

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE OS PARÂMETROS DE VIABILIDADE,
PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NA LINHAGEM
CELULAR GRX

LEO ANDERSON MEIRA MARTINS

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Co-Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Porto Alegre

2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE OS PARÂMETROS DE VIABILIDADE,
PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NA LINHAGEM
CELULAR GRX

LEO ANDERSON MEIRA MARTINS

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Co-Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2008

“There's nothing you can do that can't be done. Nothing you can sing that can't be sung. [...] Nothing you can do but you can learn how to be you in time.”

Lennon/McCartney – All you need is love

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes durante toda minha formação acadêmica em diferentes aspectos. De fato, creio ser indispensável, o agradecimento às pessoas que foram fundamentais para a realização deste trabalho, que se agregaram ao grupo daquelas que, desde sempre, contribuíram para meu amadurecimento profissional e pessoal. Desta maneira, segue-se esta pequena lista, vez que uma lista completa se torna inviável:

À professora Fátima Guma pelo apoio, pela paciência, pela confiança e pela orientação precisa.

À professora Carmem Gottfried pela imensa contribuição a esta pesquisa e pela co-orientação igualmente precisa.

À Izabel Souza que me levou para o Departamento de Bioquímica para auxiliá-la – assim permitindo que eu tivesse todo o aprendizado, como aluno de iniciação científica – pela parceria no estudo dos efeitos do resveratrol sobre a célula GRX.

À Babi Coelho, aluna de iniciação científica, pela dedicação e pela competência empregadas ao presente estudo; pelas discussões sobre a bioquímica e sobre os acordes dissonantes e os campos harmônicos musicais que certamente enriqueceram meu conhecimento em ambas as áreas.

Ao professor Zé Cláudio pela elucidação das dúvidas que tive durante a elaboração deste trabalho e ao Guilherme Behr pela contribuição e explicações acerca de algumas técnicas desenvolvidas neste estudo.

A todas minhas colegas do laboratório 21 – professora Regina, Cláudia, Lica, Sílvia, Fran, Cíntia, Jô, Helô, Thaís, Pê, Mariana – e ao Bruno pela amizade, pela ajuda de sempre e pela convivência agradável.

À Renata Abib e ao Max Will pela grande amizade do começo do curso que continuará certamente, qualquer que sejam nossos caminhos.

Aos demais colegas da Bioquímica com quem compartilhei idéias, dúvidas, futebol ou música.

A todos profissionais e professores do Departamento de Bioquímica; à dona Lia pelo importante trabalho que facilitou muito o desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus professores de graduação que terei sempre como uma excelente referência, Marcos Machado e Elenir Willand.

Ao meu colega da graduação, Cléverson Oliveira.

Aos meus amigos do VG futebol clube e da Sociedade Mambembe.

Aos meus amigos de sempre, Edgar Kisek e Guilherme Sohne.

Aos meus amigos que não foram citados aqui.

A todos meus familiares; ao Telmo, à Maria Augusta e à Kika.

Por fim, mas especialmente, à minha mãe, Maria Rita, pelo apoio de sempre e pela enorme ajuda com os textos em inglês; e ao meu irmão Pablo pela música e literatura.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada da seguinte maneira:

PARTE I

Introdução contendo referências da literatura que fundamentam este trabalho.

Objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

PARTE II

Capítulo I: Manuscrito para publicação em periódico internacional.

Capítulo II: Resultados complementares.

PARTE III

Discussão contendo a interpretação dos resultados apresentados nos dois capítulos da parte II.

Conclusões finais.

Perspectivas.

REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas citadas nas partes I e II.

ANEXOS

Lista de Figuras.

Lista de Tabelas

SUMÁRIO

PARTE I

I.1. RESUMO.....	8
I.2. ABSTRACT.....	9
I.3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
I.4. INTRODUÇÃO.....	11
<i>I.4.1. Fibrose Hepática.....</i>	<i>11</i>
<i>I.4.2. As células estreladas hepáticas (HSCs).....</i>	<i>13</i>
<i>I.4.3. Linhagem celular GRX.....</i>	<i>17</i>
<i>I.4.4. Resveratrol (3,4',5-tri-hidroxi-trans-estilbeno).....</i>	<i>19</i>
<i>I.4.5. Radicais livres, Espécies reativas de oxigênio e Estresse oxidativo.....</i>	<i>21</i>
I.5. OBJETIVOS.....	26
<i>I.5.1. Objetivo Geral.....</i>	<i>26</i>
<i>I.5.2. Objetivos Específicos.....</i>	<i>26</i>

PARTE II

II.1. ARTIGO.....	28
II.2. RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	54
<i>II.2.1. Efeito do RSV sobre a migração da GRX.....</i>	<i>55</i>
<i>II.2.2. Efeito do RSV sobre o conteúdo tiólico da GRX.....</i>	<i>59</i>

PARTE III

III.1. DISCUSSÃO.....	62
III.2. CONCLUSÕES.....	74
III.3. PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS.....	76

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS.....	87
LISTA DE TABELAS.....	88

PARTE I

I.1. RESUMO

A fibrose e a cirrose hepática são doenças crônicas do fígado que representam uma das maiores causas de mortalidade humana. A GRX é uma linhagem representativa das células estreladas hepáticas (HSC), que estão associadas ao desenvolvimento da fibrose que, em último estágio, acarreta em cirrose. No fígado saudável, estas células apresentam um fenótipo quiescente ou lipocítico, caracterizado pela sua capacidade de armazenar gotas lipídicas. Danos contínuos ao fígado desencadeiam uma resposta que gera estímulos autócrinos e parácrinos mediados por citocinas e espécies reativas de oxigênio. Este quadro leva a uma modulação destas células ao fenótipo ativado ou miofibroblástico, relacionada com um aumento da capacidade de produzir componentes de matriz extracelular, cuja deposição exagerada configura o estado patológico da fibrose. O resveratrol (RSV – 3,4',5-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno) é uma fitoalexina produzida por algumas espécies de plantas, ao qual são atribuídos inúmeros efeitos benéficos devido a sua capacidade antioxidante, antiproliferativa e pró-apoptótica. Recentemente, tem se discutido um possível efeito pró-oxidante desta molécula em alguns sistemas celulares. O presente estudo mostra que a dose de 50 µM de RSV induziu uma diminuição da viabilidade e da proliferação celular nas células GRX devido a um efeito pró-oxidante observado nas primeiras 24 horas de tratamento. Essas alterações foram atenuadas ao longo de 120 horas de exposição. Observamos um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e uma diminuição da atividade da catalase (CAT) no grupo que recebeu 50 µM de RSV em 120 horas de tratamento, que resulta em um desequilíbrio na atividade de ambas enzimas e possivelmente gera uma produção alta de H₂O₂. As células que receberam 50 µM de RSV apresentaram dano mediado por lipoperoxidação, tanto em 24 horas quanto em 120 horas de exposição, embora este parâmetro tenha sido menor no modelo crônico. De maneira complementar, avaliamos os efeitos do RSV sobre os parâmetros de migração das células GRX. Observamos um aumento na capacidade de migração destas células já nas primeiras 8 horas de exposição às doses de 1, 10 e 50 µM de RSV. Estes resultados mostraram que o RSV induz um aumento de migração e uma adaptação das células GRX que sobrevivem ao choque tóxico das primeiras 24 horas.

I.2. ABSTRACT

Fibrosis and hepatic cirrhosis are chronic diseases of the liver, standing for one of the highest causes of human mortality. GRX cell line is representative of hepatic stellate cells (HSC) that are associated to fibrosis development which, at its last stage, turns into cirrhosis. In a healthy liver, such cells present a quiescent or lipocytic phenotype, characterized by its capacity to store lipid droplets. Continuous injuries to the liver generate autocrine and paracrine stimuli mediated by cytokines and reactive oxygen species (ROS). This may cause modulation to the activated or myofibroblastic phenotype, related to an increase of cells capacity to produce matrix components which excessive deposition is responsible for the pathologic condition of fibrosis. Resveratrol (RSV – 3,4',5-tri-hidroxi-*trans*-stilbeno) is a phytoalexin produced by some species of plants. Several beneficial effects are attributed to this molecule due to its antioxidant, antiproliferative and pro-apoptotic capacity. Recently, a possible pro-oxidant effect of this molecule in some cell systems has been put into discussion. The present study shows that 50 μ M of RSV induced a decreased cell viability and proliferation of GRX cells due a pro-oxidant effect during the first 24 hours of treatment. These alterations were attenuated during 120 hours of exposure. We observed an increased SOD activity as well as a decreased CAT activity, in the 50 μ M RSV-treated group at 120 hours of treatment, leading to an imbalance in the ratio of both enzymes activities, and possibly resulting in an over-production of H₂O₂. The cells that received 50 μ M RSV presented oxidative damage, mediated by lipoperoxidation, at 24 hours as well as at 120 hours, although some of these parameters were smaller in the chronic model. Additionally, we evaluated RSV effects on the GRX cell migration. We observed an increase in the migration capacity of these cells during the first 8 hours of exposition to the 1, 10 and 50 μ M RSV. Such results demonstrate that RSV induces migration increase as well as an adaptation of GRX cells which survive the first 24-hour toxic shock.

I.3. LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 – Proteína ativadora 1

CAT – Catalase

DCF-DA – Diclorofluoresceína-Diacetato

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GRX – Linhagem celular representativa das células estreladas hepáticas

GSH – Glutathiona

HSC – Célula estrelada hepática

LCTC – Célula de tecido conjuntivo hepático

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno

MRC-5 – Linhagem celular representativa de fibroblastos pulmonares

MDA – Malondialdeído

RL– Radicais livres

RSV – Resveratrol

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- β – Fator de crescimento tumoral β

I.4. INTRODUÇÃO

I.4.1. Fibrose Hepática

As doenças crônicas do fígado estão entre as maiores causas de mortalidade humana. Neste contexto, a fibrose hepática e a cirrose representam as manifestações patológicas mais comuns e figuram entre os maiores problemas mundiais de saúde (Elsharkawy *et al.*, 2005; Loterztajn *et al.*, 2005).

A cirrose hepática, estado patológico conseqüente da fibrose, é caracterizada pela formação de nódulos e pela alteração da função hepática devido à morte de hepatócitos e à transformação anatômica do fígado. Os sinais clínicos referentes a esta doença variam desde um desenvolvimento assintomático até falência total do fígado. Cerca de 40% dos pacientes com diagnóstico de cirrose não apresentam os sintomas, que incluem inchaço abdominal, hipertensão portal, encefalopatia e icterícia. Quando as complicações decorrentes da cirrose surgem, a deterioração hepática pode ser irreversível (Tsukada *et al.* 2006; Friedman 2003). Acerca deste aspecto, é importante destacar que as implicações clínicas e anatômicas da cirrose podem ser avaliadas separadamente. Indivíduos que apresentam sinais clínicos de cirrose por abuso alcoólico ou infecção viral crônica (hepatite B ou C) podem não apresentar sintomas quando submetidos a tratamentos que atenuem ou removam a ação desses insultos. No entanto, é possível que não haja, necessariamente, uma recuperação anatômica do órgão, o que indicaria que apenas os aspectos clínicos da cirrose podem ser reversíveis (Kumar & Sarin 2007).

O termo fibrose é utilizado para definir o acúmulo excessivo de tecido conjuntivo em órgãos parenquimatosos (Poli, 2000). Em danos agudos ao fígado, o tecido hepático pode se regenerar por meio de reposição dos hepatócitos apoptóticos ou necróticos. Este processo é associado a uma resposta inflamatória e a uma deposição limitada de matriz extracelular. Quando os danos ao fígado são continuados ou crônicos, ocorre um processo de cicatrização que configura a fibrose hepática (Bataller & Brenner, 2005). Esta doença é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular que inclui três grandes famílias de proteínas: glicoproteínas, proteoglicanos e colágenos. Os colágenos do tipo I e III são os mais comumente associados ao desenvolvimento dessa patologia (Tsukada *et al.*, 2006). O desequilíbrio entre a produção e a degradação de matriz extracelular acarreta o acúmulo destas proteínas e provoca modificações na arquitetura normal do fígado, o que altera sua funcionalidade (Lotersztajn *et al.* 2005).

Muitos podem ser os estímulos adversos que desencadeiam o processo fibrogênico hepático. Tais estímulos incluem infecções virais, desordens metabólicas, doenças auto-imunes ou defeitos genéticos. O consumo de álcool, a hepatite C e a esteatose não-alcoólica aparecem entre as maiores causas de cirrose decorrente de fibrose hepática nos países ocidentais (Lotersztajn *et al.*, 2005). Vários estudos evidenciam que o estresse oxidativo pode representar uma ligação importante entre o dano contínuo ao fígado e a fibrose hepática. De fato, a lipoperoxidação produzida por estresse oxidativo está associada à fibrose hepática em resposta a alguns tipos de danos crônicos como, por exemplo, o excesso de ferro ou cobre, o abuso alcoólico e a hepatite C (Baroni *et al.* 1998, Poli 2000).

Nos últimos 20 anos, os conhecimentos acerca destas doenças hepáticas têm se desenvolvido muito. Tal evolução reflete o aumento do entendimento sobre a etiologia das doenças crônicas do fígado, sobre os métodos para sua detecção e sobre os mecanismos moleculares que as envolvem (Friedman 2003). As pesquisas mais recentes que buscam a compreensão destes processos sugerem uma possível capacidade de recuperação a partir de qualquer grau de fibrogênese hepática, incluindo a fibrose associada ao estado de cirrose (Kumar & Sarin 2007).

1.4.2. As Células Estreladas Hepáticas (HSC)

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e se localiza na cavidade abdominal, logo abaixo do músculo diafragma. Este órgão é constituído por unidades morfológicas denominadas lóbulos hepáticos. Em algumas regiões do fígado, os lóbulos hepáticos se apresentam visivelmente separados por tecido conjuntivo. Estas regiões são denominadas espaço porta e apresentam ramos capilares da veia porta e da artéria hepática, ducto biliar e vasos linfáticos. (Junqueira & Carneiro, 2004).

Nos lóbulos, os hepatócitos formam apenas uma camada celular e se dispõem em placas radiais. Nos espaços entre estas placas estão os sinusóides hepáticos: capilares sanguíneos que levam oxigênio e nutrientes aos hepatócitos e que são revestidos, de forma fenestrada, por células endoteliais. Entre os hepatócitos e os capilares sinusóides, encontra-se um espaço estreito denominado espaço de Disse, onde se localiza a célula estrelada hepática (HSC) (Junqueira & Carneiro, 2004). Atualmente é bem conhecido o papel das HSC como as principais células produtoras de colágeno

nos casos de insultos hepáticos crônicos (entre outros tipos celulares como fibrócitos derivados da medula óssea e fibroblastos portais e septais) o que permite relacioná-las estreitamente com a fibrose hepática (Li *et al.* 2008).

Morfologicamente, as HSC possuem longos processos citoplasmáticos que circundam as células endoteliais fazendo contato com os hepatócitos. Constituem uma população celular heterogênea que difere na capacidade de armazenamento de gotas lipídicas, na expressão e organização de filamentos do citoesqueleto e no potencial para produção de matriz extracelular. Esse aspecto reflete a capacidade de expressar dois fenótipos. No fígado saudável, as HSC apresentam um fenótipo “quiescente”, rico em gotas de vitamina A e com baixas taxas de proliferação e de síntese de colágeno tipo I. Em consequência de insultos crônicos ao fígado, estas células adquirem um fenótipo “ativado” com características de miofibroblasto. Nesta condição, há uma variação na disposição e conteúdo do citoesqueleto (as HSC passam a apresentar filamentos de actina em feixes, referidos como fibras de estresse), um aumento da taxa de proliferação e da síntese de matriz extracelular, bem como, uma perda na capacidade de armazenamento de vitamina A. (Hautekeete & Geerts, 1997; Friedman 2000).

Além do armazenamento e regulação do metabolismo da vitamina A, as HSC desempenham outras funções importantes no fígado normal. Estas se referem às evidências que as envolvem com o desenvolvimento e a regeneração hepática, com a ampliação da resposta inflamatória através da indução de infiltração leucocitária, com a secreção de lipoproteínas, de fatores de crescimento e de citocinas, com a detoxificação e a regulação de pH, e com a adipogênese, que inclui a expressão de fatores de transcrição adipogênicos

como C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , entre outros (Friedman 2008a; She *et al.* 2005).

A ativação das células HSC é uma resposta molecular que pode ser dividida em duas fases (Figura 1): iniciação e perpetuação. A fase de iniciação corresponde às primeiras mudanças na expressão gênica e no fenótipo celular. Estas alterações respondem a estímulos parácrinos dos tipos celulares vizinhos que incluem os hepatócitos, as células endoteliais, as células de Kupffer, linfócitos e demais leucócitos. A infiltração e ativação das células de Kupffer contribuem para a ativação das HSC, estimulando a produção de matriz extracelular e liberação de retinóides através da ação de citocinas (principalmente TGF- β) e da ação de lipoperóxidos, estes últimos, provenientes da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os hepatócitos que sofrem necrose também liberam ERO, portanto, também representam uma fonte de lipoperóxido fibrogênico. Já foi reportado que, mesmo quando há morte por apoptose, os fragmentos apoptóticos liberados pelos hepatócitos são promotores fibrogênicos e ativam as células de Kupffer (Friedman 2008a; Li *et al.* 2008).

A fase de perpetuação envolve algumas mudanças no comportamento das HSC, que amplificam seu estado de ativação em resposta aos mesmos estímulos parácrinos da fase de iniciação e aos estímulos autócrinos. Tais alterações se referem ao estímulo da proliferação e da capacidade de produção de matriz extracelular, ao aumento da capacidade de migração (quimiotaxia), ao aumento de contractibilidade (possivelmente relacionado ao aumento da resistência portal durante a fibrose hepática), à alteração na capacidade de degradação de matriz extracelular e à perda das gotas de vitamina A. Os principais efeitos destas mudanças se refletem essencialmente

na reorganização e no acúmulo de matriz extracelular que resultam na fibrose hepática (Figura 2) (Friedman 2008a; Li *et al.* 2008).

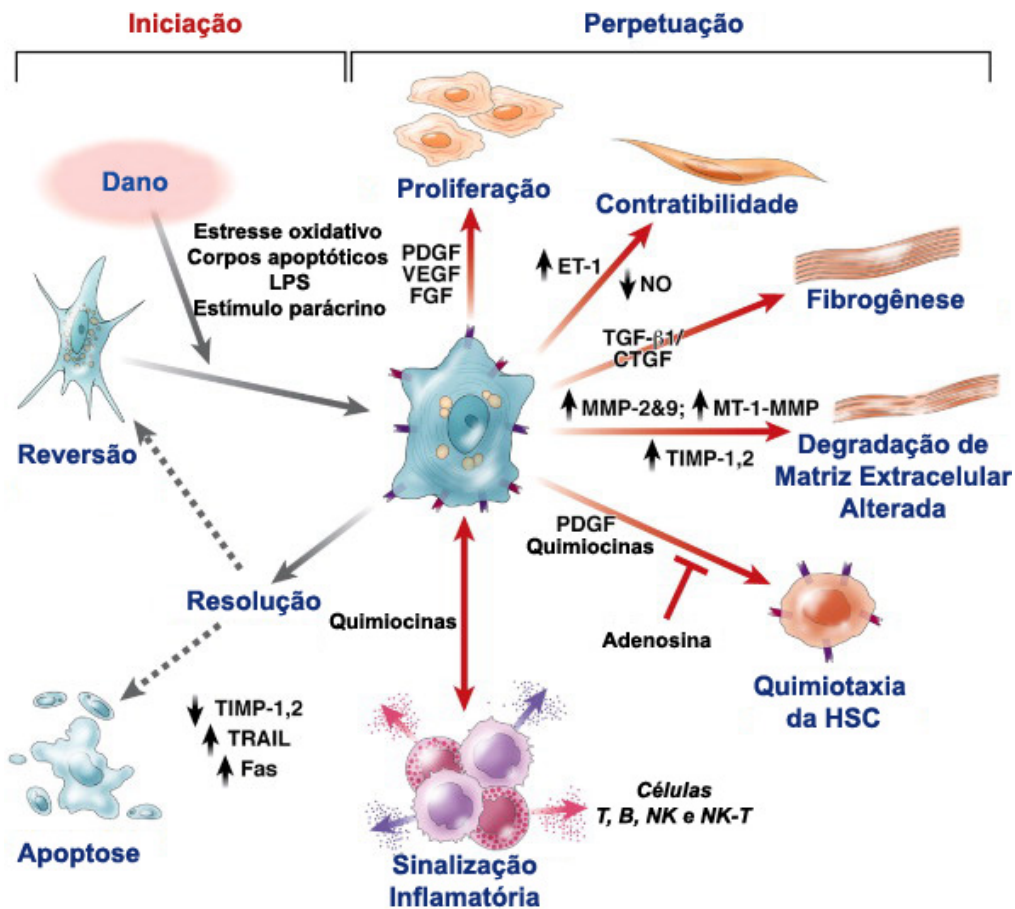


Figura 1. Vias de ativação da Célula Estrelada Hepática. Os aspectos envolvidos na ativação das HSC são distintos nas fases de iniciação e de perpetuação (Traduzida de Friedman 2008b).

Ainda não é claro o destino das HSC quando a fibrose e/ou a cirrose hepática se estabelecem, e não há um tratamento padrão para estas doenças. No entanto, nos últimos 20 anos o crescimento dos conhecimentos acerca da fibrose hepática revelou quais os alvos potenciais para o tratamento desta patologia. Tais alvos incluem a neutralização das respostas proliferativa, fibrogênica e contráctil das HSC, a promoção da degradação de matriz extracelular, o estímulo a apoptose, a modulação das citocinas envolvidas e,

também, a redução de estresse oxidativo (Li *et al.* 2008; Albanis & Friedman 2006).

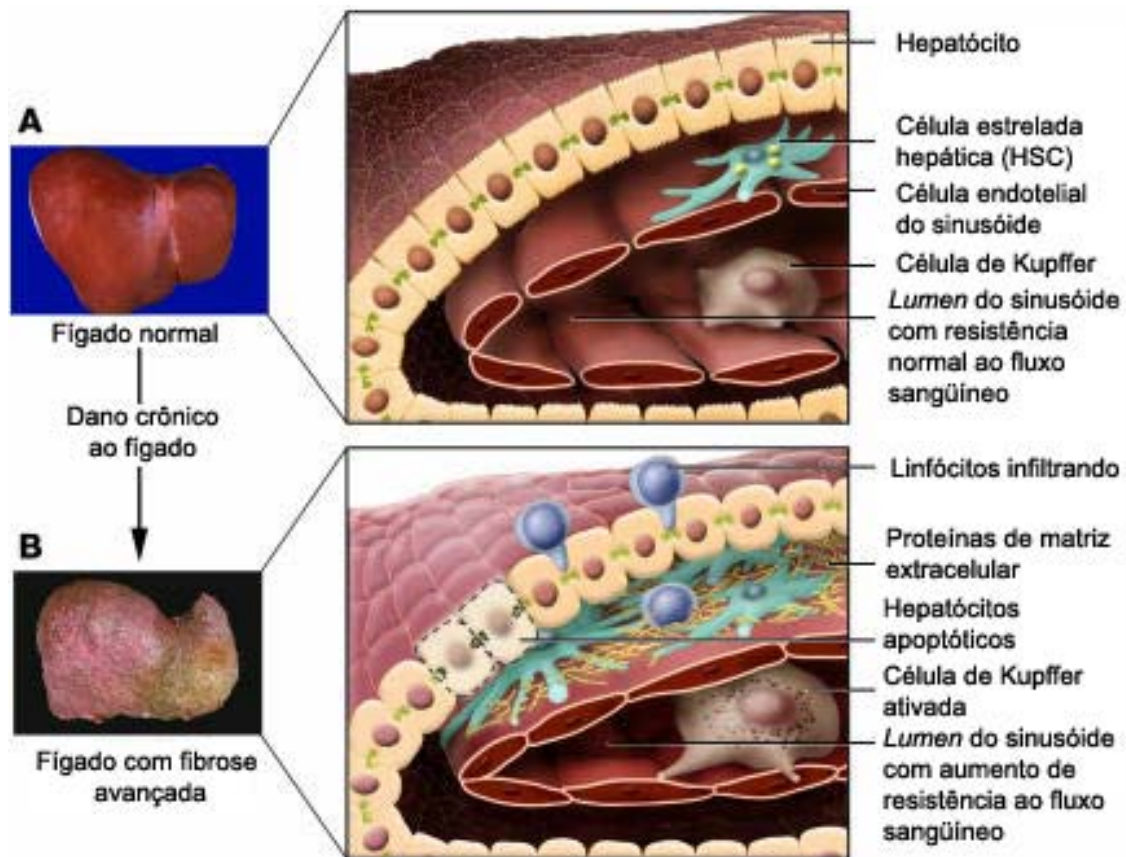


Figura 2. Mudanças da arquitetura hepática associadas ao avanço da fibrose hepática. O processo inflamatório, a ativação das células de Kupffer e apoptose de hepatócitos liberam fatores de ativação das HSC (Traduzida de Bataller & Brenner 2005).

1.4.3 Linhagem Celular GRX

A linhagem celular GRX foi estabelecida a partir de granulomas produzidos em fígados de camundongos C3H/HeN, induzidos por infecção através de penetração subcutânea com *Schistosoma mansoni*. A cultura celular primária, a partir deste granuloma, gerou esta linhagem de células com características de células estreladas hepáticas (Borojevic *et al.* 1985).

A GRX representa uma linhagem celular com propriedades similares a uma célula tecidual conjuntiva hepática (LCTC). Possui, portanto, capacidade de

secretar matriz extracelular, alta taxa de proliferação e apresenta um padrão de crescimento similar às células musculares lisas, o que lhe confere características morfológicas e bioquímicas de um miofibroblasto: célula conjuntiva encontrada em tecido hepático fibrótico humano. De fato, esta linhagem pode modular seu fenótipo entre miofibroblasto ativado e célula armazenadora de gordura quiescente (Figura 3) (Monteiro & Borojevic 1987; Da Silva *et al.* 2003). Culturas *in vitro* de células GRX mostram a habilidade destas em se converter em célula armazenadora de lipídios. De maneira semelhante ao que pode acontecer *in vivo* com as HSC, as células desta linhagem podem ser induzidas à conversão para o fenótipo quiescente. Desta forma, a GRX passa a apresentar um aumento na capacidade de armazenar gotas de lipídio com conseqüente diminuição na sua capacidade de proliferação e de produção de matriz extracelular (Margis & Borojevic 1989; Borojevic *et al.* 1990). Por outro lado, já foi demonstrado que na presença de mediadores inflamatórios, a GRX responde se transformando em uma célula miofibroblástica mais ativada (Da Silva *et al.* 2003).

As células GRX possuem níveis elevados de estresse oxidativo. O tratamento com mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , aumenta ainda mais esses níveis. Assim, quando expostas a algumas citocinas, fatores de crescimento e/ou estresse oxidativo, respondem com a modulação para o fenótipo miofibroblástico ativado (Guimarães *et al.* 2007).

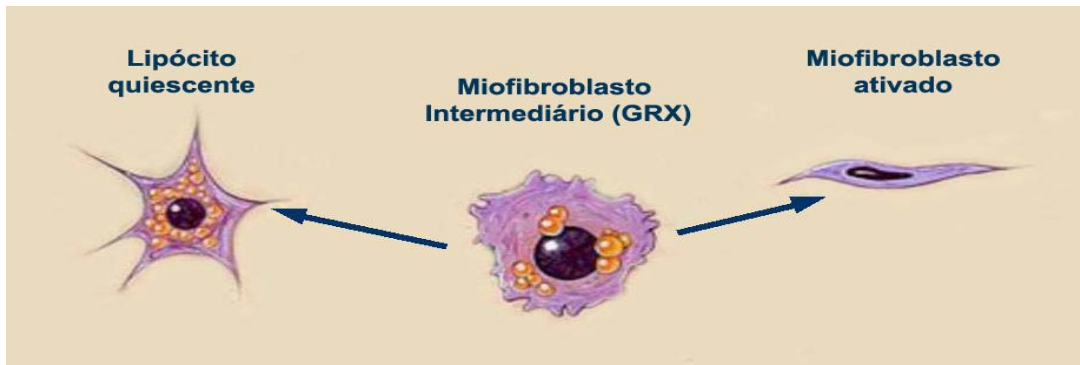


Figura 3 Ativação e modulação fenotípica das células GRX, linhagem representativas das células estreladas hepáticas (HSC) (Adaptada de Friedman 2008a).

1.4. 4 Resveratrol (3,4',5-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno)

Os estudos sobre o potencial benéfico do resveratrol (RSV), associados ao seu consumo na dieta, têm crescido muito nos últimos anos. Tal interesse surgiu devido a um fenômeno chamado de “Paradoxo francês”, que descreve uma situação ocorrida na França em que a população apresentava índices baixos de mortes relacionadas com doenças cardíacas apesar da alta ingestão de gordura saturada na alimentação. A alta concentração de RSV no vinho tinto, muito consumido pelos franceses, gerou a especulação de que este seria o responsável pelo baixo índice de doenças cardíacas (King *et al.* 2006; Wenzel & Somoza 2005).

O RSV é uma fitoalexina produzida por aproximadamente 31 gêneros de plantas – incluindo uvas vermelhas, amendoins e ameixas – em resposta a estresses ambientais e às infecções patogênicas como, por exemplo, ataque de fungos. Trata-se de um composto polifenólico derivado da fenilalanina que contém dois anéis aromáticos com hidroxilas reativas na sua estrutura e pode se apresentar sob duas formas isoméricas: *cis* e *trans*-resveratrol (Figura 4) (Signorelli & Ghidoni 2005). A forma *trans*-resveratrol é mais comum por ser

relativamente estável se protegida da luz e do aumento de pH (De la Lastra & Villegas 2007). A forma *cis*-resveratrol pode ser resultado de uma conversão foto-isomérica ou de alterações de pH (Seeram *et al.*2006). Por ser uma fitoalexina, o conteúdo de RSV presente nas diferentes fontes pode variar amplamente, dependendo de fatores que podem gerar mais ou menos estresse, tais como: ambiente de cultivo, clima, exposições a patógenos e, no caso dos vinhos, método de produção (Signorelli & Ghidoni 2005). Atualmente, muitos estudos sobre RSV são direcionados aos vinhos (em especial, o vinho tinto) e apontam a presença da molécula nessa bebida, sob suas duas formas isoméricas (Pervaiz 2003).

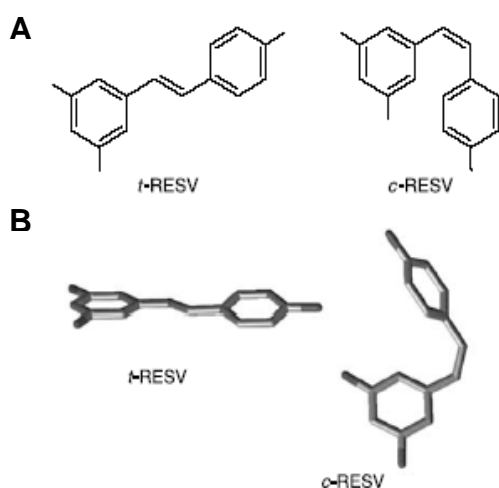


Figura 4. Estruturas moleculares químicas (A) e tridimensionais (B) isométricas do Resveratrol (Retirada de Orallo 2006b).

Existem muitos efeitos benéficos à saúde relacionando o RSV à prevenção de doenças por sua ação apoptótica, estrogênica, quimiopreventiva, antiinflamatória, antiproliferativa e antioxidante. Entre estas doenças estão o câncer, as doenças cardiovasculares, as doenças neurodegenerativas, as doenças auto-imunes e a diabetes. Tais efeitos benéficos são devidos aos inúmeros alvos moleculares de ação do RSV que envolvem citocinas, fatores de transcrição, proteínas do ciclo celular, entre outros (Shishodia & Aggarwal 2006, Wenzel & Somoza 2005, Signorelli & Ghidon 2005). Embora muitos

estudos associem os efeitos benéficos à estrutura molecular *trans*-resveratrol, o isômero *cis* apresenta propriedades biológicas importantes, também devidas à ação antiinflamatória e antioxidante (Orallo 2006a, Leiro *et al.* 2004).

O potencial benéfico do RSV à saúde depende da sua absorção, biodisponibilidade e metabolismo. Recentemente foi mostrado que a administração oral de RSV em humanos resulta em alta absorção, em torno de 70%, mas com baixa biodisponibilidade. O sulfato de RSV, um metabólico intermediário produzido a partir do RSV, é encontrado em quantidades altas no plasma sanguíneo e essa sulfatação pode ser um fator limitante para a biodisponibilidade desta fitoalexina (King *et al.* 2006, Walle *et al.* 2004).

I.4. 5 Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

Consideram-se radicais livres (RL) todas as espécies químicas capazes de existir independentemente que possuam um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Esta característica confere um alto poder de reatividade aos RL (Halliwell 2006, Llesuy 2003). O oxigênio pode ser considerado um birradical porque possui dois elétrons desemparelhados em orbitais distintos (Figura 5A) (Llesuy 2003, Smith *et al.* 2007). O oxigênio molecular (O_2) possui quatro elétrons desemparelhados (Figura 5B) e participa de alguns processos metabólicos, em especial, das reações de síntese de adenosina trifosfato (ATP), atuando como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Durante os variáveis processos metabólicos dos quais participa, o O_2 recebe quatro elétrons. A cada elétron recebido, há a formação de uma ERO, moléculas intermediárias na redução total do oxigênio. As ERO incluem os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (Figura 5C) (Halliwell & Guteridge 2000, Nelson & Cox 2005, Smith *et al.* 2007).

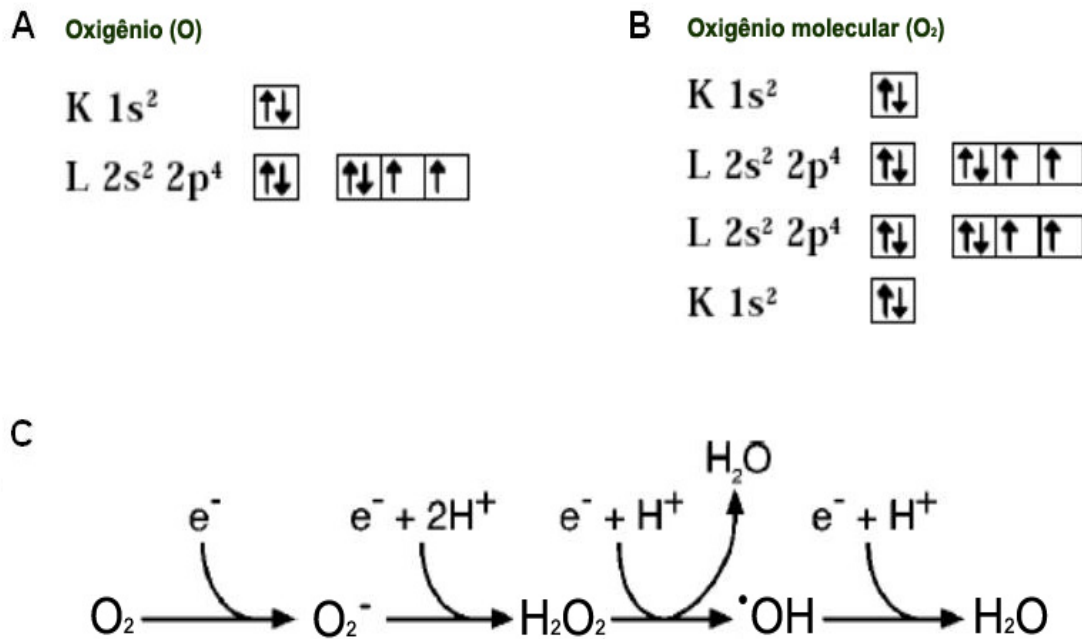


Figura 5 Configuração eletrônica do oxigênio (A) e do oxigênio molecular (B). O oxigênio é um birradical que na forma molecular pode receber 4 elétrons (Adaptadas de Ferreira e Matsubara 1997). Geração de ERO a partir da redução do Oxigênio (C) (Retirada de Imlay 2003).

Os RL ou ERO podem ser produzidos a partir de fontes exógenas ou endógenas. Outras moléculas além do oxigênio (carbono, enxofre e nitrogênio) também podem produzir radicais livres ou espécies reativas, no entanto, o O_2 é a que mais recebe atenção dada sua importância nos processos metabólicos celulares (Halliwell 2001). Cerca de 5% do oxigênio molecular utilizado na cadeia respiratória não é reduzido totalmente, podendo gerar ERO (Smith *et al.* 2007). Alguns exemplos de RL e ERO estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 Exemplos de espécies reativas de oxigênio (Adaptada de Smith *et al.* 2007).

Espécies Reativas	Propriedades
O_2^- Superóxido	Produzido na cadeia de transporte de elétrons e outros locais. Pode gerar outros radicais e não pode se difundir de seu local de origem.
H_2O_2 Peróxido de hidrogênio	Não é um radical livre mas pode gerar radicais por reações com metais de transição (ex. Fe^{2+}). Pode se difundir através das membranas celulares.
$\bullet OH$ Radical hidroxil	É a espécie mais reativa no ataque a outras moléculas biológicas. É produzida pela reação de Fenton que envolve H_2O_2 presença de Fe^{2+} ou Cu^+ .
$RO\bullet$, $R\bullet$, $R-S\bullet$ Radicais orgânicos	São produzidos a partir de R-OH, R-H ou R-SH pelo ataque de $\bullet OH$.
$RCOO\bullet$ ou $LOO\bullet$ Radical peroxil	Ocorre durante a degradação lipídica.
O_2^1 Oxigênio singlet	Produzido por indução de luz ultravioleta. Decai rapidamente e provavelmente não é significativamente tóxico.

As funções fisiológicas dos RL e seus derivados reativos têm sido discutidas desde que foram descobertas. Em 1956 estes eram apontados como causa de dano celular, mutagênese, câncer e doenças degenerativas relacionadas à senescência. De fato, muitas pesquisas foram voltadas a explicar os danos causados pelas ERO a estruturas moleculares como DNA, proteínas e lipídios. Atualmente se sabe que as ERO estão envolvidas em efeitos biológicos vantajosos. Tais efeitos incluem: a regulação do tônus vascular, o estímulo da transdução de sinais em vários receptores de membranas celulares (incluindo os receptores antigênicos de linfócitos), a ativação de fatores de transcrição (como $NF\kappa\beta$ e AP-1) e a ativação oxidativa da cascata da MAPK, entre outros (Dröge 2002).

Os organismos têm uma tolerância limitada ao O_2 . A exposição exagerada pode ser danosa às células podendo levá-las à morte (Imlay 2003). No entanto, existem mecanismos antioxidativos que estão envolvidos na proteção a esses danos. Entre esses, destacam-se os antioxidantes primários, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o sistema glutaciona

peroxidase/glutathione reductase, produzidos pelas próprias células (Halliwell & Gutteridge 2000). Existe, também, uma série de antioxidantes não enzimáticos importantes que incluem as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido ascórbico), os flavonóides (onde se inclui o RSV) e outras moléculas, como o β -caroteno, a N-acetilcisteína e a glutathione (GSH) (Borella & Varela 2004). Em condições fisiológicas homeostáticas, o balanço entre RL ou ERO e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. O rompimento deste equilíbrio a favor dos RL ou ERO resulta em estresse oxidativo (Klein 2003).

A SOD e a CAT são metaloproteinases envolvidas na defesa antioxidante celular dismutando duas ERO comuns: o superóxido e o H_2O_2 , respectivamente (Figura 6A e 6B). Embora os efeitos tóxicos do O_2^- sejam menores quando comparados ao H_2O_2 , esta espécie reativa produz peróxido de hidrogênio pela ação da SOD e está envolvida na oxidação do ferro pela reação de Haber-Weiss. O produto ferro reduzido pode reagir com o H_2O_2 , formando o radical hidroxil, por meio da reação de Fenton (Figura 6C) (Bartosz 2005). Nas últimas décadas tem se discutido que o acúmulo de ferro pode acarretar em dano celular por meio de oxidação lipídica de membranas celulares. Tal fato ocorre porque o ferro é o metal de transição mais eficiente na formação de ERO a partir do acoplamento das reações de Fenton e de Haber-Weiss. Desta forma, o íon ferro também é capaz de iniciar a peroxidação lipídica e propagar esse processo favorecendo a degradação lipídica (formação de malondialdeído – MDA) e a formação de radicais peroxil (ROO^*) e alcoxil (RO^*), que participam da ativação das HSC (Poli 2000).

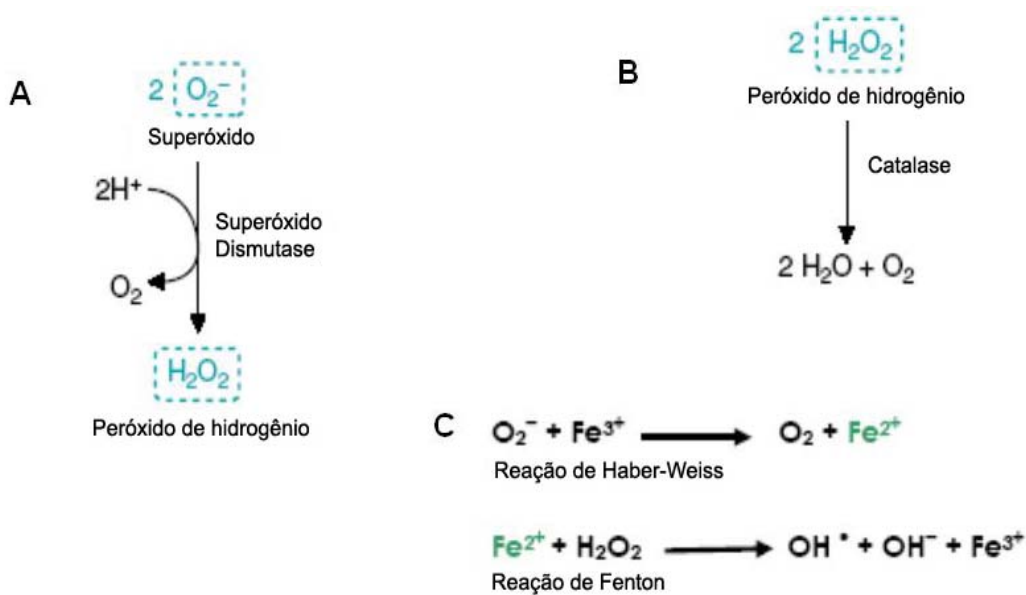


Figura 6 Reações catalisadas pela SOD (A) e pela CAT (B) (Retiradas de Smith *et al.* 2007). Reação de Fenton acoplada a reação de Haber-Weiss (C) (Adaptada de Andreazza *et al* 2004).

O estado de fibrose hepática requer todos os elementos que se relacionam com a presença de células inflamatórias. As ERO são moléculas instáveis geradas nesse contexto que são capazes de ativar as HSC (Friedman 2008b). O RSV é uma molécula com propriedades antioxidantes relacionada ao seqüestro de superóxidos (O_2^-) formados na mitocôndria e à inibição da lipoperoxidação induzida pela reação de Fenton (Zini *et al.* 1999). Nas HSC, já foi mostrado que o RSV é capaz de produzir perturbações nas vias de transdução de sinal e na expressão de proteínas do ciclo celular, provocando uma inibição de ativação destas células (Kawada *et al* 1998, Kawada *et al.*1996).

No geral, o estresse oxidativo é uma condição que pode levar o organismo a desenvolver doenças. Estas condições de patologia, paradoxal aos efeitos fisiológicos relevantes dos RL ou ERO, denotam a importância da regulação do ambiente redox celular, mantendo o equilíbrio entre estas moléculas instáveis e as defesas antioxidantes (Dröge, 2002).

I.5. OBJETIVOS

I.5.1. Objetivo Geral

Considerando os alvos moleculares sobre os quais atua o RSV, muitos destes envolvidos com a modulação fenotípica das HSC, o principal objetivo desta dissertação consistiu em determinar na linhagem celular GRX, representativa das células estreladas hepáticas, os efeitos do tratamento agudo (24 horas) e crônico (120 horas) com RSV sobre a proliferação, a viabilidade e alguns parâmetros de estresse oxidativo. O efeito do RSV sobre o estado de ativação das HSC foi avaliado pela determinação da capacidade de migração das células.

I.5.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a viabilidade celular e os níveis de proliferação das células GRX nos grupos controle e sob tratamento agudo ou crônico com concentrações crescentes (0,1; 1; 10 e 50 μM) de RSV.
- b) Determinar os níveis de radicais livres (DCF-DA) nas células GRX tratadas e não tratadas com RSV nas diferentes concentrações, nos modelos agudo e crônico.
- c) Verificar a atividade da superóxido dismutase e da catalase nos grupos controle e tratados, com as concentrações referidas de RSV, nos modelos agudo e crônico.
- d) Estabelecer os níveis de lipoperoxidação (TBARS) e o conteúdo tiólico protéico e não protéicos das células GRX tratadas e não tratadas com RSV nas diferentes concentrações, nos modelos agudo e crônico.
- e) Avaliar os efeitos do RSV, nas concentrações mencionadas acima, sobre a capacidade de migração das células GRX durante 48 horas de tratamento.

PARTE II

**II.1 PRO-OXIDANT EFFECTS OF RESVERATROL AND ITS
CONSEQUENCES ON VIABILITY AND PROLIFERATIVE STATUS IN THE
GRX CELL LINE**

(Manuscrito submetido ao periódico *Toxicology in vitro*)

PRO-OXIDANT EFFECTS OF RESVERATROL AND ITS CONSEQUENCES ON VIABILITY AND PROLIFERATIVE STATUS IN THE GRX CELL LINE

Meira, LA¹; Coelho, BP¹; Behr G¹; Souza ICC¹, Moreira, JCF¹; Guaragna RM¹, Borojevic R²,
Gottfried C¹, Guma FCR¹

¹Department of Biochemistry, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), rua
Ramiro Barcelos, 2600-Anexo I, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Histology and Embriology, ICB, PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro
(UFRJ), Rio de Janeiro,RJ, Brazil.

ABSTRACT

Continuous liver injuries generate stimuli, mediated by cytokines and reactive oxygen species (ROS), which trigger the activation of hepatic stellate cells (HSC) to become collagen α 1-(1) producing myofibroblasts, responsible for fibrosis. The GRX cell line is representative of HSC. Resveratrol (RSV; 3,4',5-tri-hydroxy-*trans*-stilbene) is a phytoalexin produced by some species of plants. Several beneficial effects are attributed to RSV due to its antioxidant properties, although its possible pro-oxidant effect has been put into discussion recently. We report here that 50 μ M of RSV induced a pro-oxidant effect leading to a decreased cell viability and proliferation of GRX cells during the first 24 hours of treatment; these alterations were attenuated during 120 hours of exposure. At 120 hours, an increased SOD activity was observed, as well as decreased CAT activity, in the 50 μ M RSV-treated group, leading to an imbalance in the ratio of both enzymes and possibly resulting in an over-production of H₂O₂. The cells that received 50 μ M RSV presented oxidative damage, determined by lipoperoxidation, at 24 and 120 hours, but some of these parameters were lower in the chronic model. These data demonstrate a toxic effect of RSV treatment which in turn generates an adaptation of the GRX cells.

Keywords: Hepatic fibrosis, GRX, RSV, Pro-oxidant, Oxidative Stress

Abbreviations: Catalase(CAT); Extracellular Matrix (ECM); Liver connective tissue cells (LCTC); Hepatic Stellate Cells (HSC); Reactive Oxygen Species (ROS); Resveratrol (RSV); Superoxide Dismutase (SOD)

1. INTRODUCTION

Liver diseases are ranked among the main causes of human mortality and also represent a huge health problem worldwide. Chronic damage to the liver, due to virus infection, metabolic disorders and alcohol abuse, may result in alterations and an imbalance between the degradation and production of the extracellular matrix (ECM), resulting in the accumulation of such proteins, and the pathology known as fibrosis (Elsharkawy *et al.*2005, Lotersztajnet *al.*2005).

The alterations in liver structure that result from the fibrotic state may lead to a cirrhotic process, which, in turn, cause the occurrence of nodules, as well as hepatocyte death and even liver failure. (Friedman 2003, Tsukada *et al.* 2006).

The hepatic stellate cells (HSC) are known to play an important role in the fibrogenic process. In the resting state, they maintain a quiescent or lipocytic phenotype characterized by the presence and storage of retinol droplets in the cytoplasm, and carry out an important function in the production of reticular fibers in the Space of Disse, in the sinusoidal blood flow, in the mediation and amplification of the inflammatory response and in liver regeneration. The activation of HSC is associated with continuous damage to the liver, which leads to a chronic inflammatory process. In this context, these cells develop a myofibroblastic phenotype in which they lose their lipidic droplets, thus presenting a higher proliferation rate and becoming the main ECM producers, resulting in fibrosis (Friedman 2008a, Pinzani & Gentilini 1999, Li *et al.* 2008). Therefore, strategies that decrease HSC phenotypical modulation stimuli will play an important role in the combat of this pathology (Kumar & Sarin 2007).

The GRX cell line was established through liver fiber granulomas induced by infection and these cells are representative of HSC (Borojevic *et al.* 1985, Boloukhere *et al.* 1993). In standard cultures, GRX cells express an activated phenotype that is an intermediate of the lipocytic and myofibroblastic phenotypes, with the morphologic and biochemical characteristics of liver connective tissue cells (LCTC) (Guma *et al.* 1993). GRX cells may be induced, *in vitro*, to express a lipocytic phenotype by retinoids, β -carothene or indomethacin, which stimulate lipid storage as well as a cell proliferation and ECM production decrease (Margis & Borojevic 1989, Borojevic *et al.* 1990, Martucci *et al.* 2004, Chiarini *et al.* 1994).

Resveratrol (3,5,4',-trihydroxystilbene; RSV) is a phytoalexin produced by approximately 31 plant genus, including plums, peanuts and grapes, responding to environmental stresses and pathogenic infections (Signorelli & Ghidoni 2005). Trans-resveratrol is associated with the beneficial effects of red wines and is associated with the prevention of many pathologies, such as cancer, diabetes and heart diseases, as well as neurodegenerative diseases, due to its molecular targets that include cytokines, transcription factors, cell cycle proteins and proteins associated with metastasis, among others. Such characteristics provide RSV with important biologic properties, such as anti-oxidant, anti-proliferative and chemopreventive activities (King *et al* 2006, Wenzel & Somoza 2005).

Reactive Oxygen species (ROS) are produced during the chronic inflammatory process in the activation of HSC. Thus, oxidative stress has a close relationship with the development of liver fibrosis (Baroni *et al.* 1999, Friedman 2008b). Previous studies in our laboratory showed that GRX cells modulate to a more activated myofibroblastic phenotype when exposed to cytokines, growth factors and to oxidative stress (Guimarães *et al* 2007). We also showed that GRX treatment with low-doses of RSV caused cell cycle arrest in phase S (Souza *et al.* 2008). RSV contains anti-proliferative as well as anti-oxidant properties related to the scavenging of superoxide (O_2^-) and to the inhibition of the Fenton-induced lipid peroxidation (Zini *et al.* 1999). On the other hand, recent results support a pro-oxidant activity of RSV, depending on the concentration of this molecule and cell type (De la Lastra & Villegas 2007). Oxidative balance is a determinant factor related to activation state of HSC. However, despite all beneficial effects associated with RSV on different cells models, we are not sure about how this phytoalexin should be important for hepatic fibrosis

treatment, which involves the reestablishment of quiescent phenotype or apoptosis induction of HSC. Because RSV may acts as antioxidant or prooxidant molecule, we think be interesting evaluate the oxidative stress status and its consequences on viability and proliferation parameters of GRX.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell Cultures

The GRX cell line was obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (HUCFF, UFRJ, RJ). The cells were seeded on 6 or 12-well culture plates (for TBARS assay) and 24-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 hours before treatment with RSV. Cells were maintained in Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Cultilab, Campinas, Brazil) and 2 g/L HEPES buffer (pH 7.4) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

2.2 Resveratrol Treatment

Resveratrol was dissolved in ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) to a stock concentration of 100 mM and diluted in DMEM medium to final concentration of 0.1, 1, 10 and 50 µM just before use, for 24 hours or 120 hours of treatment. The GRX cells without RSV treatment were used as controls. Each treatment group included 5 wells. Medium with or without RSV, at the mentioned concentrations, was changed daily in the 5 day experiments.

2.3 Colorimetric MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) is a yellow tetrazolium salt that is reduced to a purple formazan salt by living cells. This test evaluates cell viability by quantifying cellular dehydrogenase activities (Hayon *et al.* 2003, Hansen *et al.* 1989). After RSV treatments, cells were

incubated with 1 mg/ml MTT for 2 hours at 37 °C. Cells were then lysated in dimethyl-sulfoxide (DMSO, Sigma Inc., Saint Louis, MO, USA) and formazan purple crystals were solubilized and measured with a microplate spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA) at 570 nm and 630 nm.

2.4 Cellular adhesion and viability by colorimetric sulforhodamine B assay

After RSV treatment, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes. Cells were then stained with 0.4% sulforhodamine B in acetic acid and dissolved in 1% SDS. The absorbance was measured with a microplate spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA) at 515 nm and was expressed as percentage of control (Skehan *et al.* 1990).

2.5 Cell counting and trypan blue exclusion

After RSV treatment, incubation medium was removed and cells from each well were resuspended in the presence of trypsin/EDTA (Sigma Inc., Saint Louis, MO, USA) for 30 seconds, followed by trypsin inactivation with DMEM/5% FBS. Trypan Blue (10 %, Sigma Inc., Saint Louis, MO, USA) was then added and cells were immediately counted in a hemocytometer [Strober 1997]. The non-viable cells were calculated as percentage of each group number of cells and the number of cell doublings was calculated as: cell population doubling = $[\log (\text{post-treatment cells number} / \text{initial cell number})] / \log 2$ (Lorge 2008).

2.6 [³H] Thymidine incorporation assay

Cells were incubated for 24 hours with 1 $\mu\text{Ci/ml}$ of [³H] thymidine (specific activity 23.0 Ci/nmol, Amersham Biosciences, Hillerod, Denmark). Subsequently, cells were washed with PBS and 10% trichloroacetic acid was

added to each well for 1 hour. The pellet was dissolved with 0.1 N NaOH and the incorporated radioactive DNA was determined by scintillation counting and was expressed as cpm/mg of protein (Kawada *et al.* 1996). The protein content was measured according to Peterson (Peterson 1979).

2.7 Evaluation of intracellular reactive oxygen species production

The intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent and cell-membrane permeable 2'-7'- Dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases and then oxidized by ROS to a fluorescent, polar and non-permeable 2'-7'- Dichlorofluorescein (DCF) compound. After treatment with RSV, cells were incubated with 10 μ M DCFH-DA diluted in DMEM medium without serum for 30 minutes at 37° C in the dark. Cells were washed in PBS and then scraped into PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a microplate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. Results were expressed as percentage of control relative fluorescence units (R.F.U.) (Halliwell & Whiteman 2004, Vieira de Almeida *et al.* 2008).

2.8 Antioxidant enzyme activity estimations: Superoxide Dismutase and Catalase

Superoxide Dismutase activity was quantified by the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation, and absorbance at 480 nm was measured with a microplate spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA), as previously described (Misra & Fridovich 1972). Catalase activity was quantified by measurement of H₂O₂ absorbance decrease using the same microplate spectrophotometer (absorbance at 240 nm) (Aebi 1984). Results were expressed as percentage of control.

2.9 Quantification of thiobarbituric acid reactives species (TBARS)

Lipoperoxidation was measured by the method of TBARS (Drapper & Hadley 1990, Bohr *et al.* 2004). Briefly, after treatments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), scraped with Tris buffer and the proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid. The cell homogenate was mixed with 0.67% thiobarbituric acid (TBA) and boiled at 90-100° C for 30 minutes. Then, the samples were centrifuged and the lipidic supernatant was collected and absorbance at 512 nm measured with a spectrophotometer. The concentration of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient value of 153,000 M⁻¹ cm⁻¹. Results were expressed as μM of TBARS/mg protein.

2.10 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error. P<0.05 was considered significant. Statistical comparisons were performed using ANOVA. For *post hoc* testing, the Duncan and S-N-K tests were used. All analyses were performed with the SPSS statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTS

3.1 A higher resveratrol dose alters GRX cell viability

The present study assessed the effects of RSV at the concentrations of 0.1, 1, 10 and 50 μM on GRX cells during 24 hours and 120 hours treatments. The effects of RSV on cell viability were determined with the MTT and Sulforhodamine B methods and Trypan Blue positive cell counting. At both incubation time points (24 hours and 120 hours), the MTT absorbance decreased significantly in the 50 μM RSV group, whilst the other groups presented similar absorbance values. The same pattern was observed using the

sulforhodamine B and trypan blue method (data not show). The percentage of non-viable cells increased with the 50 μ M RSV group only at 24 hours [Table 1].

3.2 Effects of resveratrol on cellular proliferation

RSV is known to be an antiproliferative molecule. Thus, we also evaluated the effects of this phytoalexin on cell proliferation using the radioactive thymidine incorporation method. The first three RSV concentrations (and the control treatment) had no significant effects cell proliferation during both the 24-hour and 120-hour treatments. Interestingly, the 24 hours and 120 hours treatment groups that employed 50 μ M RSV presented opposite effects to each other. At 24 hours, there was a decrease in cell proliferation, whilst at 120 hours there was an increase in the incorporation of radioactive thymidine [Figure 1].

Proliferation was also evaluated by counting and calculation of the number of cell doublings. The control groups and 0.1, 1 and 10 μ M RSV groups presented similar results. In the 50 μ M group after 24 hours treatment, the number of cell doublings was lower in relation to the other groups during the first 48 hours of cell culture. During the interval between 48 and 120 hours, cell proliferation continued in the group treated with 50 μ M RSV, while the number of duplications was observed to decrease in all of the other groups, as demonstrated by [3 H] thymidine incorporation [Figure 2].

3.3 Effects of resveratrol on reactive oxygen species

ROS may play an important role in increased number of non-viable cells via the induction of oxidative stress. Thus, we evaluated the effects of RSV on the cellular redox environment. ROS production evaluation was assessed through fluorescent DCF measurement, where increased fluorescence reflects increased ROS. At 24 hours, the groups treated with 1, 10 μ M RSV

demonstrated similar increases in DCF fluorescence compared to the control. The group with 50 μM RSV presented a higher DCF fluorescence production in relation to the other groups. At 120 hours, there was a significant increase in DCF fluorescence compared to the control, identified in the group treated with the lowest RSV concentration. The 0.1, 1 and 10 μM RSV groups presented similar results to each other, whilst the 50 μM group demonstrated a higher DCF fluorescence production, compared to the other groups [Figure 3].

3.4 Effects of resveratrol on enzymatic antioxidant activities: superoxide dismutase and catalase

Since a significant increase in ROS production was induced by RSV treatment, in both models, we assessed the activities of the main enzymatic antioxidants. At 24 hours, RSV induced a significant decrease in SOD activity at the concentrations of 1, 10 and 50 μM . At 120 hours, 0.1, 1 and 10 μM RSV were not different to each other, but presented more SOD activity than the control. The group treated with 50 μM presented an increase in SOD activity, as compared to the other groups, a result that significantly opposed that observed in the same treatment group at 24 hours [Figure 4A]. At 24 hours, 10 and 50 μM RSV also induced a decrease in CAT activity, as compared with the other groups. At 120 hours of treatment, only the group treated with 50 μM RSV presented decreased CAT activity, as compared with the other groups [Figure 4B]. SOD promotes the dismutation of superoxide to oxygen and H_2O_2 , which is reduced to water by catalase. Many publications have reported the deleterious consequences arising from the overproduction or excessive activity of SOD, believed to lead to an increased production of H_2O_2 (Liochev & Fridovich 2007). At 120 hours of treatment, the evaluation of SOD and CAT activities indicated

significant opposing effects in the 50 μ M RSV treated group. In this group, RSV induced increased SOD activity associated with decreased CAT activity, leading to a significant change in the SOD/CAT ratio. At 24 hours, there were no significant differences in this enzymatic activity ratio in the four treated groups, as compared to the control [data not shown]. At 120 hours, a significant increase in SOD activity and a significant decrease in CAT activity were observed in the RSV-treated group, leading to an imbalance in the enzymes' activities and resulting in over-production of H_2O_2 [Figure 4C].

3.5 Effects of resveratrol on lipid peroxidation

Lipid peroxidation damage occurs as a consequence of ROS over-production, particularly in the presence of hydroxyl radicals produced by the Fenton and Haber-Weiss reaction. As such, malondialdehyde production was quantified by the TBARS method as an index of lipid peroxidation. There was a significant increase, at both 24 hours and 120 hours, in the generation of TBARS in the group treated with 50 μ M RSV. During the first 24 hours of 50 μ M RSV treatment, the TBARS levels were significantly higher than those of the control [Figure 5].

4. DISCUSSION

The GRX cells correspond to the first cell line representing HSC and they are induced to the activated myofibroblastic phenotype by factors that increase oxidative stress (Guimarães *et al* 2007). In this context, GRX cells are a good model for studies that investigate whether RSV may be effective for either preventing or treating this disease are important, since this molecule can be found easily in ingested products. Furthermore, this phytoalexin can interfere in the molecular mechanisms of HSC that regulate phenotypical modulation, as

well as liver fibrosis development (Lotersztajn *et al.* 2005, Friedman 2008a, De la Lastra & Villegas 2007).

Data from preliminary experiments demonstrate that RSV at 100 μM produces a toxic effect on GRX. In our established models, all results regarding viability (amount of live cells) were consistent in indicating a significant decrease in cell viability only in the group treated with 50 μM RSV. The percentage of non-viable cells increased significantly in this group, but only in the acute model of treatment, thus indicating toxic effect on GRX. During the investigation of the effects of RSV on the proliferation of GRX, our two treatment models presented significant differences during treatment with 50 μM RSV. As a result of the decrease in the percentage of non-viable cells found during chronic exposure, a higher incorporation of [^3H] thymidine could be associated with a DNA repair response (Guma *et al.* 1993). However, the calculation of the number of cell doublings demonstrated that, after the toxic shock during the first 24 hours, the surviving cells treated with 50 μM RSV remained viable and continued to proliferate. The GRX cells present low inhibition through contact even when at confluence (Borojevic *et al.* 1991). Therefore, the lower number of cells in the cultures treated with the higher RSV dose may also stimulates continuous proliferation.

Recent studies have demonstrated that RSV may behave as a pro-oxidizing agent, depending on its concentration as well as on the cell system in which it is administrated. This phytoalexin can lead to DNA damage as well as a reversible or irreversible interruption of the cell cycle, mediated by a pro-oxidant effect that may be potentialized by contact with copper ions (De la Lastra & Villegas 2007, Babich *et al.* 2000, Hayon *et al.* 2003, Heiss *et al.* 2007). Likewise, high levels

of oxidative stress are toxic and usually result in a decrease of cell proliferation, whereas low to moderate levels are tolerable and can increase proliferation in some types of cell cultures. (Halliwell & Gutteridge 2000). Therefore, the low amount of cells found in the chronic treatment, in the group that received 50 μM RSV, may be a result of a decrease in proliferation, as well as significant cell death on account of a toxic effect observed only within the first 24 hours of treatment.

Molecular oxygen and its reactive derivatives play an important role in several metabolic processes in the cells of aerobic organisms. Nevertheless, as a paradox, they are also related to the development of several diseases since the high reactivity of these molecules may cause some damage to other biomolecules (Halliwell & Whiteman 2004, Imlay 2003). During an acute RSV treatment, we observed an imbalance between ROS production and the activity of the main antioxidant enzymes (SOD and CAT) in cells treated with 1 μM RSV. This fact indicated a pro-oxidant effect, which generated oxidative stress in this model. The SOD/CAT ratio has also been referred to as an important factor in the establishment of the redox state of cells. The increase in SOD activity, associated with a decrease in CAT activity, observed in the group treated with 50 μM RSV, results in an increased concentration of H_2O_2 , which is an important ROS source for $\cdot\text{OH}$ formation through the Fenton reaction (Liochev & Friedman 2007, Halliwell 2006, Oliveira *et al.* 2007). Since we found an imbalance favoring SOD in relation to CAT, we suggest that this situation also stimulates oxidative stress.

Besides altering the structure and the function of cell membranes, lipid peroxidation is associated with the toxic effects of several chemical substances

(Dal-Pizzol *et al.* 2000). Our two RSV treatment models resulted in an increased amount of TBARS in the groups treated with the concentration of 50 μ M. However, it should be noted that levels indicating lipid peroxidation were much more expressive at 24 hours than at 120 hours, suggesting an adaptative mechanism in the surviving cells. Although lipid damage did not occur in the cells receiving lower concentration treatments, the highest lipid peroxidation observed in the group treated with 50 μ M RSV is undoubtedly associated with oxidative stress. Accordingly, the results found in this test are consistent with the increase in the non-viable cell percentage and support the idea that 50 μ M RSV caused a toxic effect at 24 hours. Although an increase in peroxidation occurred in the same treatment group at 120 hours, it did not alter the percentage of non-viable cells, indicating a lower toxic effect, as compared to that found during acute exposure.

The antioxidant potential of RSV is widely discussed, since it has a ROS scavenging capacity (De la Lastra & Villegas 2007). However, the low availability of RSV provides a cell protective effect through direct neutralizing of ROS more difficult. Therefore, a more acceptable hypothesis is that RSV would produce an antioxidant effect through its capacity to induce a series of signals leading to an upregulation of cell antioxidant defense systems. In fact, recent studies concluded that RSV can induce the increase of both quantity and activity of Mn-SOD in brain murine cells and in the MRC-5 cell, a lung fibroblast cell line (Robb *et al.* 2008a, Robb *et al.* 2008b). From another aspect, it is known that the oxidative stress can result in cell adaptation. Cell damage is a result of physical or chemical alterations, which alter homeostasis, leading to cell death, through apoptosis or necrosis, or to an adaptation. The tolerance

regarding the oxidant environment is undoubtedly related to some gene expression alterations, as well as to the increase in the synthesis and action of antioxidant defense systems (Halliwell & Gutteridge 2000).

The RSV effects generated oxidative stress in some situations, according to the concentration and the time of treatment. The imbalance in ROS and antioxidant defense in the cells receiving 1 and 10 μM RSV was observed only at 24 hours. Despite this fact, there was no lipid damage in the cells treated with such concentrations. At 120 hours, a higher balance between the production of ROS and the antioxidant enzyme activity in all treated groups was identified. The cells that received 50 μM RSV presented both stress and oxidative damage by lipoperoxidation, at 24 hours as well as at 120 hours. According to these parameters, it is possible to state that the exposure of GRX to treatment with doses 1, 10 and 50 μM RSV induced a pro-oxidative effect which diminished with time. In fact, after a long-term period, the administration of RSV, in all of the concentrations studied, produced an increase in SOD activity and a decrease in CAT activity, generating an imbalanced enzymatic system, followed by an increase in ROS production. As such, we observed that the pro-oxidative effects of RSV seem to stimulate the action of SOD, and that this factor must be related to an adaptative resistance or tolerance process to the oxidative stress.

As for the development of liver fibrosis, many molecular mechanisms are involved in the phenotypic modulation of HSC, including inflammatory mediators as well as transcription factors, such as $\text{NF}\kappa\beta$, which interact with oxidant molecules. Therefore, the need for finding additional targets of action of RSV in these cells becomes evident, and further investigation is also necessary to link

the RSV effects described at the present study with the phenotypic modulation of HSCs and with the control of the liver fibrosis development.

Acknowledgements

L.A.M. Meira is recipient of a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil). F.C.R. Guma, J.C.F. Moreira and R. Borojevic are recipients of research fellowship from CNPq. This work was also supported by CNPq, FAPERJ, FAPERGS, and PROPESQ-UFRGS.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105, 121-126.
- Albanis E., Friedman S. L. 2006. antifibrotics agents for liver disease. *American Journal of Transplantation* 6,12-19.
- Babich H., Reisbaum A.G., Zuckerbraum H.L. 2000. *In vitro* response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicology Letters* 114, 143-153.
- Baroni G. S., D'ambrosio L., Ferreti G. *et al.* 1998. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 27, 720-726.
- Bertelli A., Bertelli A.A., Gozzini A., Giovannini L.1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs under experimental and clinical research* 24, 133-138.
- Bhor V., M.,Raghuram N., Sivakami S. 2004. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 89-97
- Boloukhere M., Baldo-Correa E., Borojevic R. 1993. Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in

- hepatic periovular granulomas. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 25, 505-517.
- Borojevic R., Guaragna R.M., Margis R., Dutra H.S. 1990. In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. *In vitro Cellular and Development Biology* 26, 361-368.
- Borojevic R., Guaragna R.M., Vicente, C. et al. 1991. In vitro conversion of a hepatic myofibroblast cell line GRX into lipocyte (Ito cells). In: Wisse E., Knook D.L., McCuskey R.S. (Ed.) *Cells of the hepatic sinusoid. The Kupffer cells foundation* 3, 249-252.
- Borojevic R., Monteiro A. N., Vinhas S. A., Domont G. B., Mourao P. A., Emonard H. , Jr. Grimaldi G., Grimaud J. A. 1985. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In vitro Cellular and Development Biology* 21, 382–390.
- Chiarini L.B., Borojevic R., Monteiro A.N.A. 1994. In vitro collagen synthesis by liver connective tissue cells isolated from schistosomal granulomas. *Brazilian journal of medical and biological research* 27, 1193-1197.
- Dal-Pizzol F., Klamt F., Mário L.C. et al. 2000. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 291, 179-182.
- De la Lastra C.A., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanism and clinical implications. *Biochemical Society Transactions* 35,1156-1161.
- Draper H.H., Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods.in Enzymology* 186, 421–3.

- Elsharkawy, A. M., Oakley F. & Mann A. 2005. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 10, 927-939.
- Friedman S.L., Liver Fibrosis – From Bench to bedside. 2003. *Journal of hepatology*. 38, 38-53.
- Friedman S.L. 2008a. Hepatic Stellate Cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* 88, 125-172.
- Friedman S.L. Mechanism of hepatic fibrogenesis. 2008b. *Gastroenterology* 134, 1655-1669.
- Friedman S.L., Bansal M.B. 2006. Reversal of hepatic fibrosis – Fact or fantasy? *Hepatology*. 43, S82-S83.
- Guimarães E. L. M., Franceschi M. F. S., Grivicich I. et al. 2007. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver International* 26, 477-485.
- Guma F.C.R., Martini L.H. Bernard E.A. 1993. Retinol effects in Sertoli cells: [Methyl-3H thymidine incorporation into DNA. *Medical.Science.Research*. 21, 9-10.
- Guma F.C.R, Mello T.G., Mermelstein C.S. et al. 2003. Intermediate filaments modulation in an in vitro model of hepatic stellate cell activation or conversation into teh lypocyte phenotype. *Biochemistry and cell biology* 79, 409-417.
- Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods* 119, 203–21.
- Halliwell B. 2006. Reactive Species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141, 312-322.

- Halliwell B., Gutteridge. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3thed. Clarendon Oxford.
- Halliwell B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. 142, 231-255.
- Hayon T., Dvilansky A., Shpilberg O., Nathan I. 2003. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leukemia & lymphoma* 44, 1957–1962.
- Heiss E.H., Schilder Y.D.C., Dirsch D.M. 2007. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress-and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26759-26766.
- Imlay J.A. 2003. Patchways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57, 395-418.
- Kawada N., Kuroki T., Kobayashi K., Inoue M., Kaneda K. 1996. Inhibition of myofibroblastic transformation of cultured rat hepatic stellate cells by methylxanthines and dibutyryl cAMP. *Digestive diseases and sciences* 41, 1022–1029.
- Kawada N., Seki S., Inoue M., and Kuroki T. 1998. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells, *Hepatology* 27, 1265–1274.
- King R.E., Bomser J.A., Min D.B. 2006. Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 5, 65-70.
- Kumar M., Sarin S. K. 2007. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian journal of pediatrics* 74, 393-399.

- Li, J., Liao Z., Ping J. et al. 2008. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *Journal of Gastroenterology* 43, 419-428.
- Liochev S.I., Fridovich I. 2007. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free radical biology & medicine* 42, 1465-1469
- Lorge E., Hayashi M., Albertini S., Kirkland M. 2008. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test I. Theoretical aspects. *Mutation Research* 665, 1-3.
- Lotersztajn, S., Julien, B. Teixeira-Clerc, F.; et al. 2005. Hepatic Fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 605-28.
- Margis R., Borojevic R. 1989. Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1011,1-5.
- Martucci R.B., Ziulkoski A. L., Fortuna V.A. et al. 2004. Beta carotene storage, conversion to retinoic acid, and induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. *Journal of cellular biochemistry* 92, 414-423.
- Misra, H. P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry* 247, 3170-3175.
- Oliveira M. R., Pasquali M. A. B., Silvestrin R. B., et al. 2007. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory and exploratory activity of adults rats. *Brain Research* 1169, 112-119
- Peterson G L. 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry. *Analytical biochemistry* 100, 201-220.

- Pinzani M., Gentilini, P. 1999. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Seminars in liver disease* 19, 395-410.
- Robb E.L., Winkelmoen L., Visanji N. *et al.* 2008a. Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 254-259.
- Robb E.L., Page M.M., Wiens B.E., Stuart J.A. 2008b. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: specific and progressive induction of MnSOD, *Biochemical and biophysical research communications* 367, 406-412.
- Signorelli P., Ghidoni R. 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 449-466.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D. *et al.* 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1107-1112.
- Souza I.C.C., Martins L.A.M., Coelho B. P. *et al.* 2008. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Molecular and cellular biochemistry* 315,1-7.
- Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. 2001 In: Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M., Strober, W. (eds.). *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons.
- Tsukada, S., Parsons P. J. & Rippe R. A. 2006. Mechanism of Liver Fibrosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 364, 33-60.
- Urtasun R., Nieto N. 2007. Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev. Esp. Enferm Dig (Madrid)* 4, 223-230.

Vieira de Almeida L. M., Piñeiro C. C., Leite M. C. et al. 2008. Protective effects of Resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochemistry. Res.* 33, 8-15.

Wenzel E., Somoza V. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research.* 49, 472-481.

Zini R., Morin C., Bertelli A., Bertelli A.A., and Tillement J.P. 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research* 25, 87-97.

FIGURES

Table 1 RSV effects on cell viability and survival.

Assay	Groups	24 Hours	120 Hours
MTT Reduction	Control	0,70 ± 0,004	0,55 ± 0,011
	0,1µM	0,67 ± 0,009	0,58 ± 0,008
	1µM	0,70 ± 0,010	0,57 ± 0,007
	10µM	0,66 ± 0,007	0,52 ± 0,021
	50µM	0,50 ± 0,016*	0,2 ± 0,0025*
% Survival cells from control Sulforhodamine B	Control	100 ± 8,16	100 ± 9,46
	0,1µM	97,6 ± 4,11	105,6 ± 3,91
	1µM	103,9 ± 8,11	103,4 ± 6,53
	10µM	113,9 ± 5,94	102,3 ± 2,60
	50µM	81,5 ± 5,42*	55,3 ± 7,00*
% Unviable cells stained by Trypan	Control	3,52 ± 0,78	14,3 ± 0,41
	0,1µM	4,07 ± 0,32	14,7 ± 0,54
	1µM	5,37 ± 0,59	14,0 ± 0,68
	10µM	4,59 ± 0,46	14,2 ± 1,20
	50µM	14,9 ± 2,05*	12,3 ± 0,72

The effects of RSV on the cell viability and survival were established through MTT, Sulforhodamine B and Trypan Blue percentual of unviable cells counting. Data represents mean ± S.E.M. (n=4) of two independent experiments. The * symbol indicates statistically significant differences between groups (P< 0.05).

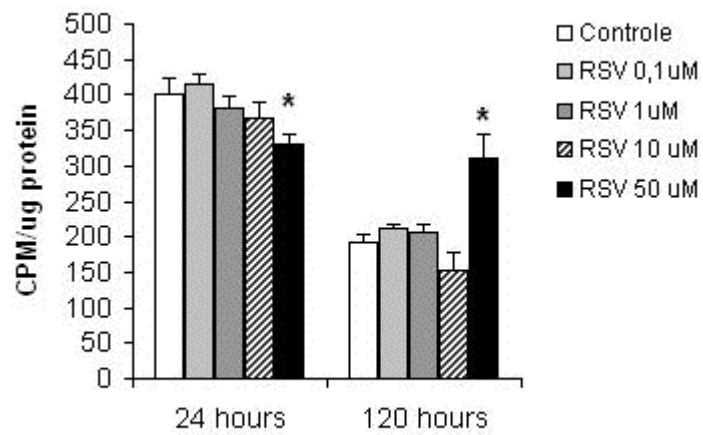


Figure 1 Effect of resveratrol on GRX cells proliferation: GRX cells were treated with 0 (control), 0.1, 1, 10 and 50 μM of RSV for 24 or 120 hours and the proliferation measured by [^3H] thymidine incorporation assay as described in Material and Methods. Data represents mean \pm S.E.M. (n=4) of three independent experiments. The * symbol indicates statistically significant differences between groups ($P < 0.05$).

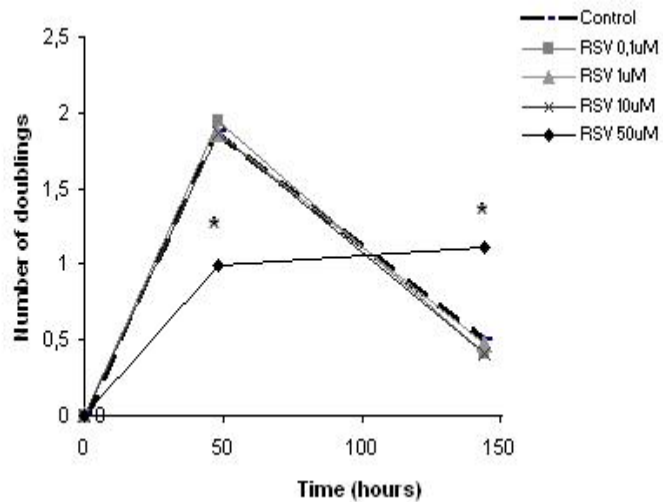


Figure 2 Cell duplication index: The number of cells doublings was determined as previously described. Data represents mean \pm S.E.M. (n=4) of two independent experiments. The * symbol indicates statistically significant differences between 50 μM of RSV treated group and the others ($P < 0.05$).

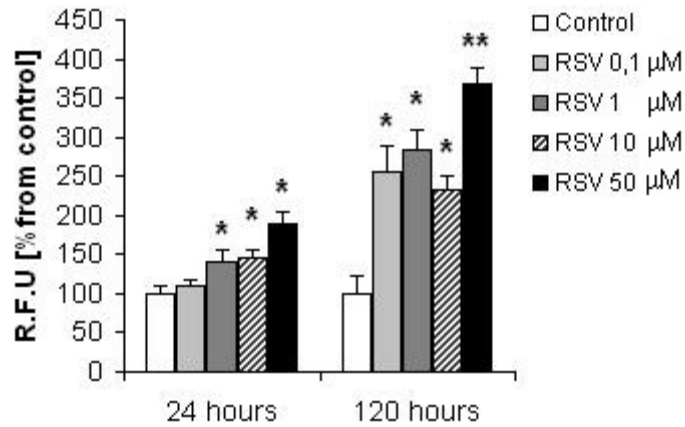


Figure 3 Effect of resveratrol on ROS production. GRX cells were treated with 0 (control), 0.1, 1, 10 and 50 μM of RSV for 24 or 120 hours and the intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent and cell-membrane permeable 2'-7'- Dichlorofluorescein Diacetate (DCF-DA). Fluorescent DCF/Comparison with control (=100%). Data represents mean \pm S.E.M. (n=4) of three independent experiments. The * symbol indicates statistically significant differences. At 120 hours, the ** symbol represents significant differences between 50 μM of RSV treated group and the others ($P < 0.05$).

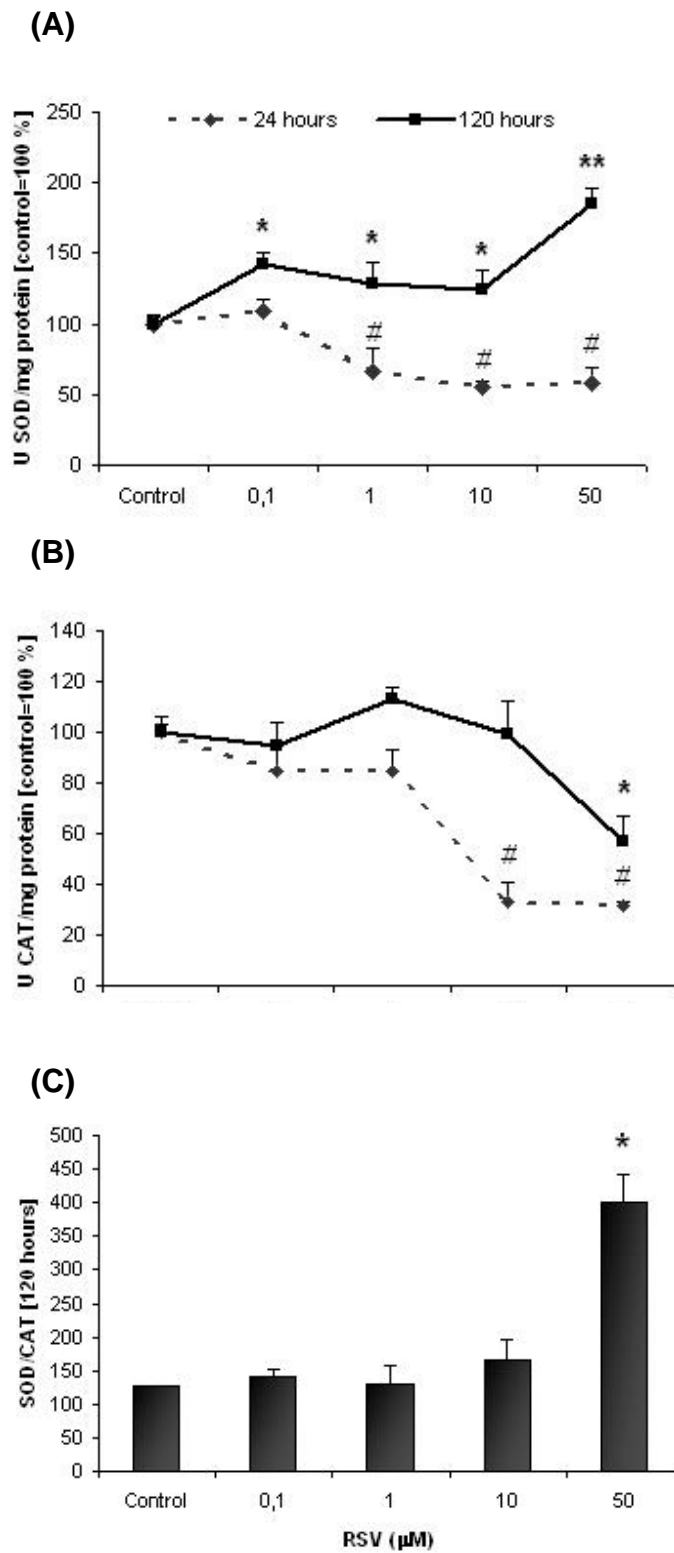


Figure 4 Antioxidant enzymes activities. GRX cells were treated with 0 (control), 0.1, 1, 10 and 50 μM of RSV for 24 or 120 hours and the SOD (A) and CAT (B) activities determined. (C) Represents the SOD/CAT ratio at 120 hours. Data was expressed as percentage of control and represents mean \pm S.E.M. (n=4) of three independent experiments. The * and # symbols indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

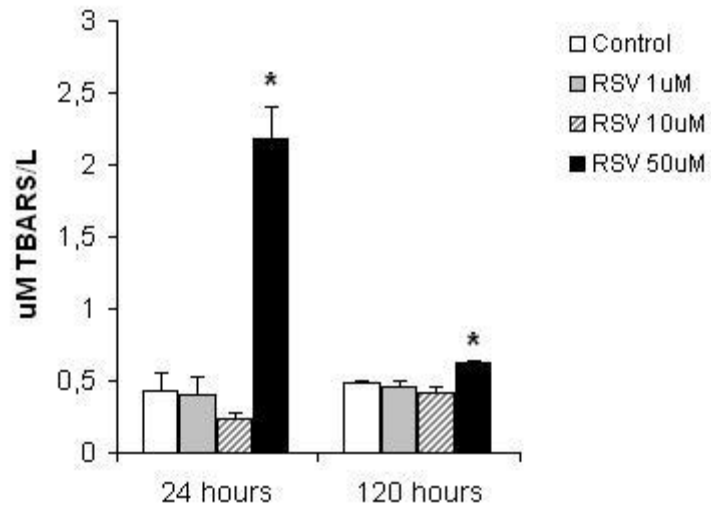


Figure 5 Lipid peroxidation. GRX cells were treated with 0, 1, 10 and 50 μ M of RSV for 24 or 120 hours and the lipid peroxidation measured by the determination of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). Data represents mean \pm S.E.M. (n=4) of two individual experiments. The * symbol indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

II.2. RESULTADOS COMPLEMENTARES

II.2.1. Efeito do RSV sobre a migração da GRX

A fibrose hepática é resultado de um desequilíbrio homeostático causado por injúrias repetidas ao fígado. Neste contexto, as HSC desempenham o principal papel no desenvolvimento desta patologia, sendo as responsáveis pela alta produção de matriz extracelular e seus componentes (Friedman 2008a).

As HSC consistem em uma população heterogênea do tecido conjuntivo hepático e estão associadas a diversas funções importantes no fígado saudável. Entre estas, a capacidade destas células de produzir sinais parácrinos é um processo necessário relacionados com a regeneração do fígado, que envolve a reestruturação do tecido hepático e a diferenciação de novos hepatócitos (Friedman 2008a). No local onde se estabelece o dano hepático, as HSC se acumulam e produzem matriz extracelular. Neste contexto, a capacidade de migração das HSC até os locais de dano é importante e já foi sugerido que as moléculas de sinalização produzidas por estas células também são responsáveis por este fenômeno (Schwabe *et al.* 2003).

Doses baixas de O_2^- não são citotóxicas para as HSCs e são capazes de produzir uma modulação no citoesqueleto que favorecem a migração destas células (Novo 2005). De fato, RL ou ERO são importantes em inúmeros processos fisiológicos normais. No entanto, o desequilíbrio entre a produção de RL ou ERO e as defesas antioxidantes celulares resulta em estresse oxidativo, que está claramente associado à modulação das HSC para o fenótipo ativado. Os danos contínuos ao fígado produzem estresse oxidativo e geram uma resposta de cicatrização ou reparo hepático exagerado por parte das HSC,

resultando, entre outras alterações, em um aumento na capacidade de migração (Lee *et al* 2001, Friedman 2008a).

O presente estudo avaliou os efeitos do RSV, uma fitoalexina que tem recebido muita atenção dos cientistas nas últimas décadas, na linhagem celular GRX representativa das HSC (Borojevic *et al.* 1985). Os efeitos benéficos do RSV à saúde incluem seu potencial antioxidante e antiproliferativo. Desta forma, tem se debatido a utilização desta molécula vegetal no tratamento de inúmeras patologias, entre estas, diversos tipos de cânceres e doenças cardíacas (King *et al.* 2006, Wenzel & Somoza 2005). Em vista das características que envolvem o desenvolvimento da fibrose hepática, a utilização do RSV em um possível tratamento desta doença é coerente. Entre algumas possibilidades, a reversão da fibrose hepática tem como foco a diminuição da proliferação e da produção de matriz extracelular pelas HSC, bem como, seu possível retorno ao fenótipo quiescente.

O tratamento com doses a partir de 1 μ M de RSV por 24 horas foi capaz de induzir uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, bem como provocar um aumento da produção de RL ou ERO na GRX. Esta situação configurou um estresse oxidativo evidente que poderia estar influenciando processos moleculares envolvidos com a ativação das HSC, no entanto, não tínhamos nenhum dado que relacionasse os efeitos encontrados com o estado de ativação destas células.

Com intuito de investigar os efeitos do RSV sobre o estado de ativação da GRX, avaliamos sua capacidade de migração (Liang *et al.* 2007). Vinte e quatro horas após o início do cultivo, fizemos um dano na monocamada celular (risco com uma ponteira de micropipeta) e tratamos as culturas com doses de 1, 10 e 50 μ M de RSV por mais 48 horas. A migração celular foi acompanhada ao

microscópio de contraste de fase e fotografada (Figura 7) nos intervalos 0, 4, 8, 24, 30 e 48 horas. A porcentagem de migração foi determinada considerando-se a largura inicial da ranhura como 100% e os valores foram plotados como a porcentagem de ocupação deste espaço ao longo do tempo. Os resultados mostraram um aumento na capacidade de migração, nos grupos que receberam RSV, já nas primeiras 8 horas de exposição a esta fitoalexina. A análise da figura 8 mostra que o estímulo migratório provocado pelo RSV se mantém até 24 horas de tratamento. Este resultado está de acordo com a diminuição da atividade da SOD e o aumento do DCF fluorescente encontrados na exposição aguda ao RSV (24 horas) que sinalizam um possível aumento de O_2^- , ERO que já foi relacionada com o aumento da capacidade de migração das HSC. Paralelamente, a captação de [3H] timidina e o número de duplicações foram menores no grupo tratado com 50 μM e não se alteraram nas doses mais baixas de nosso modelo agudo, similar ao modelo deste teste de migração. Este fato fortalece os resultados apresentados neste capítulo como indício de que o RSV induz a migração da GRX.

A avaliação dos parâmetros oxidativos na GRX nos mostrou que a ação pró-oxidante do RSV depende da sua concentração e do tempo de exposição, já que, em longo prazo, esses efeitos oxidativos tendem a ser atenuados. A exposição aguda a este composto vegetal desencadeou uma resposta que pode ser relacionada a um aumento da ativação destas células. No entanto, é evidente que outros experimentos devem ser realizados para a maior compreensão dos efeitos do RSV sobre a modulação fenotípica destas células, considerando que nossos resultados mostraram que as células GRX foram capazes de se adaptar ao choque tóxico das primeiras 24 horas de exposição.

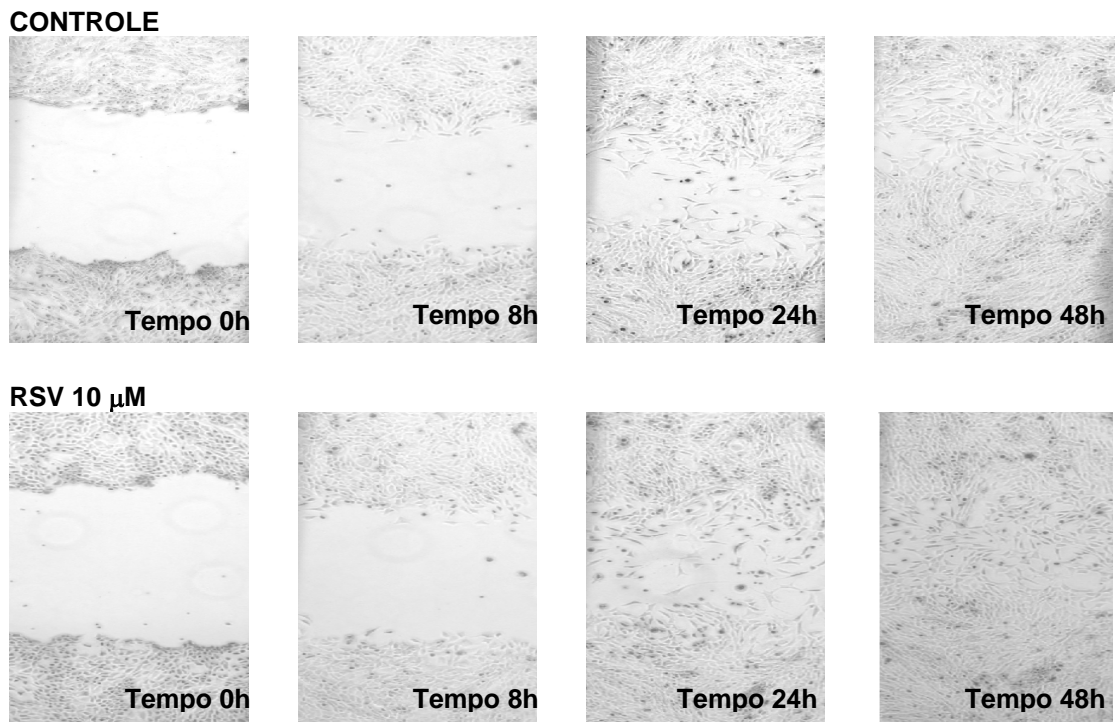


Figura 7 Imagens das culturas de GRX obtidas por microscopia de contraste de fase após o dano a monocamada (tempo zero), e 8, 24, e 48 horas após, em presença ou ausência de RSV (10 μ M).

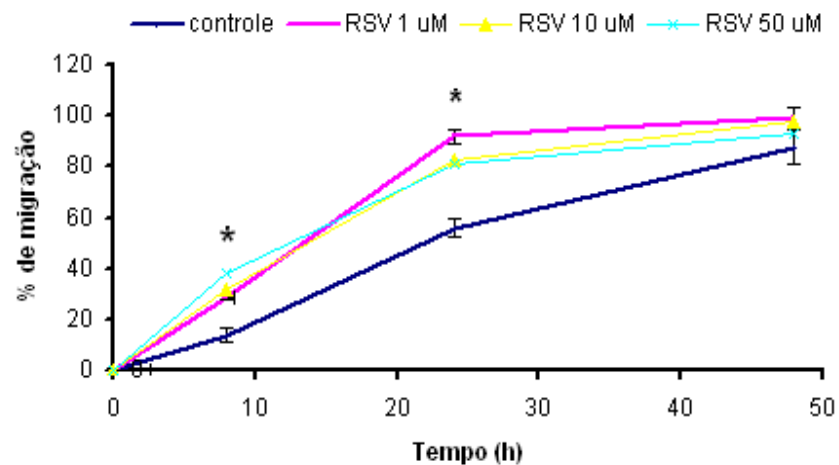


Figura 8 Efeito do RSV na migração das células GRX. O percentual de migração celular foi calculado considerando-se a largura inicial da ranhura (tempo zero) como 100%. Os valores representam o percentual médio \pm E.P.M de dois experimentos realizados em quadruplicata. As diferenças foram analisadas pelo teste-t de Student's. * Valores estatisticamente diferentes do grupo controle, $p < 0,05$.

II.2.2. Efeito do RSV sobre o conteúdo tiólico da GRX

O RSV apresentou efeitos pró-oxidativos sobre a GRX, conforme atestado nos testes realizados no capítulo anterior desta parte do presente estudo. Assim, avaliamos as conseqüências destas alterações causadas por esta fitoalexina sobre o conteúdo tiólico (de proteínas ou de moléculas não protéicas) na GRX.

Estabelecemos um teste que permitiu analisar a quantidade de tióis (-SH) não oxidados em nossos dois modelos de tratamento (24 horas e 120 horas) conforme descrito anteriormente (Ellman, 1959). As células foram colocadas em culturas nas placas de 24 poços e separadas em grupos controle ou tratados com 0,1, 1, 10, ou 50 μ M de RSV. Após ambos períodos de tratamento referidos, as células foram removidas em PBS e todas as amostras foram diluídas em 0,1 % de SDS (*lauryl sulfate*) e 0,01 M de DTNB (*5,5'-dithionitrobenzic acid*) em etanol e, então, colocadas para incubação em temperatura ambiente. Depois deste período, foi medida a absorbância das amostras em espectrofotômetro em 412 nm.

A quantidade do conteúdo tiólico em proteínas ou compostos não protéicos, como a glutathione, cisteína e homocisteína, é indicativa da capacidade celular de modular seu estado redox. A oxidação ou a redução destas moléculas é um processo dinâmico e reversível que ocorre em condições fisiológicas normais (Olas *et al.* 2004, Iciek *et al.* 2004). Apesar de observarmos efeitos pró-oxidantes do RSV em algumas situações que dependeram do tempo e da concentração de tratamento, este teste mostrou que não houve, em nenhum grupo que recebeu RSV, a diminuição significativa de tióis não oxidados. Este resultado mostrou que esta fitoalexina não induziu alterações de caráter

oxidativas nestes componentes moleculares. Alguns estudos descrevem uma ação de proteção do RSV em relação ao dano oxidativo de proteínas (Olas *et al.* 2006), fato que possivelmente se repetiu no presente teste, uma vez que observamos o aumento de tióis não oxidados nos grupos tratados com 0,1 e 1 μM de RSV em 24 horas e o mesmo aumento de tióis não oxidados nos grupos tratados com 10 e 50 μM de RSV em 120 horas (Figura 9).

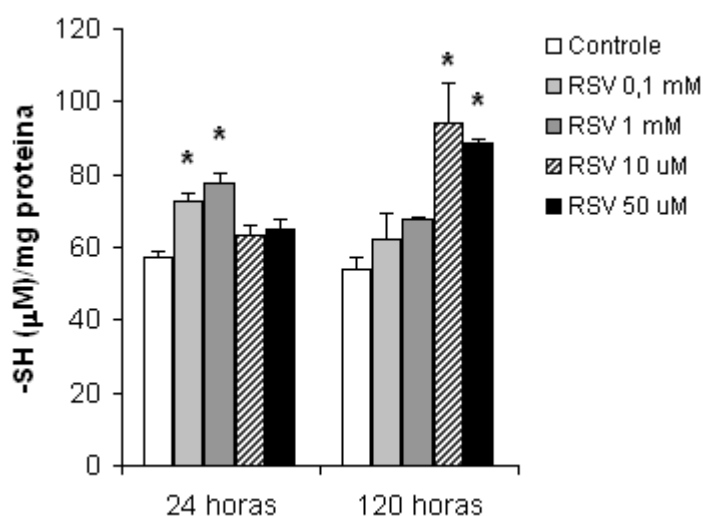


Figura 9 Conteúdo tiólico (-SH). As células GRX foram tratadas com as doses 0 (controle), 0,1; 1; 10 e 50 μM de RSV por 24 e 120 horas. O conteúdo tiólico não oxidado foi medido conforme descrito no presente capítulo e os resultados estão representados como a média dos grupos ($n=4$) \pm o erro padrão (E.P.). O símbolo * indica diferença estatística em relação ao controle ($P < 0.05$).

Para melhor compreensão acerca do que este resultado representa, são necessários outros testes que possam avaliar, também, possíveis danos oxidativos às proteínas celulares. Da mesma maneira, testes que possam medir, por exemplo, a quantidade de glutathiona reduzida ou oxidada (ambas as moléculas produzidas no sistema antioxidante celular catalisadas pelas enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona redutase) podem complementar o dado apresentado neste capítulo.

PARTE III

III.1 DISCUSSÃO

Nos últimos 25 anos tem crescido muito a compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na fibrose hepática e sobre o papel das HSC como componentes centrais no desenvolvimento deste processo patológico. A procura por terapias antifibrogênicas é uma realidade emergente que envolve o paradigma da ativação das HSC. Desta maneira, estratégias que diminuam o estímulo à modulação fenotípica destas células são importantes (Friedman & Bansal, 2006; Albanis & Friedman 2006, Kumar & Sarin 2007).

O RSV é um produto natural que tem recebido muita atenção nas últimas décadas porque, a ele, são atribuídos inúmeros efeitos biológicos favoráveis à saúde tais como seu potencial antioxidante e antiproliferativo (King *et al.* 2006, King *et al.* 2005). Paralelamente, muitos estudos indicam o estresse oxidativo como um dos fatores de indução à fibrose hepática através da ativação das HSCs, que recebem estímulos parácrinos de RL ou ERO produzidos em casos de danos crônicos ao fígado (Baroni *et al.* 1998, Urtasun & Nieto 2007, De la Lastra *et al.* 2006).

A ação do RSV na prevenção de inúmeras doenças é relevante porque esta molécula é facilmente encontrada em alimentos. Da mesma forma, é imprescindível a busca de drogas que tenham como alvo as moléculas envolvidas no desenvolvimento da fibrose hepática, uma das maiores causas de mortalidade humana. Neste contexto, a idéia de que o RSV atue favoravelmente na prevenção ou no tratamento desta doença é importante e plausível porque, a esta fitoalexina, estão associados diferentes propriedades que poderiam interferir nos mecanismos moleculares das HSCs (Lotersztajn *et al.* 2005, Friedman 2008a, De la Lastra & Villegas 2007).

A GRX corresponde à primeira linhagem celular representativa das HSCs e é induzida ao fenótipo miofibroblástico (ativado) por fatores que aumentam o estresse oxidativo (Geerts 2001, Guimarães *et al.* 2007). Já os tratamentos com indometacina e retinol são capazes de induzir a conversão da GRX para o fenótipo quiescente (lipocítico) (Margis & Borojevic 1989, Guragna *et al.* 1991). Trabalhos com diferentes tipos celulares, incluindo ensaios *in vitro* semelhantes ao nosso, mostraram que tratamentos com concentrações entre 50 e 150 μM de RSV foram tóxicos (Babich *et al.* 2000, Basly *et al.* 2000). Em relação à linhagem GRX, dados de experimentos preliminares em nosso laboratório indicaram que a dose 100 μM de RSV causou a morte destas células. Por causa deste fato, neste estudo, estabelecemos dois modelos de tratamento das culturas de GRX que representaram uma exposição aguda (24 horas) ou crônica (120 horas) ao RSV em concentrações de 0,1; 1; 10 e 50 μM .

Como primeiro objetivo, foram realizados três testes que avaliaram a viabilidade celular da GRX: o teste de MTT mediu a atividade redox das células vivas, o teste com sulforrodamina B avaliou a quantidade de células aderidas e o teste com *trypan blue* permitiu a contagem das células viáveis¹ e o cálculo do percentual de células não viáveis (Abe & Matsuki 2001, Hansen *et al.* 1989, Skehan *et al.* 1990, Strober 2001). Em ambos os modelos estabelecidos, todos os resultados referentes à viabilidade (quantidade de células vivas ao final dos experimentos) estiveram em concordância, indicando uma redução significativa apenas no grupo tratado com 50 μM de RSV. O percentual de células não viáveis em 24 horas aumentou consideravelmente no referido grupo. No entanto, após 120 horas de tratamento, constatamos uma redução, embora

¹ Valores não demonstrados na tabela 1 do capítulo II.

não significativa, do número de células não viáveis neste grupo. Estes dados mostraram que apenas a exposição aguda a doses a partir de 50 μM foi tóxica para a GRX.

A ação antiproliferativa do RSV em sistemas celulares variados é explicada por um retardo reversível ou mesmo uma parada irreversível do ciclo celular, provavelmente, por meio de uma redução de atividade das enzimas DNA polimerase e ribonucleotídeo redutase (Hayon *et al.* 2003, Heiss *et al.* 2007). Paralelamente, os alvos de tratamento da fibrose hepática incluem o controle e a redução da proliferação das HSC ativadas (Albanis & Friedman 2006, Elsharkawy *et al.* 2005). Considerando os resultados sobre a viabilidade celular nas culturas de GRX, partimos para a investigação dos efeitos do RSV sobre a proliferação celular. Para tal, utilizamos o método de incorporação de [^3H] timidina e o cálculo do número de duplicações celulares a partir da contagem das células em hemocitômetro (Kawada *et al.* 1998, Lorge *et al.* 2008). Em 24 horas houve uma diminuição da incorporação de [^3H] timidina, entretanto, de maneira surpreendentemente inversa, o mesmo grupo apresentou um aumento da incorporação de [^3H] timidina após 120 horas. Devido à diminuição do percentual de células não viáveis encontrado na exposição crônica, a maior incorporação de [^3H] timidina poderia estar associada a uma resposta de reparo ao DNA (Guma *et al.* 1993). No entanto, o cálculo do número de duplicações celulares mostrou que, após o choque tóxico das primeiras 24 horas, as células tratadas com 50 μM de RSV que permaneceram viáveis continuaram a proliferar. A célula GRX apresenta pouca inibição por contato mesmo quando em confluência (Borojevic *et al.* 1991), entretanto, o fato de haver menos células nos poços tratados com a dose mais alta de RSV também pode favorecer a proliferação neste grupo.

São muitas as referências que associam os efeitos benéficos do RSV ao seu potencial antioxidante. Contudo, pesquisas recentes têm revelado que esta fitoalexina pode se comportar como um agente pró-oxidante, dependendo da concentração e do sistema celular em que é administrada. De fato, há uma idéia emergente de que todo antioxidante é um agente redox com capacidade tanto de reduzir quanto de oxidar outras moléculas. Neste contexto, já foi demonstrado que o RSV é capaz de produzir dano ao DNA devido a um efeito pró-oxidante, potencializado quando há a presença do íon cobre (De la Lastra & Villegas 2007). O mecanismo de citotoxicidade do RSV causa a parada do crescimento celular – fato que observamos na GRX em um estudo anterior do nosso grupo (Souza *et al.* 2008) – e, provavelmente, envolve uma oxidação desta molécula na presença de cobre (Babich *et al.* 2000). Sobre este aspecto, se sabe que os altos níveis de estresse oxidativo são tóxicos e usualmente acarretam na diminuição de proliferação celular, enquanto níveis baixos ou moderados são toleráveis e podem provocar o aumento de proliferação em alguns tipos de culturas celulares (Halliwell & Gutteridge 2000). Desta forma, os efeitos que observamos sobre a proliferação nos grupos tratados com 50 μ M de RSV nos dois modelos de tratamento poderia ser conseqüência de uma ação pró-oxidante da fitoalexina que gerou estresse oxidativo. Sobre este ponto de vista, a baixa quantidade de células encontrada após 120 horas de tratamento, no grupo que recebeu 50 μ M de RSV, deve ser uma conseqüência da diminuição de proliferação e da significativa morte celular por um efeito tóxico observados somente nas primeiras 24 horas de tratamento.

O oxigênio molecular e seus derivados reativos são importantes em diversos processos metabólicos nas células de organismos aeróbios. No entanto, de forma paradoxal, estes também estão relacionados com o

desenvolvimento de inúmeras doenças porque a alta reatividade destas moléculas pode causar danos a outras biomoléculas (Halliwell & Gutteridge 2000, Halliwell & Whiteman 2004, Imlay 2003). Os antioxidantes são importantes para a neutralização dos RL e das ERO, reduzindo o dano oxidativo causado por estes compostos (Halliwell 2006). Em virtude dos nossos primeiros resultados e da suspeita de que o RSV estaria tendo uma ação pró-oxidante em nossos dois modelos, em especial no grupo 50 μM , partimos para uma avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo nas células GRX tratadas com as diferentes concentrações desta fitoalexina.

O primeiro teste realizado estabeleceu a quantidade das moléculas oxidantes através do DCF fluorescente, produzido pela reação entre o DCF e os RL ou as ERO intracelulares (De Almeida *et al.* 2008, Halliwell & Whiteman 2004). Observamos um aumento na produção de RL ou ERO a partir do grupo que recebeu a concentração de 1 μM de RSV em 24 horas. Em 120 horas, este aumento ocorreu já a partir do grupo tratado com 0,1 μM de RSV. Em ambos os modelos estabelecidos, o grupo tratado com 50 μM apresentou um aumento significativo de produção de RL ou ERO quando comparado a todos os demais grupos.

A produção excessiva de RL ou ERO, que inclui o superóxido (O_2^-) e o H_2O_2 , está associada ao desenvolvimento de inúmeras patologias, incluindo a fibrose hepática. A SOD e a CAT representam, respectivamente, as primeiras defesas moleculares contra os danos causados por estas moléculas oxidantes. Alterações na atividade destas duas enzimas podem estar associadas com a situação de estresse oxidativo (Halliwell 2006, Bartosz 2005, Friedman 2008a, Lee *et al.* 2001). Para compreendermos o papel do RSV sobre o ambiente

redox da GRX, investigamos as atividades destas duas enzimas antioxidantes. Em 24 horas, a atividade da SOD diminuiu a partir do grupo que recebeu a dose 1 μM de RSV. De forma quase similar, a ação da CAT nestas células também foi reduzida a partir do grupo tratado com 10 μM de RSV. Em 120 horas, a atividade da SOD na GRX aumentou consideravelmente a partir da menor concentração de RSV. As células tratadas com 50 μM apresentaram a atividade mais elevada entre todos os grupos. Já a atividade da CAT permaneceu diminuída apenas nas células que receberam 50 μM .

O estresse oxidativo se configura quando há mais RL ou ERO do que moléculas antioxidantes nos sistemas celulares expostos ao oxigênio. Nesta situação, o ataque destas moléculas reativas ao DNA, às proteínas e aos lipídios de membrana pode acarretar danos estruturais irreversíveis e morte de células (Halliwell & Gutteridge 2000). Em 24 horas, observamos que houve um desequilíbrio evidente entre a produção de RL ou ERO e a atividade das principais defesas antioxidantes enzimáticas (SOD e CAT) a partir de 1 μM de RSV. Este efeito pró-oxidante, encontrado nas GRX no tratamento agudo com RSV, contradiz as propriedades antioxidantes do RSV descritas em muitos estudos.

A relação SOD/CAT também tem sido apontada como um dado importante no estabelecimento do estado redox das células. Assim sendo, mesmo que o estímulo na atividade da SOD acompanhe a produção de O_2^- , uma baixa atividade enzimática da CAT resultaria em um acúmulo de H_2O_2 , uma ERO importante na formação do $\cdot\text{OH}$ através da reação de Fenton (Halliwell 2006, Liochev & Fridovich 2007, Oliveira *et al.* 2007). Em 120 horas de tratamento, observamos um aumento na produção de RL e ERO e na atividade da SOD em

reposta a todas as doses de RSV. Como a atividade da CAT se manteve diminuída nas células que receberam 50 μM de RSV, apontando um desequilíbrio a favor da SOD em relação à CAT, sugerimos que esta situação também pode estar relacionada com o estabelecimento de estresse oxidativo.

A lipoperoxidação altera a estrutura e o funcionamento das membranas celulares e está associada aos efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas (Halliwell & Gutteridge 2000, Dal-Pizzol *et al.* 2000). A medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um teste que indica os níveis de lipoperoxidação celular pela quantificação de MDA gerados por ação de RL ou ERO (Gutteridge 1995, Draper 1990). Nos nossos dois modelos de tratamento, o RSV produziu uma maior quantidade de TBARS nos grupos tratados com a concentração de 50 μM . No entanto, foi relevante que estes níveis indicativos de lipoperoxidação foram muito mais expressivos em 24 horas do que em 120 horas. Embora não tenham ocorrido danos lipídicos nas células que receberam as concentrações mais baixas de RSV, a alta lipoperoxidação no grupo tratado com 50 μM de RSV está seguramente associada a um dano por consequência de estresse oxidativo. Desta maneira, estes resultados estão de acordo com o aumento do percentual de células não viáveis, e sustentam a idéia de que 50 μM RSV provocou um efeito tóxico em 24 horas. Ainda que também tenha ocorrido aumento da lipoperoxidação no mesmo grupo em 120 horas, não houve alteração no percentual de células não viáveis, o que indica um efeito tóxico menor do que o encontrado na exposição aguda.

As proteínas e os compostos tiólicos não protéicos como a glutathiona (GSH), a cisteína e a homocisteína são elementos indicativos da capacidade

da célula em modular seu estado redox. A oxidação e a redução de tióis protéicos e não protéicos são processos dinâmicos e reversíveis que acontecem em condições fisiológicas normais. A quantificação dos tióis não oxidados ou reduzidos é uma maneira de determinar o estado redox das células (Olas *et al.* 2004, Iciek *et al.* 2004, Elman 1959). Em nenhum de nossos modelos de tratamento ou doses de RSV usadas houve um aumento significativo de compostos protéicos e/ou não protéicos oxidados, apesar da alta produção de RL e ERO, da modulação de atividade enzimática antioxidante e do aumento de lipoperoxidação referidos. Em 24 horas, observamos que nos grupos tratados com 0,1 e 1 μM de RSV houve um aumento significativo de tióis reduzidos. Já após 120 horas, o tratamento celular com 10 e 50 μM de RSV induziu o aumento de tióis reduzidos. Alguns estudos descrevem uma ação de prevenção do RSV contra danos oxidativos em proteínas (Olas *et al.* 2004, Olas *et al.* 2006) e esse fato possivelmente se repetiu em nossos modelos de tratamento.

A capacidade de migração é uma característica importante das HSC devido ao papel desempenhado por estas células nos eventos de cicatrização ou reparo de danos teciduais hepáticos. Este é um mecanismo que ocorre em situações normais e não está relacionado ao desenvolvimento da fibrose hepática. No entanto, a modulação das HSC para o fenótipo ativado acarreta uma série de modificações nestas células, inclusive, o aumento desta capacidade de migração (Friedman 2008a, Li *et al.* 2008). Os RL ou ERO, principalmente o O_2^- , estão associados ao estímulo de migração nas HSC (Novo *et al.* 2005). Considerando que a menor atividade da SOD observada nas primeiras 24 horas de tratamento pode indicar um aumento na concentração intracelular de O_2^- , avaliamos os efeitos do RSV nas

concentrações 1, 10 e 50 μM sobre a migração da GRX através do teste do dano e cicatrização da camada celular (Liang 2007). Observamos aumento significativo da migração já no grupo que recebeu a concentração mais baixa de RSV. Estes resultados podem, seguramente, ser associados aos efeitos pró-oxidantes do RSV nesse sistema celular.

Analisados em conjunto, todos estes dados permitiram a constatação de que o RSV, nas doses e tempos utilizados, atua como agente pró-oxidante nas células GRX, causando estresse oxidativo nas células tratadas com a maior dose. Os efeitos pró-oxidantes do RSV ocorreram de forma dependente da concentração e do tempo de tratamento. O desequilíbrio entre os RL ou ERO e as defesas antioxidantes nas células que receberam 1 e 10 μM de RSV foi observado apenas no tratamento agudo (24 horas). Apesar desse fato, não houve dano lipídico ou ao conteúdo tiólico dos compostos protéicos e/ou não protéicos da GRX, e, por este motivo, não se configurou uma situação de estresse oxidativo nas células tratadas com estas concentrações no referido tempo. No tratamento crônico (120 horas) foi observado um equilíbrio maior entre a produção de RL ou ERO e as atividades das enzimas antioxidantes em todos os grupos tratados.

As células que receberam 50 μM de RSV apresentaram estresse oxidativo por lipoperoxidação tanto em 24 horas quanto em 120 horas de exposição. Entretanto, ficou evidente que estes danos na GRX foram menores no modelo crônico, onde observamos a diminuição de TBARS e do percentual de células não viáveis, em comparação com o modelo agudo. Em vista desses parâmetros, é possível dizer que a exposição da GRX ao tratamento com as doses de 1, 10 e 50 μM de RSV causou um efeito pró-oxidativo que é atenuado

ao longo do tempo. Os resultados encontrados sobre a proliferação, a citotoxicidade e a capacidade de migração destas células também sustentam este argumento.

O potencial antioxidante do RSV, devido sua capacidade de sequestrar RL ou ERO, é amplamente debatido (De la Lastra & Villegas 2007). Porém, a baixa biodisponibilidade do RSV faz com que seu efeito de proteção celular por neutralização direta dos RL e das ERO seja pouco importante, apesar desta ser uma possibilidade coerente em virtude da estrutura química desta fitoalexina. Por este motivo, uma hipótese mais plausível é a de que o RSV produziria um efeito antioxidante através da sua capacidade de induzir uma cascata de sinalização que leva a um *upregulation* dos sistemas de defesa antioxidante celular. De fato, pesquisas recentes concluíram que o RSV é capaz de induzir o aumento da quantidade e da atividade Mn-SOD² em células murinas cerebrais e na célula MRC-5, uma linhagem celular de fibroblastos pulmonares (Robb *et al.* 2008a, Robb *et al.* 2008b). Por outro lado, se sabe que o estresse oxidativo pode resultar em dano e/ou em adaptação celular. A tolerância em relação ao ambiente oxidante está seguramente relacionada com algumas alterações na expressão de genes e com o aumento da síntese e da ação dos sistemas de defesas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge 2000).

A produção aumentada de RL ou ERO nas células tratadas com RSV foi observada em 24 horas (a partir de 1 μ M) e se manteve elevada nas 120 horas de exposição (em todas as doses). A diminuição do percentual de células inviáveis e de TBARS no tratamento com 50 μ M de RSV por 120 horas,

² A Superóxido Dismutase consiste numa família de enzimas composta pela CuZn-SOD (ou SOD1) presente nos espaço intercelulares citoplasmático celular; Mn-SOD (ou SOD2), presente nos espaços intramitocondriais; e a EC-SOD (ou SOD3) presente em ambientes extracelulares (Zelko *et.al.* 2002).

mostrou que estas foram mais resistentes ao estresse oxidativo, produzido já nas primeiras 24 horas. De fato, o RSV interferiu consideravelmente na atividade da SOD na GRX. Em longo prazo, a administração desta fitoalexina em todas as concentrações de estudo produziu aumento da atividade desta enzima antioxidante, que acompanhou o aumento referido de RL ou ERO. Neste sentido, observamos que os efeitos pró-oxidantes do RSV parecem estimular a ação da SOD, e este fato deve estar relacionado com um processo adaptativo de resistência ou tolerância ao estresse oxidativo.

A disponibilidade sanguínea do RSV após a ingestão de alimentos que o contenham é em torno de 0,1 μM (Bertelli *et al.* 1998). Este é um fato importante porque, em nosso estudo, as alterações produzidas por esta concentração ocorreram após 120 dias, tanto na produção de RL ou ERO, como na atividade da SOD. Este resultado mais uma vez sustenta nossa hipótese de que o efeito pró-oxidante do RSV pode ter relação com o aumento da atividade da SOD em longo prazo. Neste caso, do ponto de vista prático, a ingestão de alimentos que contenham RSV seria benéfica porque esta fitoalexina poderia ter um efeito na prevenção da fibrose hepática por tornar as HSC mais resistentes ao estresse oxidativo, um dos fatores responsáveis pela sua ativação. Em nosso modelo experimental, este fato foi mostrado nos tratamentos com a dose de 50 μM , onde verificamos uma possível seleção de células mais resistentes ao estresse oxidativo que continuaram viáveis e responderam aumentando as defesas antioxidantes.

Apesar da ação pró-oxidante, não podemos descartar que o tratamento com RSV resultou em alguns efeitos que podem ser considerados benéficos. Dessa forma, a necessidade de se entender outros alvos de ação do RSV nestas células é evidente, e outros estudos são necessários para obtermos

respostas mais amplas que contribuam para o melhor entendimento de sua ação, que possibilitem sua utilização no tratamento desta patologia.

III.2. CONCLUSÕES

1. O tratamento agudo (24 horas) com 50 μM de RSV causou uma diminuição da viabilidade das células GRX.
2. No modelo crônico, apesar da alta taxa de morte celular verificada nas primeiras 24 horas de tratamento no grupo que recebeu 50 μM de RSV, observamos que as células GRX permaneceram viáveis e proliferativas após o choque tóxico inicial.
3. O RSV induziu o aumento de RL ou ERO em ambos os modelos de tratamento: Em 24 horas, a partir da concentração 1 μM e, em 120 horas, a partir de 0,1 μM .
4. A atividade da CAT diminuiu no modelo agudo nos grupos tratados com 10 e 50 μM de RSV. No modelo crônico houve diminuição apenas no grupo que recebeu a maior dose. A atividade da SOD diminuiu no modelo agudo nos grupos tratados com 1, 10 e 50 μM de RSV. No modelo crônico houve um aumento da atividade da SOD em todas as concentrações de RSV.
5. A ação pró-oxidante do RSV gerou um aumento de estresse oxidativo, observado nas primeiras 24 horas de exposição, que é atenuado ao longo de 120 horas de exposição.
6. Os resultados referentes à viabilidade, à proliferação e aos parâmetros de estresse oxidativo mostraram que houve um processo adaptativo nas células que resistiram ao choque tóxico das primeiras 24 horas.
7. O RSV aumentou a capacidade migração das GRX a partir da dose 1 μM .

III.3. PERSPECTIVAS

Em relação à linhagem GRX, observamos que o RSV induziu efeitos interessantes que podem estar relacionados com mecanismos envolvidos na modulação fenotípica destas células. Para isso, são necessários mais estudos que avaliem ação desta fitoalexina em outros processos moleculares na GRX para obtermos mais respostas. Sobre esse ponto de vista, pretendemos dar continuidade a este trabalho avaliando: a expressão gênica da superóxido dismutase e da catalase; a produção das ERO relacionadas com a ação destas duas enzimas – H₂O₂ e O₂ – nas células tratadas ou não com RSV; a ação de metaloproteinases na degradação da matriz extracelular; a disposição dos filamentos de actina por marcação de rodamina faloidina e a localização de proteínas de adesão por imunocitoquímica. Temos também como perspectiva, avaliar a relação do RSV sobre algumas vias de sinalização envolvidas com a modulação fenotípica das HSCs, que abrangem moléculas como NFκβ, SIRT-1 e PPARγ, relacionando-as com os resultados descritos no presente estudo e nos demais trabalhos de nosso grupo. Somente uma compreensão mais ampla a respeito das conseqüências de todas as alterações atestadas até então permitirá relacionar, com maior precisão, o RSV ao tratamento da fibrose hepática.

REFERÊNCIAS

- Abe K., Matsuki N. 2001. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience research* 38, 325-329.
- Albanis E., Friedman S. L. 2006. antifibrotics agents for liver disease. *American Journal of Transplantation* 6,12-19.
- Andreazza A. C., Soares D. G., Kehl L. F. *et al.* 2004. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: Izquierdo I., Quevedo J., Kapczinski F. (org.) *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Artmed, Porto Alegre, pp. 489-496.
- Babich H., Reisbaum A.G., Zuckerbraum H.L. 2000. *In vitro* response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicology Letters* 114, 143-153.
- Basly J.P., Fournier M.F., Le Bail J.C. *et al.* 2000. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sciences* 66, 769-777.
- Baroni G. S., D'ambrosio L., Ferreti G. *et al.* 1998. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 27, 720-726.
- Bartosz G. 2005. Superoxide dismutase and catalase. *The handbook of environmental chemistry* 2, 109-149.
- Bataller R., Brenner D. A. 2005. Liver Fibrosis. *The journal of clinical investigation* 115, 209-218.
- Bertelli A., Bertelli A.A., Gozzini A., Giovannini L. 1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs under experimental and clinical research* 24, 133-138.

- Borella L., Varela Q. 2004. Antioxidantes enzimáticos. In: Salvador M., Henriques J.A.P (org.) Radicais Livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. ULBRA, Canoas, pp.35-49.
- Borojevic R., Monteiro A. N., Vinhas S. A. *et al.* 1985. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In vitro Cellular. Development Biology* 21, 382–390.
- Borojevic R., Guaragna R.M., Margis R., Dutra H.S. 1990. *In vitro* induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. *In vitro Cellular and Development Biology* 26, 361-368.
- Borojevic R., Guaragna R.M., Vicente, C. *et al.* 1991. *In vitro* conversion of a hepatic myofibroblast cell line GRX into lipocyte (Ito cells). In: Wisse E., Knook D.L., McCuskey R.S. (Ed.) Cells of the hepatic sinusoid. The Kupffer cells foundation, pp. 249-252.
- Dal-Pizzol F., Klamt F., Mário L.C. *et al.* 2000. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 291, 179-182.
- Da Silva F.M., Guimarães E.L.M., Grivicich I. *et al.* 2003. Hepatic stellate cell activation *in vitro*: cell cycle arrest at G2/M and modification of cell mobility. *Journal of Cellular Biochemistry* 90, 387-396.
- De Almeida L. M. V., Piñeiro C. C., Leite M. C. *et al.* 2007. Protective effects of Resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochemistry. Research* 33, 8-15.
- De la Lastra C. A., Villegas I., Martín R. A. Resveratrol as an antioxidant. 2006. In: Bharat Aggarwal & Shishir Shishodia (org.). Resveratrol in health and disease. CRC Press. pp. 33-56.

- De la Lastra C.A., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanism and clinical implications. *Biochemical Society Transactions* 35, 1156-1161.
- Draper H.H., Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421–3.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- Ellman G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* 82, 70-77.
- Elsharkawy A. M., Oakley F., Mann A. 2005. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 10, 927-939.
- Ferreira A.L.A., Matsubara L.A. 1997. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med Brasil.* 43, 61-68.
- Friedman S.L. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, and integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2247-2250.
- Friedman S.L. 2003. Liver Fibrosis – From Bench to bedside. *Journal of hepatology* 38, 38-53.
- Friedman S.L., Bansal M.B. 2006. Reversal of hepatic fibrosis – Fact or fantasy? *Hepatology.* 43, S82-S83.
- Friedman S.L. 2008a. Hepatic Stellate Cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* 88, 125-172.
- Friedman S.L. 2008b. Mechanism of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655-1669.

- Geerts A. 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*. 21, 311–35.
- Guaragna R.M., Trugo L., Borojevic R. 1991. Neutral lipid synthesis and accumulation during *in vitro* induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1085, 29-34.
- Guimarães E. L. M., Franceschi M. F. S., Grivicich I. *et al.* 2007. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver International* 26, 477-485.
- Guma F.C.R., Martini L.H. Bernard E.A. 1993. Retinol effects in Sertoli cells: [Methyl-3H thymidine incorporation into DNA. *Medical Science Research* 21, 9-10.
- Gutteridge J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidant as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41, 1819-1822.
- Halliwel B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs aging* 18, 685-716.
- Halliwel B. 2006. Reactive Species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141, 312-322.
- Halliwel B., Gutteridge. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3thed. Clarendon Oxford.
- Halliwel B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology* 142, 231-255.
- Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods* 119, 203–21.

- Hautekeete, M.L., Geerts A. 1997. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Archives*. 430, 195-207.
- Hayon T., Dvilansky A., Shpilberg O., Nathan I. 2003. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leukemia & lymphoma* 44, 1957–1962.
- Heiss E.H., Schilder Y.D.C., Dirsch D.M. 2007. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress-and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 26759-26766.
- Iciek M., Chwatko G., Lorenc-Koci E., *et al.* 2004. Plasma levels of total, free and protein bound thiols as well as sulfane sulfur in different age groups of rats. *Acta biochimica polonica*. 51, 815-824.
- Imlay J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology* 57, 395-418.
- Junqueira L. C., Carneiro, J. *Histologia Básica*. 2004. 10^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kawada N., Kuroki T., Kobayashi K., Inoue M., Kaneda K. 1996. Inhibition of myofibroblastic transformation of cultured rat hepatic stellate cells by methylxanthines and dibutyryl cAMP. *Digestive diseases and sciences* 41, 1022–1029.
- Kawada N., Seki S., Inoue M., and Kuroki T. 1998. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells, *Hepatology* 27, 1265–1274.
- King R.E., Kent K.D., Bomser J.A. 2005. Resveratrol induces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chemical-Biological Interactions*. 151, 143-149.

- King R.E., Bomser J.A., Min D.B. 2006. Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5, 65-70.
- Klein A. B. 2003. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: Norma Possa Marroni (Org.). *Estresse Oxidativo*. ULBRA, Canoas. pp.15-19.
- Kumar M., Sarin S. K. 2007. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian journal of pediatrics* 74, 393-399.
- Kundu K.J., Surh Y.J. 2004. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. *Mutation Research* 555, 65-80.
- Lee K.S., Lee S. J., Park H. J. *et al.* 2001. Oxidative stress effect on activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Medical journal* 42, 1-8.
- Leiro J., Álvares E., Arranz J.A. *et al.* 2004. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 1156-1165.
- Li J., Liao Z., Ping J. *et al.* 2008. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *Journal of Gastroenterology*. 43, 419-428.
- Liang C.C., Park A.Y., Guan J.L. 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*. 2, 329-333.
- Liochev S., Fridovich I. 2007. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free radical biology & medicine* 42, 1465-1469.
- Llesuy S.F. 2003. Introducción a las especies reactivas del oxígeno. In: Norma Possa Marroni (Org.). *Estresse Oxidativo*. ULBRA, Canoas pp. 21-91.

- Lorge E., Hayashi M., Albertini S., Kirkland M. 2008. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test I. Theoretical aspects. *Mutation Research* 665, 1-3.
- Lotersztajn S., Julien B. Teixeira-Clerc F.; *et al.* 2005. Hepatic Fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 605-28.
- Margis R., Borojevic R. 1989. Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX). *Biochimica et Biophysica Acta* 1011, 1-5.
- Monteiro A.N.A., Borojevic R. 1987. interaction of human liver connective tissue cells, skin fibroblast and smooth muscle cells with collagens gels. *Hepatology* 7, 665-671.
- Nelson D. L., Cox M. M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York. Freeman and company, New York.
- Novo E., Marra F., Zamara E. *et al.* 2006. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*. 55, 90-97.
- Olas B., Wachowicz B., Bald E. Glowacki R. 2004. The protective effects of resveratrol against changes in blood platelet thiols induced by platinum compounds. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 467-476.
- Olas B., Nowak P., Ponczek M., Wachowicz. 2006. Resveratrol, a natural phenolic compound may reduce carbonylation proteins induced by peroxynitrite in blood platelets. *General physiology and biophysics*. 25, 215-222.
- Oliveira M. R., Pasquali M. A. B., Silvestrin R. B., *et al.* 2007. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs

- locomotory and exploratory and exploratory activity of adults rats. *Brain Research* 1169, 112-119
- Orallo F. 2006a. Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol. *Current Medicinal Chemistry* 13, 87-98.
- Orallo F. 2006b. Biological effects of *cis*-versus *trans*-resveratrol. *In: Bharat Aggarwal & Shishir Shishodia (org.). Resveratrol in health and disease. CRC Press. pp. 577-600.*
- Pervaiz S. 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The FASEB journal* 17, 1975-1985.
- Poli, G. 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular aspects of medicin.* 21, 49-98.
- Robb E.L., Winkelmolten L., Visanji N. *et al.* 2008a. Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 254-259.
- Robb E.L., Page M.M., Wiens B.E., Stuart J.A. 2008b. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: specific and progressive induction of MnSOD, *Biochemical and biophysical research communications* 367, 406-412.
- Schwabe R.F., Bataller R., Brenner D.A. 2003. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *American Journal of Physiology* 285, 949-958.
- Seeram N.P., Kulkarni V.V., Padhye S. Sources and chemistry of resveratrol. 2006. *In: Bharat Aggarwal & Shishir Shishodia (org.). Resveratrol in health and disease. CRC Press. pp.17-32.*

- She H., Xiong S., Hazra S. Tsukamoto H. 2005. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 4959-4967.
- Shishodia S., Aggarwal B.B. Resveratrol: a polyphenol for all seasons. 2006. In: Bharat Aggarwal & Shishir Shishodia (org.). *Resveratrol in health and disease*. CRC Press pp.1-16.
- Signorelli P., Ghidoni R. 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 449-466.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D. *et al.* 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1107-1112.
- Smith C., Marks A., Lieberman M. 2007. *Mark's Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach 2nd Ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Souza I.C.C., Martins L.A.M., Coelho B. P. *et al.* 2008. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Molecular and cellular biochemistry* 315,1-7.
- Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. 2001 In: Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M., Strober, W. (eds.). *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons.
- Tsukada, S., Parsons P. J. & Rippe R. A. 2006. Mechanism of Liver Fibrosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 364, 33-60.
- Urtasun R., Nieto N. 2007. Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev. Esp. Enferm Dig (Madrid)* 4, 223-230.

- Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H. *et al.* 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition Fast Forward* 32, 1377-1382.
- Wenzel E., Somoza V. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49, 472-481.
- Zelko, I.N., Mariani T.J., Folz R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) genes structures, evolution and expression. *Free radical biology & medicine* 33, 337-349.
- Zini R., Morin C., Bertelli A., Bertelli A.A., and Tillement J.P. 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research* 25, 87-97.

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

PARTE I: INTRODUÇÃO

Figura 1 Vias de ativação da Célula Estrelada Hepática.....	16
Figura 2 Mudanças da arquitetura hepática.....	17
Figura 3 Modulação fenotípica das células GRX.....	19
Figura 4 Estruturas moleculares químicas do RSV.....	20
Figura 5 Configuração eletrônica do O, O ₂ e a geração de ERO.....	22
Figura 6 A ação da SOD e da CAT e a reação de Fenton/Haber-Weiss.....	25

PARTE II: Capítulo 1

Figure 1 Effect of resveratrol on GRX cells proliferation.....	50
Figure 2 Cell duplication index.....	51
Figure 3 Effect of resveratrol on ROS production.....	51
Figure 4 Antioxidant enzymes activities.....	52
Figure 5 Lipid peroxidation.....	53

PARTE II: Capítulo 2

Figura 7 Imagens das culturas de GRX.....	58
Figura 8 Efeito do RSV na migração das células GRX.....	58
Figura 9 Conteúdo tiólico (-SH).....	60

LISTA DE TABELAS

PARTE I: INTRODUÇÃO

Tabela 1 Exemplos de espécies reativas de oxigênio.....	23
--	----

PARTE II: Capítulo I

Table1 RSV effects on cell viability and survival.....	50
---	----