalina em pré-adipócitos era reduzida pela incubação com 20 μ M de XN (resultados não mostrados).

As características redox do XN também poderão ter contribuído para os efeitos na diferenciação. Tem sido demonstrado que o stresse oxidativo impede a diferenciação dos pré-adipócitos^(39, 40).

Um outro evento que poderá ser importante para determinar o número de células no TA é a morte celular, nomeadamente por apoptose. Este fenómeno pode ocorrer no TA tanto em pré-adipócitos como em adipócitos⁽⁴¹⁾. Assim, testou-se o efeito do XN na apoptose das células nos dois estadios de desenvolvimento. O XN aumentou a morte celular programada de forma significativa em adipócitos. Nos pré-adipócitos também parecia induzir a apoptose, embora esta diferença não apresentasse significado estatístico.

Estudos anteriores têm relacionado o XN com a actividade pró-apoptótica⁽¹⁸⁾. Um trabalho realizado numa linha celular de cancro do cólon demonstrou o envolvimento do XN na via extrínseca e intrínseca (mitocondrial) de sinalização da apoptose. O tratamento com XN aumentou a clivagem da pró-caspase-8 e consequente activação das caspases-3 e -7, envolvidas na via extrínseca, e reduziu a expressão do anti-apoptótico Bcl-2 e activou a caspase-9, envolvidos na via intrínseca⁽³⁵⁾. Este facto pode ser explicado pelo possível efeito pró-oxidante do XN quando presente em elevada concentração. Muitos autores referem a actividade pró-oxidante dos compostos fenólicos como um factor importante na toxicidade mitocondrial e na apoptose⁽¹⁵⁾. O excesso de anti-oxidantes na presença de metais de transição ou de peroxidases podem provocar um desequilíbrio no estado redox intracelular, resultando em lesões nas estruturas celulares e activando vias de sinalização da apoptose⁽³¹⁾. Estudos anteriores com outros polifenóis revelaram a sua capacidade de provocar a depleção ou oxidação de um dos mais importantes anti-oxidantes intracelulares, a glutathiona reduzida, em hepatócitos⁽³⁵⁾. O estado redox da célula é determinante para o modo como as células respondem aos estímulos externos, e quando o meio

intracelular está mais oxidado, a célula torna-se mais susceptível aos indutores de apoptose celular^(32, 42).

Segundo os nossos resultados, o XN parece contribuir para a redução do número de células acumuladoras de gordura, tanto pela diminuição da proliferação das células precursoras como pela indução da apoptose, o que sugere que pode contribuir para a redução do número de adipócitos diferenciados. Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado em ratinhos KK-A^y diabéticos tratados com uma dieta suplementada em XN em que se verificou uma redução do TA nos animais tratados⁽⁴³⁾. No entanto, a redução do número de adipócitos diferenciados provavelmente resultará num aumento do seu tamanho que, como já foi referido, leva a um perfil de secreção de citocinas mais desfavorável⁽⁶⁾.

Por esse motivo é importante chamar a atenção da indústria alimentar, que procura enriquecer a cerveja neste composto, com base em estudos que apontam para efeitos benéficos do XN. Este estudo vem mostrar que o benefício do XN é incerto, e o consumo de alimentos fortificados ou de suplementos com o intuito de melhorar a saúde pode suscitar efeitos desfavoráveis no desenvolvimento equilibrado do TA e no processo inflamatório associado, sugerindo que não é o composto ideal para ser usado no tratamento da obesidade e na melhoria das suas complicações metabólicas.

Por esta razão, torna-se imperativo esclarecer o envolvimento do XN na hipertrofia e na hiperplasia dos adipócitos e o seu possível benefício.

CONCLUSÕES

O xanto-humol:

- Reduziu a proliferação dos pré-adipócitos;
- Reduziu a diferenciação dos pré-adipócitos, principalmente quando o XN estava presente durante a expansão clonal e a indução da diferenciação;
- Aumentou a apoptose nos pré-adipócitos e nos adipócitos.

Assim, o XN parece contribuir para a redução do número de adipócitos diferenciados, o que possivelmente resultará na hipertrofia dos adipócitos presentes. Tendo em conta as consequências da hipertrofia dos adipócitos, estes resultados sugerem que o XN, apesar de ter potencial para reduzir o TA, não será favorável para a redução das consequências metabólicas associadas à obesidade.

Para esclarecer o motivo da menor acumulação lipídica nos adipócitos tratados com XN, seria necessário pesquisar o efeito deste composto na lipogénese e na lipólise. Pesquisas já iniciadas no nosso laboratório sugerem o aumento da lipogénese e a diminuição da lipólise basal nos adipócitos tratados com XN (resultados não mostrados).

De futuro, será necessário realizar mais estudos para confirmar os efeitos do XN sobre a diferenciação, pesquisando a expressão de proteínas e/ou ARN de marcadores de pré-adipócitos, como o Pref-1 (*preadipocyte factor-1*), e de adipócitos, como o PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). Por fim, para complementar todos estes resultados, seria também interessante aprofundar o conhecimento dos efeitos deste composto na remodelação do TA *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes Res.* 2005; 13:982-90.
 2. Kielmann R, Herpertz S. Psychological factors in development and treatment of obesity. *Herz.* 2001; 26:185-93.
 3. Jeffcoat R, Roberts PA, James AT. The control of lipogenesis by dietary linoleic acid and its influence on the deposition of fat. *Eur J Biochem.* 1979; 101:447-53.
 4. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem.* 2007; 42:63-91.
 5. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 2007; 48:1253-62.
 6. Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J Endocrinol Invest.* 2007; 30:210-4.
 7. Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 56:472-92.
 8. Miller WH, Jr., Faust IM, Hirsch J. Demonstration of de novo production of adipocytes in adult rats by biochemical and radioautographic techniques. *J Lipid Res.* 1984; 25:336-47.
-

9. Haller H, Leonhardt W, Hanefeld M, Julius U. Relationship between adipocyte hypertrophy and metabolic disturbances. *Endokrinologie*. 1979; 74:63-72.
 10. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292:E166-74.
 11. Monteiro R, de Castro PM, Calhau C, Azevedo I. Adipocyte size and liability to cell death. *Obes Surg*. 2006; 16:804-6.
 12. Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338:694-9.
 13. Mochizuki M, Hasegawa N. Effects of green tea catechin-induced lipolysis on cytosol glycerol content in differentiated 3T3-L1 cells. *Phytother Res*. 2004; 18:945-6.
 14. Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, Rong H, De Keukeleire D. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:4912-5.
 15. Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem*. 2000; 48:3876-84.
 16. Wunderlich S, Zurcher A, Back W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49:874-81.
 17. Miranda CL, Yang YH, Henderson MC, Stevens JF, Santana-Rios G, Deinzer ML, Buhler DR. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of
-

- the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28:1297-302.
18. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer.* 2005; 41:1941-54.
19. Goto K, Asai T, Hara S, Namatame I, Tomoda H, Ikemoto M, Oku N. Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Lett.* 2005; 219:215-22.
20. Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37:271-85.
21. Albin A, Dell'Eva R, Vene R, Ferrari N, Buhler DR, Noonan DM, Fassina G. Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *Faseb J.* 2006; 20:527-9.
22. Guerreiro S, Monteiro R, Martins MJ, Calhau C, Azevedo I, Soares R. Distinct modulation of alkaline phosphatase isoenzymes by 17beta-estradiol and xanthohumol in breast cancer MCF-7 cells. *Clin Biochem.* 2007; 40:268-73.
23. Simons PJ, van den Pangaart PS, van Roomen CP, Aerts JM, Boon L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-treated human preadipocytes are potent leptin producers. *Cytokine.* 2005; 32:94-103.
24. Furuyashiki T, Nagayasu H, Aoki Y, Bessho H, Hashimoto T, Kanazawa K, Ashida H. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by
-

- down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68:2353-9.
25. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004; 306:457-61.
26. Neels JG, Pandey M, Hotamisligil GS, Samad F. Autoamplification of tumor necrosis factor-alpha: a potential mechanism for the maintenance of elevated tumor necrosis factor-alpha in male but not female obese mice. *Am J Pathol.* 2006; 168:435-44.
27. Bray GA, Ryan DH. Clinical evaluation of the overweight patient. *Endocrine.* 2000; 13:167-86.
28. Bernstein RS, Grant N, Kipnis DM. Hyperinsulinemia and enlarged adipocytes in patients with endogenous hyperlipoproteinemia without obesity or diabetes mellitus. *Diabetes.* 1975; 24:207-13.
29. Hsu CL, Huang SL, Yen GC. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2006; 54:4191-7.
30. Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry.* 2004; 65:1317-30.
31. Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res.* 2007; 73:341-7.
32. Noble M, Mayer-Proschel M, Proschel C. Redox regulation of precursor cell function: insights and paradoxes. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7:1456-67.
33. Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280:C807-13.
-

34. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology. New York: WH Freeman & Co; 2000.
 35. Pan L, Becker H, Gerhauser C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. Mol Nutr Food Res. 2005; 49:837-43.
 36. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell. 2007; 129:1261-74.
 37. Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function *in vitro* and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. Biochemistry. 1992; 31:8059-63.
 38. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, Psaras G, Ikram F, Crowther NJ. The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes. Anal Biochem. 2006; 354:247-54.
 39. Galinier A, Carriere A, Fernandez Y, Carpene C, Andre M, Caspar-Bauguil S, Thouvenot JP, Periquet B, Penicaud L, Casteilla L. Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. J Biol Chem. 2006; 281:12682-7.
 40. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest. 2004; 114:1752-61.
 41. Ambati S, Kim HK, Yang JY, Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Pharmacol. 2007; 73:378-84.
-

42. Borrás C, Esteve JM, Vina JR, Sastre J, Vina J, Pallardo FV. Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004; 279:34332-5.
43. Nozawa H. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336:754-61.
-