

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação do efeito da (+)-catequina em células estreladas
hepáticas**

Tese apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular como
requisito para obtenção do grau
de Doutor.

Autor

Cristina Machado Bragança de Moraes

Orientador

Professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, RS

Janeiro de 2012

Agradecimentos

À DEUS por todos os dias da minha vida;

Ao PPGBCM, pela estrutura, oportunidade e apoio financeiro;

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pelo suporte financeiro durante o Doutorado Sanduíche;

Ao meu querido Orientador Professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, a quem eu admiro e respeito muito e que foi muito mais que um orientador, mas um incentivador e um mestre;

À minha MÃE, Cleusa Maria, minha inspiração e minha força, que em todos os momentos da minha vida foi minha incentivadora e amiga, um exemplo, agradeço a você pela minha vida e por tudo que realizei até hoje;

Ao meu esposo, Cristiano Antes, meu amor, meu companheiro e incentivador sempre, que foi paciente e compreensivo nas minhas ausências, principalmente durante o doutorado sanduíche e sempre teve as palavras certas mesmo de longe para amenizar a saudade;

À minha filha Eduarda, amor incondicional, que mesmo ainda dentro da minha barriga foi uma companheira muito especial, que resistiu ao estresse das viagens e da reta final;

À minha tia amada Tânia Figueiró, que me acolheu aqui em POA e foi acima de tudo uma grande incentivadora, companheira e amiga em todo esse período;

Ao meu colega Roberto Christ, que um dia me trouxe para esse laboratório onde tudo começou, obrigada pelo presente amigo querido;

Aos meus colegas da UNIFRA que foram apoiadores e amigos sempre;

Aos professores Francesc Ventura, José Luis Rosa e Ramon Bartrons da Universitat de Barcelona por todo o aprendizado, mas principalmente pelo carinho e amizade com que me acolheram em Barcelona;

Ao Centro Universitário Franciscano-UNIFRA, pelo apoio, incentivo e confiança em meu profissionalismo;

Agradeço carinhosamente aos amigos que fiz em Barcelona e que deixaram saudades.

Aos colegas e amigos do laboratório de Pesquisa em Biofísica e Inflamação, pelo companheirismo, ajuda, incentivo e acima de tudo amizade. Vocês foram peças fundamentais para a realização deste trabalho, os estagiários Letícia

Paranhos, Gabriela Viegas, Isabella Gadegast, Patrícia Scherer, Djiuli e Gabriela Ferreira; os professores Fernanda Bordignon, Denizar Mello e Márcio Donadio, e os colegas Adroaldo Lunardelli, Leonardo Pedrazza e Ricardo Obalski;

Um agradecimento especial a Shanna Bitencourt, Fernanda Mesquita e Eduardo Caberlon, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela parceria, mas principalmente pela AMIZADE que vai ficar para sempre;

Perdoem se esqueci de nomear alguém, mas saibam que todos aqueles que conviveram comigo nestes 4 anos, tendo participado direta ou indiretamente do trabalho foram importantes e por isso agradeço de coração.

Mensagem...

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para se chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada querer. Um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos da gaveta e de algum modo partir...”

(Amyr Klink)

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO I	9
1. Introdução	10
1.1.1 Histórico	10
1.1.2 Catequina.....	11
1.1.3 Fibrose Hepática	14
1.1.4 Linhagem celular GRX	19
1.2 Justificativa	21
1.3 Objetivos	22
CAPÍTULO II	23
2. Artigo aceito para a revista “BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY”	24
CAPÍTULO III	48
3. Artigo a ser enviado para publicação	49
CAPÍTULO IV	64
4. Considerações Finais	65
CAPÍTULO V	69
5. Conclusões	70
Referências Bibliográficas	68

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antiproliferativo da catequina, assim como, se esta apresenta capacidade de reverter o fenótipo das células GRX, e quais os mecanismos envolvidos nestes desfechos. Foi avaliado o crescimento e proliferação celular em linhagem de células estreladas hepáticas ativadas, as GRX, as quais foram tratadas com catequina e extrato de cacau, e entre os possíveis mecanismos envolvidos no crescimento celular foi avaliada necrose celular pela liberação da lactato desidrogenase, apoptose, pela expressão de Caspase 3 e PARP, assim como, autofagia pela expressão de LC3. O ciclo celular foi avaliado pela expressão de p53 e p27, assim como, as rotas inflamatórias da IL-6 e COX-2 foram avaliadas por RT-PCR em tempo real e a quantificação do fator fibrogênico TGF- β . A reversão fenotípica foi avaliada pela presença de gordura nas células, por Oil-Red, assim como, pela expressão de PPAR γ , um importante fator regulador da adipogênese. Foi avaliado o colágeno total e o colágeno do tipo 1 nas células após os tratamentos. Pode-se observar que tanto a catequina como o extrato de cacau diminuiu o crescimento e proliferação celular e que esta diminuição não foi por necrose e nem mesmo pela ativação da apoptose e autofagia. A catequina induziu uma parada no ciclo celular, pela redução da p53 e p27, assim como, diminuiu a expressão de proteínas inflamatórias como a IL-6 e COX-2 e o fator fibrogênico TGF- β . Quanto a reversão fenotípica, pode-se observar a presença de gotículas de gordura nas células após tratamento com catequina e extrato de cacau, assim como, uma diminuição do colágeno tipo I e um aumento na expressão de PPAR γ após tratamento com catequina. Em conclusão, a catequina diminuiu o crescimento das células GRX, provavelmente por atividade anti-inflamatória e por parar o ciclo celular. A catequina diminuiu a síntese de TGF- β pelas células demonstrando um potencial efeito antifibrótico. Apresenta ainda, a propriedade de reverter o fenótipo ativado das células GRX para um estado quiescente e este mecanismo pode ser via ativação da rota metabólica PPAR γ .

Palavras Chave: Catequina, Cacau, HSC, GRX, IL-6, COX-2, p53, p27, Ciclo celular, TGF- β , PPAR γ , Colágeno.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antiproliferative effect of catechin, as if it has the capacity to reverse the phenotype of GRX cells, and the mechanisms involved in these outcomes. We evaluated the growth and cell proliferation in hepatic stellate cell line activated, the GRX, which were treated with catechin, and cocoa extract, and between the possible mechanisms involved in cell growth was assessed by cell necrosis release of lactate dehydrogenase, apoptosis, by expression of caspase 3 and PARP, as well as the expression of autophagy LC3. The cell cycle was measured by the expression of p53 and p27, as well as inflammatory pathways of IL-6 and COX-2 were assessed by RT-PCR Real-time quantification and fibrogenic factor TGF- β . The phenotypic reversion was determined by the presence of fat in the cells with Oil-Red, as well as the expression of PPAR γ , an important regulator of adipogenesis. We evaluated the total collagen and collagen type 1 cells after treatment. It can be seen that both catechin as the cocoa extract decreased the cell growth and proliferation and that this decrease was not due to necrosis and even the activation of apoptosis and autophagy. Catechin induced cell cycle arrest by the reduction of p53 and p27, as well as decreasing the expression of inflammatory proteins such as IL-6 and COX-2 and TGF- β factor fibrogenic. The phenotypic reversion, can observe the presence of fat droplets in the cells after treatment with catechin and cocoa extract, as well as a reduction in collagen type I and an increase in expression following treatment with PPAR γ catechin. In conclusion, catechin decreases cell growth GRX, probably anti-inflammatory activity and for stopping the cell cycle. Catechin decreases the synthesis of TGF- β by cells demonstrating the potential antifibrotic effect. It also presents the property to revert the activated phenotype of GRX cells to a quiescent state and this mechanism may be via activation of PPAR gamma metabolic pathway.

Keywords: Catechin, Cocoa, HSC, GRX, IL-6, COX-2, p53, p27, cell cycle, TGF- β , PPAR γ , Collagen.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO:

1.1.1 Histórico

Segundo Kenn (2001), a idéia de que o chocolate ou o cacau poderiam trazer benefícios à saúde é conhecida há centenas de anos. Quando Hernán Cortez visitou a América pela primeira vez, uma de suas primeiras observações foi o uso rotineiro do chocolate, principalmente pelo alto sacerdócio.

Entre os séculos 1600 e 1700, o chocolate não foi visto apenas como uma bebida de sabor prazeroso, mas também como um alimento com benefícios medicinais no tratamento de doenças cardíacas como, por exemplo, angina. Este conceito de que bebidas de cacau (*Theobroma cacao*) poderiam trazer benefícios à saúde foi amplamente divulgado entre os anos de 1850 e 1900. Somente passados cerca de 30 a 40 anos é que estas percepções foram sendo alteradas e o chocolate passou a ser considerado uma guloseima, podendo inclusive trazer malefícios a saúde Kenn (2001).

Segundo Duke (2000), as civilizações Astecas e Maias já utilizavam o cacau no preparo de chocolate, servido principalmente como bebida quente, o que seduziu os conquistadores espanhóis, sendo chamado de “ouro líquido”. Além disso, aquelas civilizações já utilizavam o cacau como alimento medicinal no tratamento paliativo de mal de Parkinson, mastites, hepatopatias, impotência sexual, febre, cistites, resfriados, queimaduras, asma e bronquites, diabetes e obesidade. Este mesmo autor sugere que as substâncias responsáveis pela ação terapêutica do cacau sejam na maioria dos casos a quercetina, a rutina, os ácidos ferúlico, cafeico e cumárico, as catequinas, as metilxantinas e vários outros polifenóis.

1.1.2 Catequinas

Um grande número de evidências epidemiológicas apoia o conceito de que dietas ricas em frutas e vegetais podem atenuar, ou retardar, o aparecimento de várias doenças, dentre elas, doenças cardiovasculares, crônico-degenerativas, entre outras (Efrain et al., 2006; Rimm, 2002). Além disso, pesquisas apoiam a idéia de que estes benefícios podem estar associados, em parte, à presença de substâncias bioativas, entre elas, os polifenóis, presentes em uma variedade de alimentos (Kris-Etherton, Kenn, 2002).

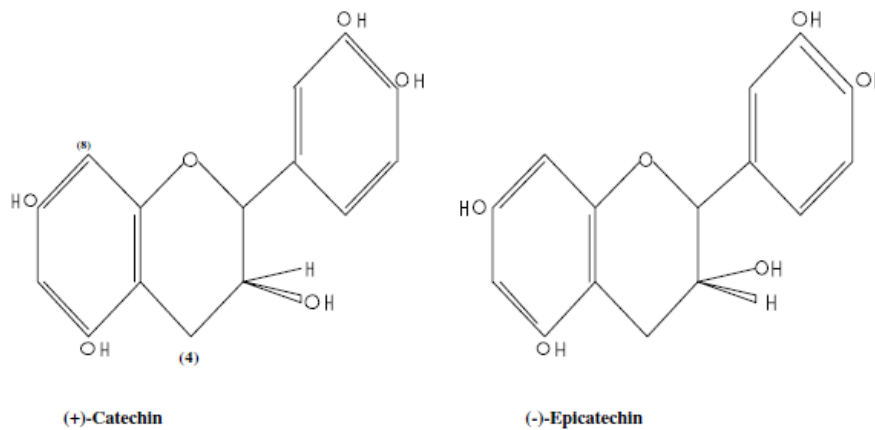
A importância de compostos naturais com capacidade antioxidante para medicina, tanto na prevenção, como no tratamento de várias doenças, vem sendo amplamente reconhecida nos últimos anos. Acredita-se que alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, bem como o diabetes e doenças reumáticas sejam causados ou potencializados pelo estresse oxidativo (Weisburger, Williams, 2000).

Os compostos fenólicos, em particular os polifenóis, são uma das classes mais estudadas dos ingredientes presentes em alimentos, como mostrado pelo número cada vez maior de artigos de investigação na área das ciências médicas e nutricionais. A atividade antioxidante dos polifenóis pode desempenhar um papel importante na prevenção da oxidação e proteção para danos no DNA. Além disso, estes compostos possuem várias atividades biológicas, tais como, atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica (Harborne 1986; Arts e Hollman 2005; Scalbert et al. 2005).

Segundo Steinberg *et al.* (2003), o teor de compostos fenólicos totais de sementes de cacau de diferentes genótipos variou de 6 a 21,5% do peso seco e desengordurado das sementes, sendo que aproximadamente 60% destes compostos fenólicos correspondem a procianidinas.

Catequinas e procianidinas, dois dos principais grupos de flavonóides, são compostos bioativos presentes em um variedade de alimentos entre vegetais e bebidas. Dados experimentais sugerem que eles podem prevenir doenças crônicas em seres humanos (Ursini; Sevanian, 2002). A (+)-catequina e (-)-epicatequina são as unidades básicas deste grupo (Fig.1). As procianidinas são formadas a partir da associação de várias destas unidades monoméricas e diferem na posição e configuração de suas ligações monoméricas. As estruturas dímeras de procianidina B1, B2, B3 e B4 e trímeras C1 e C2 são os mais conhecidos, conforme Figura 1 (Auger *et al.*, 2004).

Catequinas e procianidinas têm sido demonstradas como potentes inibidores da oxidação do LDL *in vitro*, mais do que α -tocoferol (Teissedre *et al.*, 1996).



NAME	STRUCTURE
Procyanidin B1	(-)-epicatechin-(4-8)-(+)-catechin
Procyanidin B2	(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin
Procyanidin B3	(+)-catechin-(4-8)-(+)-catechin
Procyanidin B4	(+)-catechin-(4-8)-(-)-epicatechin
Procyanidin C1	(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin
Procyanidin C2	(-)-epicatechin-(4-8)-(-)-epicatechin-(4-8)-(+)-catechin

Figura 1: Estrutura das catequinas e procianidinas (Auger et al., 2004)

Em um estudo de Hammerstone, Lázaro, e Schmitz (2000), o teor de procianidinas do vinho tinto, chocolate, suco de cranberry e quatro variedades de maçãs foi determinado. Em média, o chocolate e as maçãs continham maior teor de procianidinas por porção (164,7 e 147,1mg, respectivamente) em comparação com vinho tinto e suco de cranberry (22,0 e 31,9 mg, respectivamente).

Segundo Kenn (2001), alguns flavonóides, como a epicatequina, apresentam não só um efeito antioxidante direto, mas também são capazes de poupar outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Relata-se que pequenas concentrações como 1 μ M de epicatequina já são suficientes para que as vitaminas C e E sejam protegidas da oxidação.

No contexto da Saúde Cardiovascular os flavonoides do tipo flavan-3-ol e as procianidinas vêm apresentando resultados importantes como agentes cardioprotetores, com redução da agregação plaquetária e efeitos antioxidantes (Keen et al., 2005).

Segundo os resultados encontrados por Lee et al. (2003), em uma pesquisa comparando o potencial antioxidante dos flavonóides presentes no cacau, chá verde e vinho tinto, foi demonstrada uma maior capacidade antioxidante no cacau, 4 a 5 vezes superior aos resultados encontrados com o chá verde e, 2 a 3 vezes superior aos resultados encontrados com o vinho tinto.

Sanbongi et al. (2000), avaliou o efeito “in vitro” do extrato de cacau, e os resultados indicaram que não somente a catequina e a epicatequina mostraram efeito antioxidante, mas também a quercetina, quercetina 3-glicosídeo e a quercetina 3-arabinosídeo. Além disso, Mao et al. (2000) obteve resultados que mostraram que as procianidinas do cacau apresentaram boa estabilidade da atividade antioxidante “in vitro”, sendo altamente efetivas na prevenção da formação de dienos conjugados, tanto na fase de indução (atuando como antioxidante preventivo), como na fase de propagação (atuando como antioxidante de quebra de cadeias) da peroxidação de lipídios.

1.1.3 Fibrose Hepática

A fibrose é uma resposta cicatricial que ocorre em quase todos os pacientes com lesão hepática crônica (Friedman, 2008a). Embora a lesão aguda ative mecanismos de fibrogênese, os sinais associados com lesões crônicas causadas por infecções, drogas, desordens metabólicas, abuso de

álcool, hepatite não alcoólica ou ataque imune são necessários para a fibrose se acumular (Friedman, 2008a; Krizhanovsky et al., 2008).

Ocasionalmente, a fibrose hepática pode progredir lentamente como resultado de uma lesão causada por drogas, pelo vírus da hepatite C (HCV), ou co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Porém, na maioria dos casos, a fibrose hepática acumula-se durante décadas, proveniente de uma lesão crônica (Friedman, 2008b). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo inteiro, aproximadamente 170 milhões de pessoas estão infectadas com o HCV, com 3 a 4 milhões de pessoas sendo infectadas a cada ano, enquanto aproximadamente 400 milhões de pessoas são portadoras do vírus da hepatite B (Kerdilès et al., 2008).

A cirrose hepática é considerada um estágio avançado de fibrose e um dos maiores problemas de saúde mundial (Friedman, 2008a; Friedman, 2008b). Compreende na sua forma descompensada, complicações como hipertensão portal, ascite, encefalopatia e alterações no metabolismo, principalmente de lipídeos e glicose (Friedman, 2008b). O maior determinante da cirrose hepática é a dificuldade em degradar a matriz fibrótica, o que provoca progressiva destruição da arquitetura hepática com conseqüente disfunção do órgão (Friedman, 2008a; Saren et al., 2006).

As Células Estreladas Hepáticas (*Hepatic Stellate Cells* - HSC) são também chamadas de lipócitos, células armazenadoras de gordura, células armazenadoras de vitamina A, células intersticiais ou células de Ito (Saren et al., 2006; Senoo, 2004). Foram descobertas por Kuppfer em 1876 e

caracterizadas quase um século depois por Ito e Nemoto como células armazenadoras de gordura (Winau et al., 2008)

As HSCs estão localizadas no espaço perisinusoidal de Disse. Classicamente, este espaço define-se como uma zona limitada pelos hepatócitos e pela parede sinusoidal formada pelas células endoteliais sinusoidais (Friedman, 2008a; Friedman, 2008b; Senoo, 2004; Winau et al., 2008). O espaço perisinusoidal de Disse contém fibras nervosas e componentes da matriz extracelular (ECM) como fibras de colágeno dos tipos I e III e componentes da membrana basal. As HSC representam cerca de 15% do número total de células hepáticas considerando as parenquimatosas (hepatócitos), endoteliais (sinusoidais e vasculares), células de Kupffer (macrófagos hepáticos) e as células epiteliais da via biliar.

As HSC manifestam dois fenótipos distintos: miofibroblástico (quando estão ativadas) e lipocítico (quando estão quiescentes), como demonstrado na figura 2. Quando expressam o fenótipo miofibroblástico estão essencialmente envolvidas com a produção da ECM e controle da homeostasia do tecido conectivo hepático. O aumento do número e ativação dos miofibroblastos hepáticos está associado com fibrose e cirrose (Vincente et al., 1998).

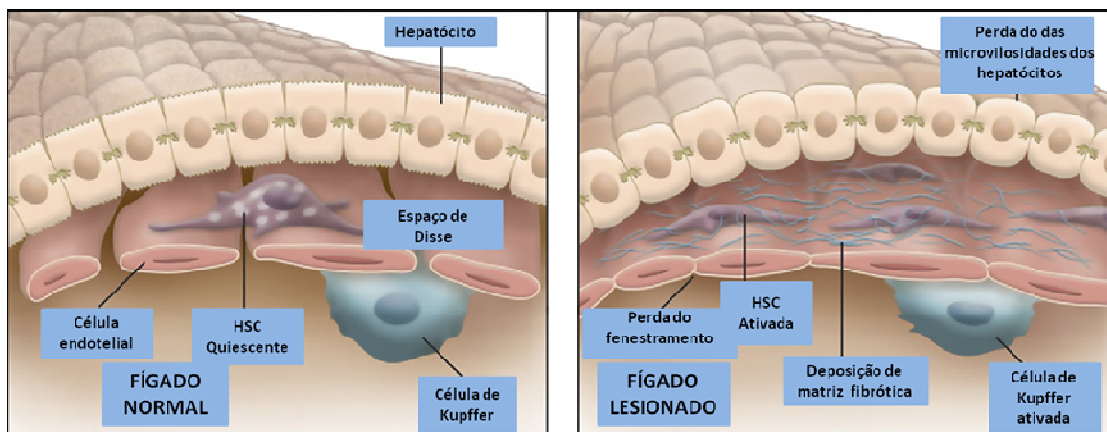


Figura 2: Papel das células residentes do fígado na lesão hepática. As mudanças no espaço perisinusoidal de Disse durante o desenvolvimento da fibrose em resposta a lesões no fígado incluem alterações, tanto no comportamento celular, quanto na composição da ECM. A ativação das HSC leva à deposição de matriz fibrótica e perda das microvilosidades dos hepatócitos precedendo a falência hepática. A ativação das células de Kupffer tem ação parácrina sobre as HSC. Adaptado de Iredale (2008).

Expressando o fenótipo lipocítico, seu citoplasma se caracteriza por conter gotículas de gordura onde ocorre armazenamento e metabolismo da vitamina A e retinóides (Senoo, 2004; Winau et al., 2008). Mais de 90% da vitamina A hepática (aproximadamente 80% do total do organismo) é captada, armazenada e metabolizada nas HSC, que podem ser identificadas pela autofluorescência desta vitamina (Vincente et al., 1998).

Em condições normais, as HSC cumprem várias funções no fígado. Entre elas, as mais importantes são: armazenamento da vitamina A, controle da comunicação intercelular através da síntese e liberação de mediadores e remodelamento da ECM.

O desenvolvimento de fibrose hepática é baseado na ativação das HSC que sofrem mudanças fenotípicas características. Essa ativação é um processo

patológico que se caracteriza pela perda das gotículas de gordura onde a vitamina A é armazenada, pelo aumento do número e tamanho da célula e pela diferenciação das HSC em células proliferativas, fibrogênicas, contráteis, muito similares aos miofibroblastos (Friedman, 2008a; Friedman, 2008b; Saren et al., 2006). A figura 3 resume o processo fibrótico.

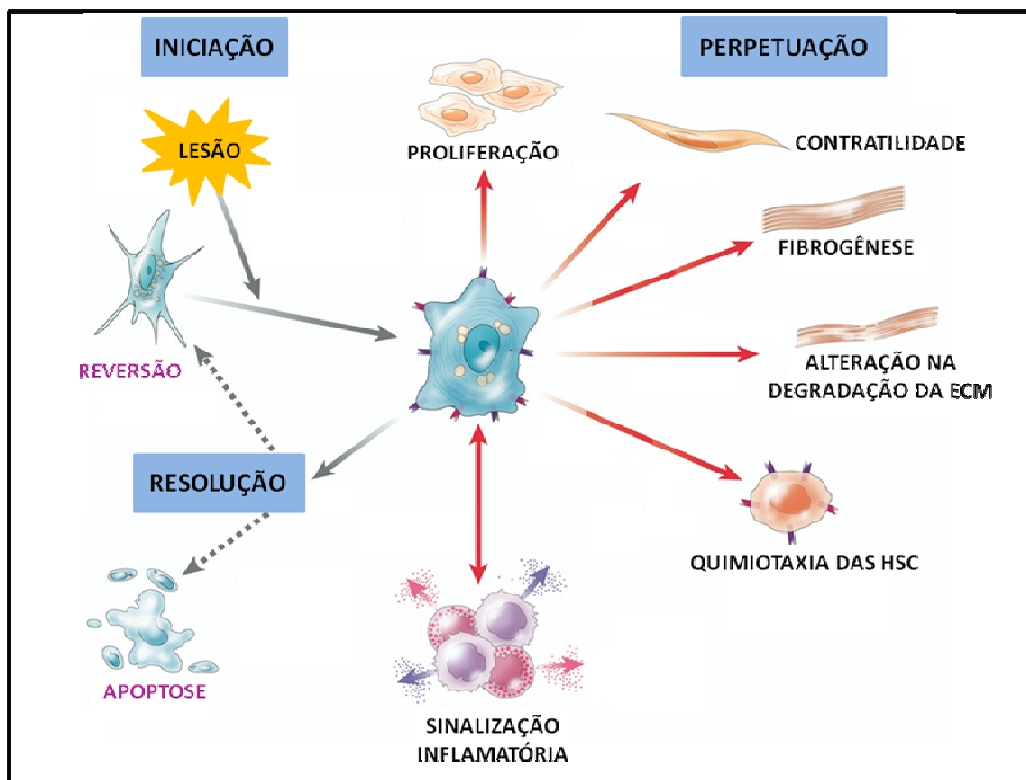


Figura 3: Vias de ativação das HSC. Características da ativação das HSC podem ser distinguidas entre aquelas que estimulam a iniciação e as que contribuem para a perpetuação. A iniciação é provocada por estímulos solúveis que incluem: estresse oxidativo (intermediários reativos de oxigênio), corpos apoptóticos, lipopolissacarídeos bacterianos e estímulos parácrinos de células vizinhas envolvendo macrófagos hepáticos (Células de Kupffer), células do endotélio sinusoidal e hepatócitos. Após, vem a perpetuação, caracterizada por um número de mudanças fenotípicas específicas incluindo proliferação, contratilidade, fibrogênese, degradação de ECM alterada, quimiotaxia e sinalização pró-inflamatória. A resolução da fibrose culmina ou com a reversão do fenótipo ou com a apoptose das células lesadas. Adaptado de Friedman, S. (2008b).

As células HSC são um alvo atrativo para o estudo de novos agentes antifibróticos, na tentativa de tratar a fibrose em seus diferentes estágios. A redução do processo inflamatório e resposta imune, a inibição da ativação das HSC, a indução da apoptose das HSC, a interrupção das atividades fibrogênicas, contráteis, proliferativas e pró-inflamatórias das HSC, a diminuição da síntese dos componentes da ECM ou o aumento de sua degradação são algumas das possíveis hipóteses para a interrupção do processo fibrótico (Friedman, 2008b).

1.1.4 Linhagem Celular GRX

A linhagem celular GRX é representativa de células HSC em camundongos e foi obtida por meio de uma reação fibrogranulomatosa hepática de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (Guimarães et al., 2006; Vincente et al., 1998). Sob condições padrão de cultivo, essas células expressam fenótipo de miofibroblastos, com aspectos bioquímicos e morfológicos de células do parênquima hepático, contendo proteínas do citoesqueleto como: vimentina, desmina, proteína glial fibrilar ácida e α -actina de músculo liso (α -SMA) e estão no estado transicional entre o lipócito quiescente e o estado ativado (miofibroblasto ativado) (Souza et al., 2008; Guimarães et al., 2006).

As células GRX podem expressar um fenótipo de miofibroblastos ativados em resposta ao tratamento “in vitro” com citocinas pró-fibrogênicas ou, expressar o fenótipo lipocítico quiescente se forem tratadas com retinol, ácido retinóico ou drogas que modifiquem o metabolismo lipídico, como a indometacina (anti-inflamatório não esteroideal não seletivo) (Souza et al., 2008; Rang et al., 2002). No estado quiescente, ocorrem mudanças fenotípicas

evidentes; a reorganização do citoesqueleto de actina provoca diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos. Também ocorre acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma, além de mudanças como diminuição da atividade secretora de colágeno (Guimarães et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que esta linhagem se comporta muito similarmente às HSC no que diz respeito à captação, armazenamento e liberação de retinoides. Sendo assim, a linhagem celular GRX é considerada um modelo “in vitro” das HSC. A figura 4 exemplifica os estágios de desenvolvimento das células da linhagem GRX.



Figura 4: Ativação das células GRX e modulação de seu fenótipo. As células GRX são representativas das HSC; sob cultura expressam o fenótipo de miofibroblasto transicional. Elas podem ser induzidas *in vitro* para expressar o fenótipo de lipócito quiescente ou podem expressar um fenótipo de miofibroblasto ativado em resposta a citocinas pró-fibrogênicas. A manifestação do fenótipo de miofibroblasto ativado está associada à reorganização do citoesqueleto, aumento na produção de colágeno e aumento do estresse oxidativo. Adaptado de Guimarães et al. (2006).

1. 2 JUSTIFICATIVA

As doenças crônicas, como as hepatopatias, vêm acometendo um número cada vez maior de indivíduos no mundo, tornando-se um problema de saúde pública em decorrência do elevado número de internações e invalidez em indivíduos jovens. Neste contexto, as pesquisas envolvendo novas substâncias capazes de combater, prevenir ou mesmo amenizar essas doenças estão cada vez mais em evidência. Sendo assim, a investigação a respeito de substâncias presentes em alimentos altamente consumidos pela população mundial, como o cacau, adquire uma importância indiscutível. Por esse motivo, surgiu o interesse na realização do presente trabalho, que estuda a atividade antifibrogênica da (+)-catequina, polifenol majoritário nas sementes de cacau.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Avaliar o efeito antiproliferativo da catequina em células GRX;

1.3.2 Avaliar a reversão fenotípica das células GRX tratadas com catequina;

1.3.3 Estudar os mecanismos envolvidos nestes desfechos.

CAPÍTULO II

“Antiproliferative effect of catechin in GRX cells”

Artigo aceito para Publicação na revista “Biochemistry and cell biology”

Fator de Impacto 2,992

Antiproliferative effect of catechin in GRX cells

Cristina Machado Bragança de Moraes¹, Denizar Alberto da Silva Melo¹, Roberto Christ Vianna Santos¹, Shanna Bitencourt,¹; Fernanda Cristina Mesquita; Fernanda dos Santos de Oliveira¹, Edgardo Rodriguez-Carballo², Ramon Bartrons², Jose Luis Rosa², Francesc Pujol Ventura² and Jarbas Rodrigues de Oliveira^{1,3}.

¹ Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain.

³ To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, CEP: 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: jarbas@puhrs.br

ABSTRACT

The phenolic compounds present in cocoa seeds have been studied regarding the health benefits, such as antioxidant and anti-inflammatory activities. Fibrosis is a wound healing response that occurs in all patients with chronic liver injury. A large number of cytokines and soluble intercellular mediators are related to changes in behavior and phenotype of the *Hepatic Stellate Cell* (HSC) that develop a fibrogenic and contractile phenotype leading to the development of fibrosis. The objective of this study was to assess the catechin effect in GRX liver cells in activities such as cell growth and inflammation. The GRX cells treatment with catechin induced a significant decrease in the cell growth. This mechanism does not occur by apoptosis or even by autophagy because there was no increased expression of caspase 3 and PARP (apoptosis), or LC3 (autophagy). The expression of p27 and p53 proteins, regulators of the cell cycle, showed increased expression, while COX-2 and IL-6 mRNA showed a significant expression decrease. This study shows that catechin decreases cell growth in GRX cells and, probably, such decrease does not occur by apoptosis or autophagy but through an anti-inflammatory effect and cell cycle arrest. Catechin, also, significantly decreased the production of TGF β by GRX cells, showing a significant antifibrotic effect.

Key words: GRX cells, catechin, fibrosis, inflammation

INTRODUCTION

Fibrosis is a wound healing response that occurs in all patients with chronic liver injury (Friedman, 2008a). Although the mechanisms of acute injury activate fibrogenesis, the signs associated with chronic lesions caused by infections, drugs, metabolic disorders, alcohol abuse, non-alcoholic hepatitis, or immune attack are necessary to accumulate fibrosis (Friedman, 2008a; Krizhanousky, 2008; Iredale, 2008; Saren et al. 2006)

Hepatic Stellate Cell (HSC) activation is the main step that leads to hepatic fibrosis. This activation involves changes like fibrogenesis, proliferation, contractility, chemotaxis, matrix degradation and cytokine release. These cytokines include profibrotic transforming growth factor (TGF- β), a central mediator of fibrotic response. Fibrosis is potentially a reversible process in early stages (Friedman 2008b).

The GRX cell line is representative of HSC in mice (Guimaraes et al. 2006; Vincent et al. 1998). Souza et al. 2008). They might express the phenotype of activated myofibroblasts in response to *in vitro* treatment with pro-fibrogenic or express quiescent lipocytes if treated with retinol, retinoic acid or drugs that modify lipid metabolism such as indomethacin (nonsteroidal non-selective anti-inflammatory) (Souza et al. 2008). In the quiescent state, there are phenotypic changes, the reorganization of the actin cytoskeleton, an accumulation of fat droplets in the cytoplasm, and changes such as reduction of secretory activity of collagen (Guimarães et al. 2006). Thus, the GRX cell line is considered a model *in vitro* of HSC.

The phenolic compounds present in cocoa seeds, being 60% of these phenolic compounds correspondent to catechin, have been studied regarding the health benefits, such as high antioxidant activity (Zeeb et al. 2000; Bharrhan et al. 2011; Salah et al., 1995, Steinberg et al, 2003; Wan et al., 2001) and the reduction in plasma concentration of low density lipoproteins (LDL). Studies have proved that the cocoa procyanidins are capable of reducing platelet activation, helping maintaining cardiovascular health and modulating the immune system (Steinberg et al, 2003; Wan et al., 2001; Ursini, Sevanian, 2002; Auger et al., 2004).

Therefore, the objective of this study was to assess the catechin effect in GRX liver cells on cell growth.

MATERIALS AND METHODS:

Materials:

The cocoa seeds (*Theobroma Cacao L.*) of the variety Forastero were from CEPLAC / CEPEC (the Executive Plan of Cocoa Farming and the Cocoa Research Center) located in Ilhéus/BA – Brazil. Catechin was purchased from Sigma®.

Cocoa extract:

The cocoa seeds (*Theobroma Cacao L.*) were first crushed and degreased in a Soxhlet apparatus using cyclohexane as a solvent, they were then submitted to the extraction apparatus for the extraction of phenolic compounds, using as solvent 70% methanol (MeOH). The extracts were dried in a rotary evaporator.

Cell culture

GRX cells were obtained from a Cell Bank at the Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The cells were maintained in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Invitrogen) supplemented with 5% FCS (fetal calf serum), 1% penicillin/streptomycin, pH 7.4, kept in a humidified incubator with 5% CO₂ and 37°C.

Cell growth

MTT assay:

In order to assess cell growth and/or cell number, GRX cells were treated with Cocoa at the concentrations of 0.06 and 0.125 mg/ml and Catechin at the concentrations of 0.01 mg/ml and 0.02 mg/ml in an incubation time of six days. Indomethacin (0.13 mM) has been used as a control of inhibition of cell growth.

The cell viability was assessed by testing the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) in 96-well plate. Briefly, a MTT stock solution was

prepared at a concentration of 5.0mg/ ml. In the experiment was diluted 1:10, so the final concentration in the well was 0.5 mg/ml. Subsequently, the plate was incubated at 37°C humidified incubator with 5% CO₂ for 4 hours. It was then removed and discarded the supernatant and added isopropanol to dissolve the blue crystals formed by MTT. After 5 minutes, the plates were placed for reading in a Hyperion MicroReader, using a wavelength of 540nm with reference at 650nm. All experiments were performed in triplicate.

Cell count

Cell growth was also evaluated by counting GRX cells treated with catechin at concentrations 0.01 mg/ml and 0.02 mg/ml in an inverted microscope (400x magnification) in the incubation times of 0, 24, 48, and 72 hours.

Cell death by release of lactate dehydrogenase

In order to evaluate the cytotoxicity of catechins in GRX cells, we used the determination of lactate dehydrogenase (LDH) in supernatants of cultures, with the control group. The LDH activity was measured by colorimetric assay (Spiller et al., 2007). For the control of cell lysis a 5% Tween was used.

Protein Analysis

For the assessment of apoptosis and autophagy, cells were plated on plates of 100x20mm. Treated with catechin at concentrations of 0.01 mg/ml and 0.02 mg/ml and incubated for 72 hours. Apoptosis and autophagy were evaluated by protein expression of Caspase 3 and PARP for apoptosis and LC3 for autophagy, respectively. Others proteins like p27, pp38, p53 (regulators of the cell cycle), pS6k (proliferative protein and protein synthesis), pAkt thr 308 (PI3K/AKT/mTor pathway) and pERK1 (MAPK pathway) were performed to elucidate the catechin mechanism. The phosphorylation of these proteins was evaluated by Western Blot Method.

Western Blot Analysis

Cells were washed twice in cold PBS and lysed with 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Igepal, 10% glycerol supplemented with protease and

phosphatase inhibitors. Protein extracts were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membrane (Millipore), and subjected to Western blot using the above indicated antibodies at 1:1000 dilution. Immunocomplexes were visualized with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (1:10.000) followed by incubation with ECL Western blot reagent (GE Healthcare).

For the development of proteins, a Kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (General Electric Healthcare) following the instructions of the product and exposing the membrane to **Medical X-Ray Film (Kodak)**.

The quantification of the bands *Western Blot* was made using software *ImageJ* 1.41.

Antibodies

Primary antibodies used were caspase 3 (PharMingen), PARP (Santa Cruz), LC3 (T. Yashimori); p27 (PharMingen); p38 (Cell Signaling), p53 (Labvision) pS6k (Cell Signaling); pAkt thy 308 (Labvision); ERK1 (Cell Signaling); α -Tubulin (Sigma) and secondary antibodies α -Mouse IgG (GE Healthcare) and α -Rabbit IgG (GE Healthcare). All antibodies were used at a dilution 1:1000.

TGF- β quantitation:

Transforming growth factor (TGF- β) (R&D Systems, USA) was measured in GRX cells-conditioned medium using commercially available ELISA kit. Optical density was measured using an ELISA plate reader at a wavelength of 450nm. TGF- β levels were expressed as picograms per milliliter.

Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity of catechin was assessed in GRX cells using catechin at concentrations 0.01 mg/ml and 0.02 mg/ml incubated for 24 hours through the mRNA quantification of IL-6 and COX-2 by the method Real Time-PCR (RT-PCR).

RT-qPCR analysis

Total RNA was isolated from GRX cells using the Ultraspec RNA Isolation System (Biotecx). Then 5 mg of total RNA was reverse transcribed using a high-capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) and random primers. Quantitative PCRs were carried out using an ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System and a Taqman 5'-nuclease probe method or using customized TLDA arrays (Applied Biosystems). All transcripts were normalized to Gapdh.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey (post-test) at a significance level of $p < 0.05$. The statistical program used was SPSS 15.0.

RESULTS

To study the effect of cocoa on the GRX cell number or growth was used concentrations of 0.06 and 0.125 mg/ml for 6 days of incubation and it was possible to see that cocoa extract presented a decrease of cells number when compared to the control group ($p < 0.001$), as shown in Fig.1A.

By treating GRX cells with catechin at concentrations of 0.01 mg/ml and 0.02 mg/ml for 6 days of incubation, it was observed a significant decrease in cell number at all concentrations of catechin when compared to the control group, according to fig.1B ($p < 0.001$).

In order to confirm the results of the MTT assay, GRX cells were incubated for 0, 24, 48, and 72 hours with catechin at concentrations of 0.01 mg/ml and 0.02 mg/ml and then were counted under an inverted microscope. Catechin significantly decreased the cell number at all concentrations evaluated at the time of 72 hours as shown in Figure 1C.

Searching for possible mechanisms for the reduction in cell number, the expression of proteins involved in processes of programmed cell death, apoptosis (caspase 3 and PARP), and autophagy (LC3) were assessed by

Western blot. There is no fragmentation of caspase 3 (appears only one 32 kDa band), or PARP (do not show 24 and 89 kDa fragments), therefore both are inactivated. There was no increased expression of LC3 in cells treated with catechin in the assessed times (Fig. 2A, B, C, D and E). To assess the possible death by necrosis, it was also evaluated the LDH release by cells treated with catechin and there was no difference between the control group and treated groups Fig.2.E.

To evaluate a possible action of catechin on the cell cycle, the expression of p27 and p53 proteins, regulators of the cell cycle, were also assessed by Western blot (Fig.3), which showed increased expression at 24 hours ($p < 0.05$).

Stellate cells, when activated, increase the synthesis of pro-inflammatory mediators. Due to the close relationship between pro-inflammatory mediators, cell proliferation and liver fibrosis, one of the mechanisms assessed was the expression of COX-2 mRNA by RT-PCR, which showed a significant decrease in its expression after treatment with catechin at doses tested ($p < 0.001$), although, when comparing the concentrations tested, 0.01 mg/mL showed a greater capacity to inhibit COX-2 mRNA when compared to 0.02 mg/mL Fig.4A ($p < 0.05$). In addition to this result, IL-6 has been assessed, presenting decreased mRNA expression in cells treated with catechin ($P < 0.001$) (fig.4B). Comparing the tested concentrations, at 0.01 mg/mL it was more effective in reducing the expression of IL-6 in these cells ($p < 0.05$).

The signaling pathways Mitogen-activated protein kinases (MAPK) and PI3K/AKT/mTor are closely related with survival in human cancer cells. It is now well established that MAPK and PI3K/AKT/mTor are two of the most predominant oncogenic routes, and they are intimately linked together. Therefore, We evaluated expression of proteins that could explain the antiproliferative effect of catechin on GRX cells in time course of 0, 2, 6, 12, 24, and 48 hours: pS6K (protein synthesis), pErK1 (MAPK pathway and inflammatory protein), pP38 (MAPK pathway and antiproliferative protein) and pAkt thr 308 (PI3K/AKT/mTor pathway). In this experiment we used catechin at the concentration of 0.02 mg/mL. There was no significant difference between the time assessed in the expression of proteins pP38, pErK1 and pAkt thr 308,

although pS6K protein showed increased expression in 48 hours of incubation ($p < 0.05$) according Fig.5.

Also evaluated the production of TGF β by GRX cells. This result showed a significant decrease in TGF β concentration after treatment with catechin at doses tested ($p < 0.001$), according Fig. 6.

DISCUSSION

Several evidences have shown benefits of phenolic compounds present in foods such as cocoa, in the treatment of cancer, neurodegenerative diseases, atherosclerosis, among others. Catechin is one of the main phenolic compounds in cocoa seeds, raw material of the chocolate, one of the most popular foods in the world. However, the physiological mechanisms have to be better clarified.

In this study, there was an investigation of the activity of catechin on the growth of GRX cells. The aim was to deepen the research in order to clarify the mechanisms by which catechin may influence the parameters of cell proliferation and inflammation.

The GRX line represents an interesting and efficient study tool (Guimaraes et al. 2006; Guma et al., 2001), which, when maintained under standard conditions of culture, it presents a myofibroblastic phenotype, similar to the activated HSCs. HSCs when activated express myofibroblastic phenotype and when in quiescent state they present lipocyte phenotype. When expressing the myofibroblastic phenotype, they are primarily involved with the production of components of the extracellular matrix (ECM) and control of liver connective tissue homeostasis. The increase in the cell number and activation of myofibroblasts is associated with liver fibrosis (Vicente et al., 1998).

In the present study, cocoa extract and catechin decreased the cell number of GRX cells in concentrations tested. In this sense, we sought to investigate the possible cellular mechanisms involved in this effect.

Friedman (2008b), states that the reduction of cell growth in the cells depends on reducing the inflammatory process, the immune response, the inhibition of

cell activation, induction apoptosis and/or autophagy. Caspases are a series of proteases activated upon cleavage at aspartate residues during earliest stages of apoptosis. Active caspases can then cleave the enzyme Poly-ADP ribose polymerase (PARP). PARPs are DNA repair enzymes that are activated by DNA strand breaks. Cleavage of PARP by caspase 3 into 24 and 89 kDa fragments inactivates the PARP enzyme. In our study, we showed that catechin, major phenolic compounds of cocoa, decreases the cell number and after the assessment of the activation of Caspase 3, PARP (the breakdown of Caspase 3 and PARP did not happen), and protein expression of LC3, that the mechanism does not occur by apoptosis or even by autophagy, as well as it does not happen due to cell damage, because in cells treated with catechin, it was not observed increased LDH release when compared to the control group. Therefore, these results show that the decrease in the cell number was caused by decreased cell proliferation.

Searching for mechanisms that would justify a reduction of cell growth, the expression of protein p53 was assessed. The p53 protein suppresses cell growth not only by inducing apoptosis, but also by causing cell cycle arrest. This phenomenon occurs through the cell cycle arrest that must happen for the repair of this damage. If such arrest is not possible, the cell goes through apoptosis. Under severe stress, p53 increases reactive oxygen species (ROS) production and cell death, whereas, low levels of p53 induce a decrease in intracellular ROS level. Indeed, basal p53 has an antioxidant function. For example, p53 induces upregulation of glutathione peroxidase. In this study, an increase of p53 was observed, consequently, can provoke cell cycle arrest. We also evaluated the expression of p27, another inhibitor of the cell cycle. According to Lu et al. (2005), the cell cycle is controlled by cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs). The p27 protein is an inhibitor of CDKs, therefore, involved in cell cycle arrest. An increased expression of this protein was observed, showing for the first time that the catechin can decrease cell growth by decreasing the cell cycle by significantly increasing the expression of p53 and p27.

The GRX cell proliferation is also related to the inflammatory process. In this sense, we investigated the expression of IL-6 mRNA, which according to Huang

and Zhang (2003) is a proinflammatory cytokine involved in cell proliferation and the synthesis of extracellular matrix. In our study, this interleukin had its expression reduced, which suggest to be related to decreased proliferation of these cells, since pro-inflammatory phenotype of stellate cells is closely related to the development of fibrosis. According to Thirunavukkarasu et al. (2006) the activated HSC secrete IL-6, a key cytokine in the acute phase response in the context of liver inflammation. The COX-2 is a enzyme that catalyzes the first step of the synthesis of prostanoids, related to the pathogenesis of inflammatory route, being induced in most tissues by inflammatory cytokines and growth factors in response to inflammation or tissue damage. In our study, there was reduced expression of COX-2 mRNA. In the GRX cells, the fibrotic form needs a constant inflammatory state (Ciconetti et al., 2004), in this sense, it is possible to infer that the catechin reduced the pro-inflammatory phenotype of GRX by decreasing the expression of COX-2.

The studies of Guo et al. (2002) and Tamura et al. (2003) describe in their research that there is a direct connection between the signaling ERK1/2 with the induction of COX-2 gene in human endometrial stromal cells and intestinal epithelial cells, demonstrating that signaling ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) is an important pathway in the regulation of COX-2. The over expression of COX-2 is described in several cell lines when in intense inflammation, especially in cancer cells. Some studies have shown that the inhibition of COX-2 may be an important therapeutic target for controlling tumor growth and development of metastases (Kurland et al. 2007; Tamura et al. 2003). The ERK 1/2, also known as a classical MAPK, play fundamental role en survival, proliferation and apoptosis In addition, the ERK 1/2 signaling pathway is preferentially activated (phosphorylated) in response to growth factors and phorbol ester and regulates cell proliferation and cell differentiation. Nevertheless, our results show no significant decrease in the expression of pERK1, so ERK1 is not involved in a process.

It is important to highlight that P38 (MAPK pathway) did not present increased in its phosphorylation, although this protein, when phosphorylated, is antiproliferative. It is therefore suggested that this is due to the high antioxidant activity of catechin reported in several studies. Gelain et al. (2011) report that

pP38 is activated by oxidizing agents, which were inhibited by catechins, preventing the increased phosphorylation of this protein.

AKT signaling pathways are closely related with survival in human cancer cells. PI3K/AKT/mTor signaling pathway is probably the best-characterized and most prominent pathway with regard to the anti-apoptotic signals in cell survival (Shah et al. 2000). Akt is downstream of phosphoinositide 3-kinase and is activated by phosphorylation in response to insulin, insulin-like growth factor (IGF) or various cytokines that mediate the pro-growth effects of these signals. Akt activity drives many anabolic pathways including protein synthesis by activating initiation and elongation factors of the translational machinery (Shah et al. 2000). Akt is also known to oppose apoptosis by phosphorylating and inactivating several pro-apoptotic factors such as GSK3 β , BAD, Fork-head family members, and pro-caspase-9 (Seol 2008). Nevertheless, our results show no alterations in the expression of pAkt thr 308, so is not involved in a process.

TGF- β is the dominant stimulus to ECM production by stellate cells. A role for TGF- β in perpetuating rather than initiating stellate cell activation has been established by examining the behavior of stellate cells in TGF- β knockout mice with acute liver injury. These animals have markedly reduced collagen accumulation in response to liver injury as expected. TGF- β is increased in experimental and human hepatic fibrosis. There are many sources of this cytokine, however autocrine expression is most important. Transcriptional up-regulation of the TGF- β gene has been demonstrated in culture-activated stellate cells. In our experiments, catechin significantly decreased the production of TGF β by GRX cells, showing a significant antifibrotic effect.

CONCLUSIONS

This study shows the antiproliferative activity of Cocoa extract and catechin. It was shown that Catechin decreases cell growth in GRX cells and, probably, such decrease does not occur by apoptosis or autophagy but through anti-

inflammatory effect and cell cycle arrest. The catechin significantly reduced the synthesis of TGF β by GRX cells, showing a potential for future research.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from CAPES/DGU (BEX 4426/10-0), Brazil, IDIBELL (Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge) and Secretaria de Estado de Universidades, Ministerio de Ciencia e Innovación (PHB2008-0080-PC)-Spain.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

Auger, C., Al-Awwadi, N., Bornet, A., Rouanet, J., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P., 2004. Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food res. int.* 37, 233–245

Bharrhan, S., Koul, A., Chopra, K., Rishi, P., 2011. Catechin Suppresses an Array of Signalling Molecules and Modulates Alcohol-Induced Endotoxin Mediated Liver Injury in a Rat Model. *PLoS ONE*. 6, e20635. DOI:10.1371

Cicconetti, A., Bartoli, A., Ripari, F., Ripari, A., 2004. COX-2 selective inhibitors: a literature review of analgesic efficacy and safety in oral-maxillofacial surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 97, 139-46.

Friedman, S.L., 2008a. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology*. 254, 120-129.

Friedman, S.L., 2008b Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*. 134, 1655-1669.

Gelain, D.P., Pasquali, M.A.B., Caregnato, F.F., Moreira, J.C.F., 2011. Vitamin A (retinol) upregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through p38 and Akt oxidant dependent activation. *Toxicology*. DOI:10.1016.

Guimarães, E.L., Franceschi, M.F., Grivicich, I., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Margis, R., Guma, F.C., 2006. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int.* 26, 477–485.

Guma, F.C.R., Mello, T.G., Mermelstein, C.S., Fortuna, V.A., Wofchuk, S.T., Gottfried, C., Guaragna, R.M., Costa, M.L., Borojevic, R., 2001. Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. *Biochem Cell Biol.* 79, 409–417.

Guo, Y.S., Cheng, J.Z., Jin, G.F., Gutkind, J.S., Hellmich, M.R., Townsend, C. M.J., 2002. Gastrin Stimulates Cyclooxygenase-2 Expression in Intestinal

Epithelial Cells through Multiple Signaling Pathways. *Biol. chem.* 277, 48755–48763.

Huang, Y., Zhang, Q., 2003. Coal-induced interleukin-6 gene expression is mediated through ERKs and p38 MAPK pathways. *Toxicol. appl. pharmacol.* 191, 40–47.

Iredale, J., 2008. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: Exploiting the biology of inflammation and repair. *Pharmacol. res.* 58, 129-136.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., Lowe, S.W., 2008. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell.* 134, 657-667.

Kurland, J.E., Beck, S.E., Solomon, C.J., Brann, O.S. Carethers, J.M., Huang, S.C., 2007. Cyclooxygenase-2 Expression in Polyps From a Patient With Juvenile Polyposis Syndrome With Mutant BMPR1A. *J. pediatr. gastroenterol. nutr.* 44, 318–325.

Lu, X., Jung, J., Cho, H.J., Lim, D.Y., Lee, H.S., Chun, H.S., Kwon, D.Y., Park, J.H.Y., 2005. Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* 135, 2884-2890.

Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C., 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 322, 339–346.

Saren, M., Znaidak, R., Macías, M., Rey, R., 2006. Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterol. hepatol.* 29, 93-101.

Seol, D. W. Up-regulation of IAPs by PI-3K: a cell survival signal-mediated anti-apoptotic mechanism. 2008. *Biochem Biophys Res Commun*; 377(2):508–511.

Shah, O. J., Kimball, S. R., Jefferson, L. S. 2000. Among translational effectors, 70S6k is uniquely sensitive to inhibition by gluco-corticoids. *Biochem J*;347:389–397.

Souza, I.C., Martins, L.A., Coelho, B.P., Grivicich, I., Guaragna, R.M., Gottfried, C., Borojevic, R., Guma, F.C., 2008. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Mol. cell. biochem.* 315, 1-7.

Steinberg, F.M., Bearden, M.M., Keen, C.L., 2003. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc.* 103, 215-223.

Tamura, M., Sebastian, S., Yang, S., Gurates, B., Fang, Z., Okamura, K., Bulun, S.E., 2003. Induction of cyclooxygenase-2 in human endometrial stromal cells by malignant endometrial epithelial cells: evidence for the involvement of extracellularly regulated kinases and CCAAT/enhancer binding proteins. *J. mol. endocrinol.* 31, 95-104.

Thirunavukkarasu, C., Watkins, S.C., Gandhi, C.R., 2006. Mechanisms of endotoxin induced NO, IL-6, and TNF-alpha production in activated rat hepatic stellate cells: role of p38 MAPK. *Hepatology*. 44, 389-398.

Thomas, G., Hall, M.N. 1997. TOR signaling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol.*;9:782-787.

Ursini, F., Sevanian, A., 2002. Wine polyphenols and optimal nutrition. *Ann. N. Y. Acad. sci.* 957, 200–209.

Vicente, C.P., Fortuna, V.A., Margis, R., Trugo, L.C., Borojevic, R., 1998. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem.* 187,11–21.

Wan, Y., Vinson, J.A., Etherton, T.D., Proch, J.; Lazarus, S.A., Kris-Etherton, P.M., 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am. j. clin. nutr.* 74, 596-602.

Zeeb, D.J., Nelson, B.C., Albert, K., Dalluge, J.J., 2000. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Chem.* 72, 5020–5026.

LEGENDS

Fig. 1. A: Test of cell growth in line GRX by the method of MTT reduction after 6 days of incubation with extract cocoa at concentrations 0.06 and 0.125 mg/mL, indomethacin (0.13 mM) and control group. ^aExtract Cocoa 0.125 mg/mL; Extract Cocoa 0.06 mg/mL and indomethacin < control (P<0.001); ^bExtract Cocoa 0.125 mg/mL and indomethacin < Extract Cocoa 0.06 mg/mL (P<0.001); **B:** Test of cell growth in line GRX by the method of MTT reduction after 6 days of incubation with catechin at concentrations 0.01 and 0.02, indomethacin (0.13mM) and the control group. ^aCatechin 0.02 mg/mL; Catechin 0.01 mg/mL and indomethacin < control (P<0.001); ^bIndomethacin < Catechin 0.02 mg/mL (P <0.05); **C:** Count of GRX cells by light microscopy after treatment with catechin at concentrations 0.01 and 0.02 mg/mL and incubation times of 0, 24, 48, and 72 hours. ^aCatechin 0.01 mg/mL and 0.02 mg/mL < control (P<0.05).

Fig 2. A: Expression of the protein PARP, Caspase 3 and LC3 in GRX cells treated with catechin at concentrations 0.01 and 0.02 mg/mL in 72 h of incubation by *Western blot*. The Tubulin was used as a normalizer of protein expression. **B:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein PARP in GRX cells treated with catechin 0.01 and 0.02 mg/mL (p>0.05). **C:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein Caspase 3 in GRX cells treated with catechin 0.01 and 0.02 mg/mL (p>0.05). **D:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein LC3 in GRX cells treated with catechin 0.01 and 0.02 mg/mL (p>0.05). **E:** % Survival by the release of lactate dehydrogenase (LDH) by GRX cells treated with catechin at concentrations 0.01 and 0.02 mg/mL 6 days of incubation and the control group (p>0.05).

Fig. 3 A: Time course (0, 2, 6, 12, 24, and 48h) of the expression of proteins p27 and p53 in GRX cells treated with catechin at a concentration of 0.02 mg/mL for *Western blot*. The tubulin was used as to normalize the protein expression. **B:** Protein levels (fold induction) of the expression of proteins p27 and p53 proteins by *western blot*. *24h > 0h (P<0.05).

Fig. 4 A: Expression of COX-2 protein by RT-PCR in GRX cells treated with catechin at concentrations 0.01 and 0.02 mg/mL in 24h of incubation. ^aCatechin 0.01 mg/mL, and Catechin 0.02 mg/mL < control (P<0.001); ^bCatechin 0.02 mg/mL > Catechin 0.01 mg/mL (P<0.05); **B:** Expression of IL-6 protein by RT-PCR in GRX cells treated with catechin at concentrations 0.01 and 0.02 mg/mL in 24 hours of incubation. ^aCatechin 0.01 mg/ml and Catechin 0.02 mg/mL < control (P<0.001); ^bCatechin 0.02 mg/mL > Catechin 0.01 mg/mL (P<0.004). The mRNAs indicated were measured by RT-qPCR, normalized to Gapdh, and plotted as relative expression to untreated cells±SEM of three independent experiments.

Fig.5 A: Time course (0, 2, 6, 12, 24, and 48 h) of the expression of proteins pS6k, pERK1, pP38 and pAkt-thr308 in GRX cells treated with catechin at a concentration of 0.02 mg/mL for *Western blot*. The Tubulin was used as a normalizer of protein expression. **B:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein pS6k in GRX cells treated with catechin 0.02 mg/mL *48hs > 0h (p<0.05). **C:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein ERK1 in GRX cells treated with catechin 0.02 mg/mL (p>0.05). **D:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein pP38 in GRX cells treated with catechin 0.02 mg/mL (p>0.05). **E:** Protein levels (fold induction) of the expression of protein pAkt-thr308 in GRX cells treated with catechin 0.02 mg/mL (p>0.05).

Fig.6: TGF-β concentration in the supernatant of GRX cells culture treated with catechin 0.01 and 0.02 mg/mL in 24h of incubation. ^a Catechin 0.01 mg/mL and Catechin 0.02 mg/mL < control (p<0.001).

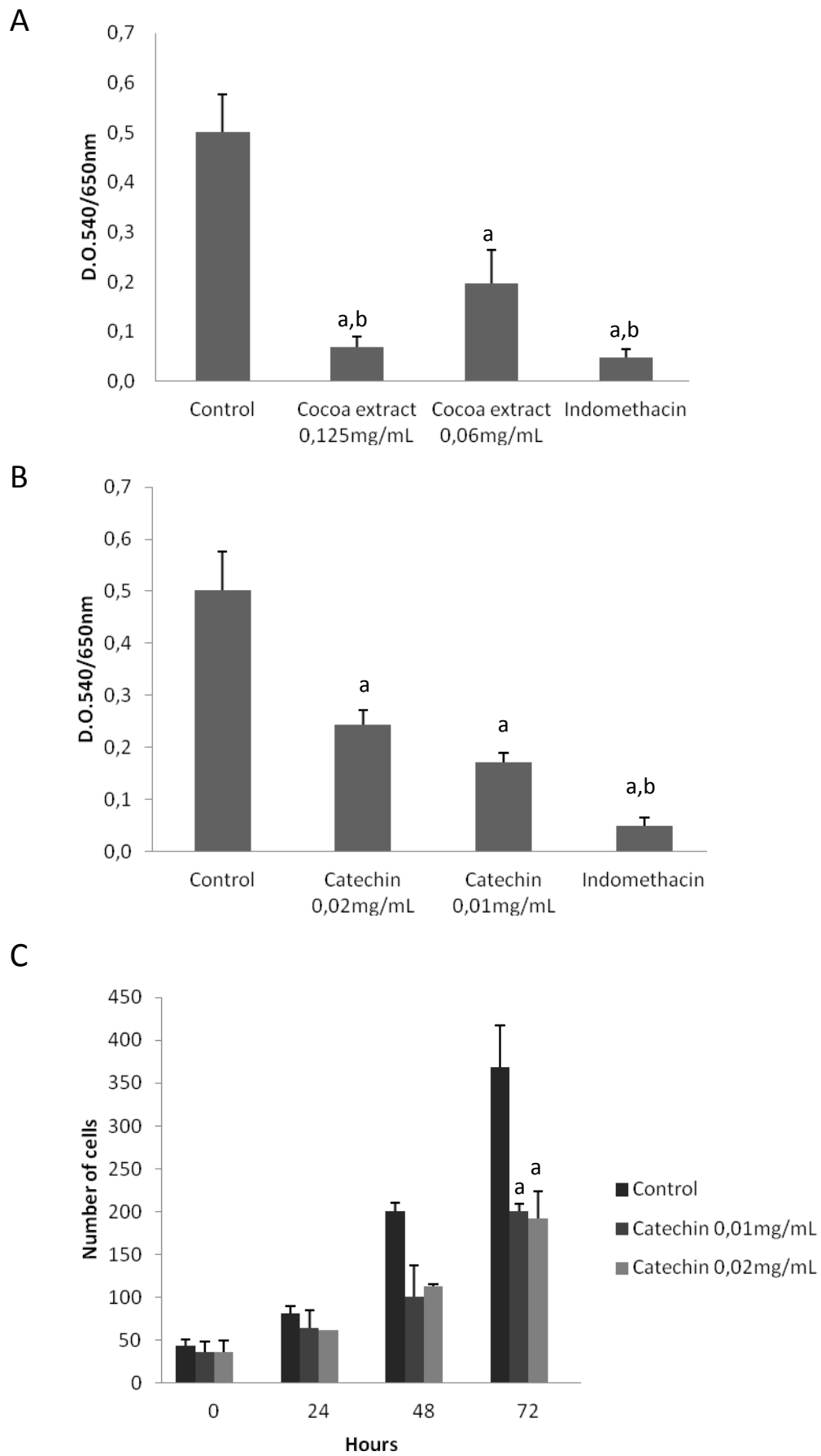
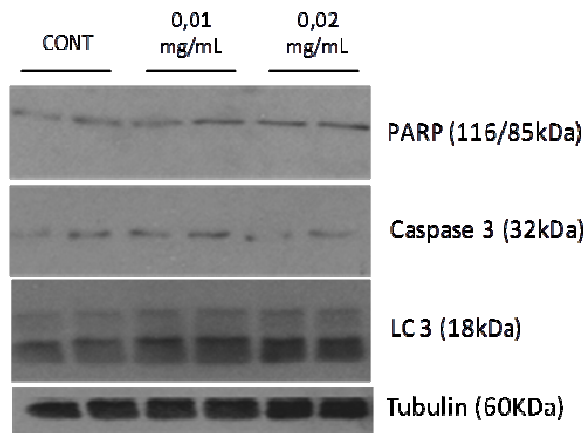
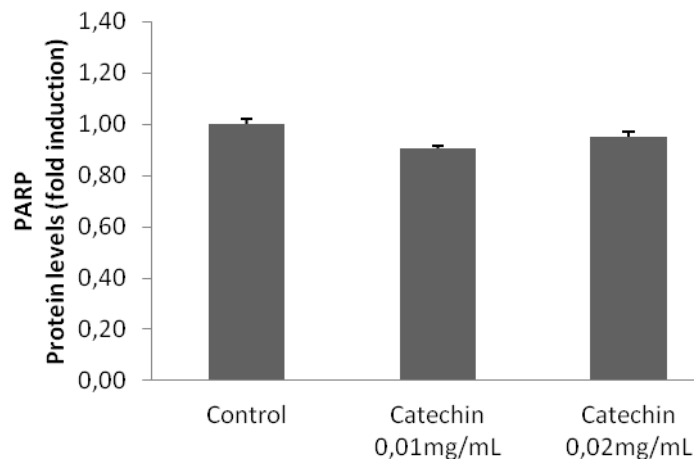


Fig 1

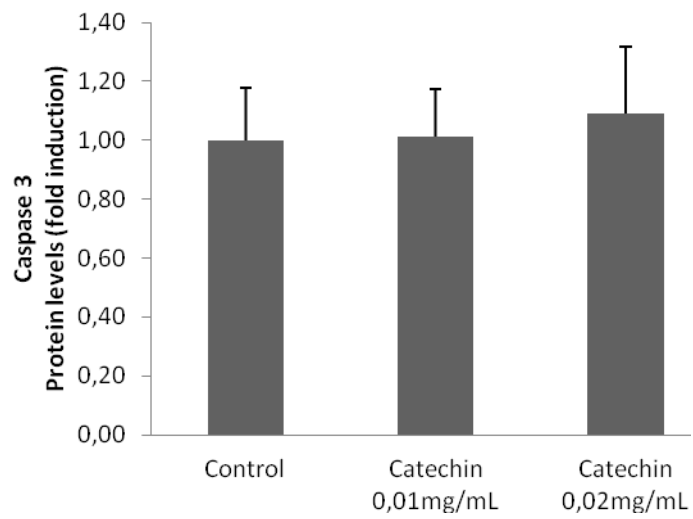
A



B



C



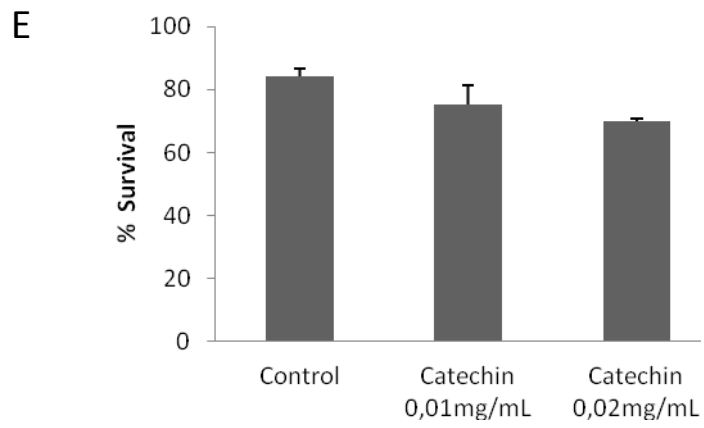
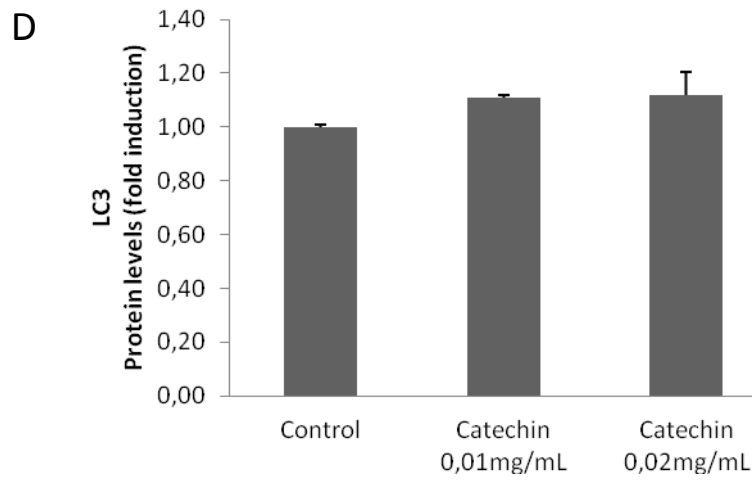
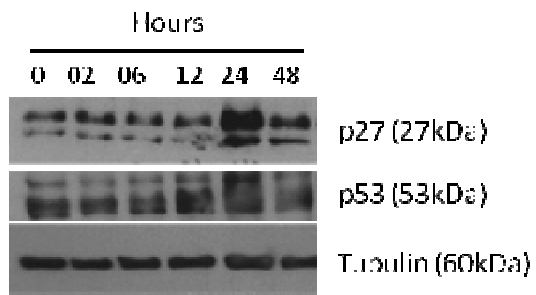


Fig 2

A



B

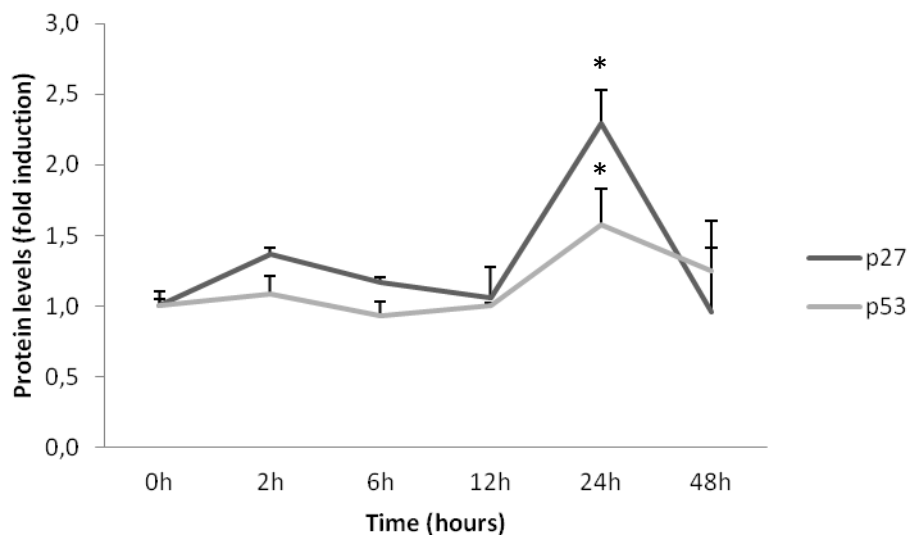
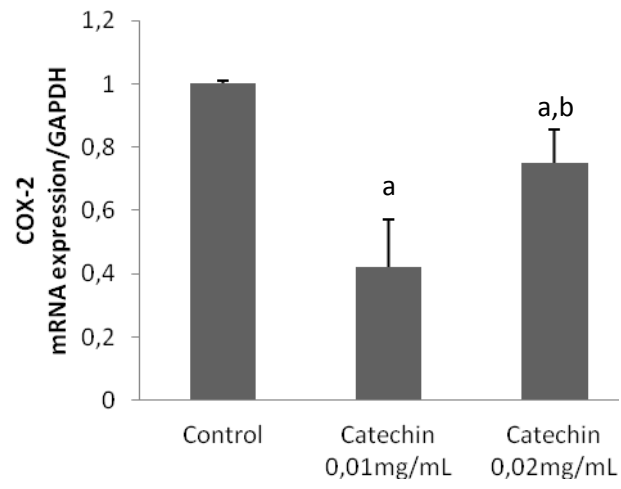


Fig 3

A



B

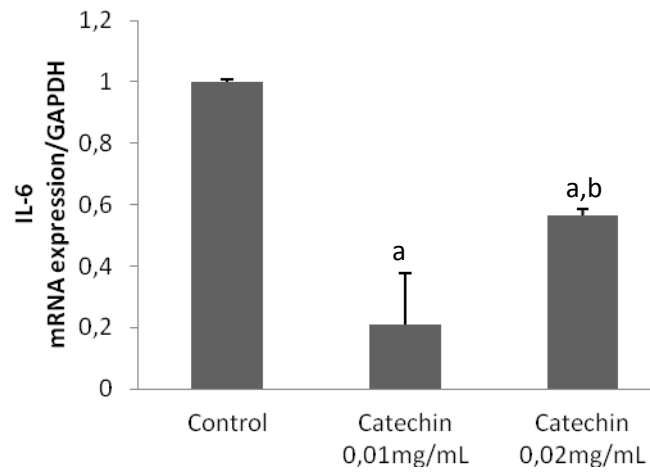
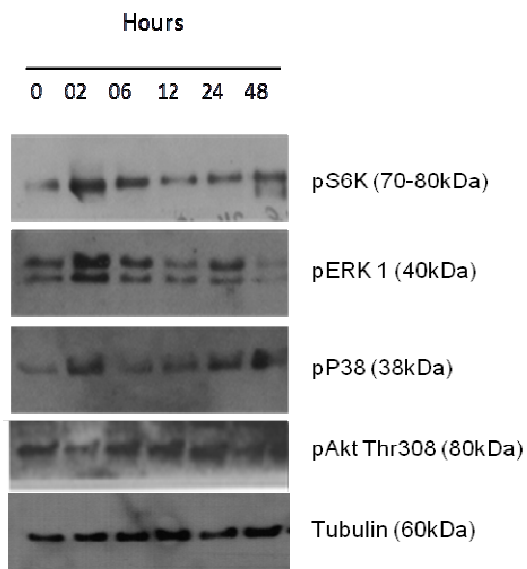
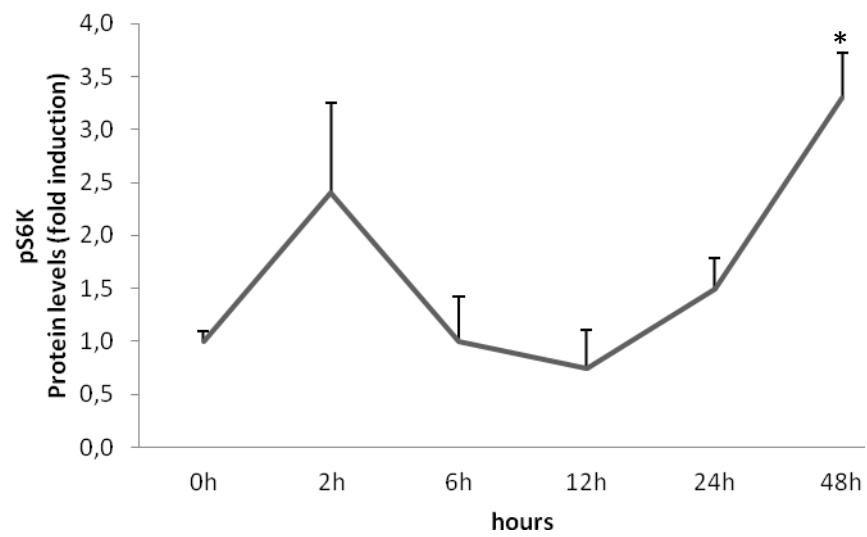


Fig 4

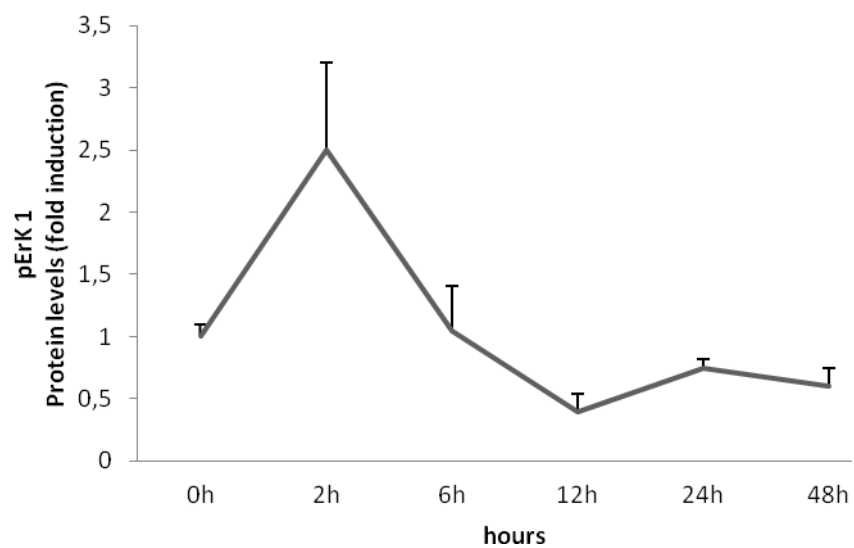
A



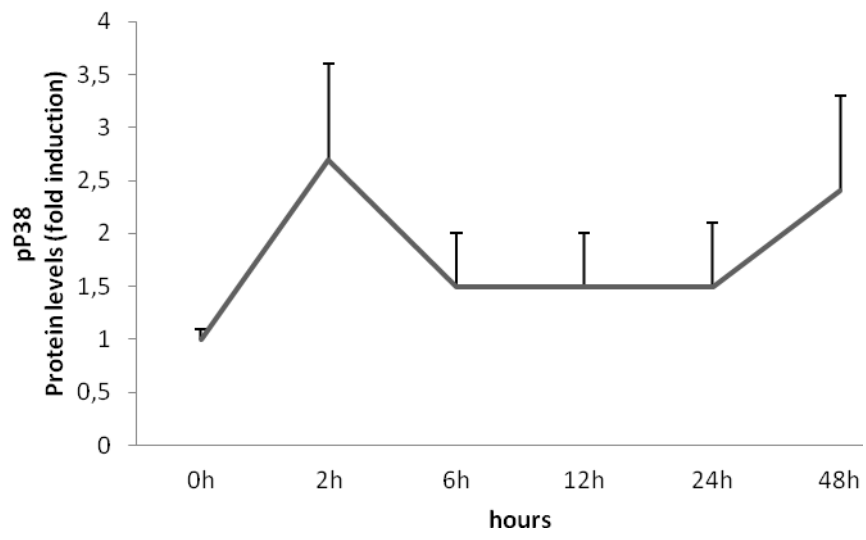
B



C



D



E

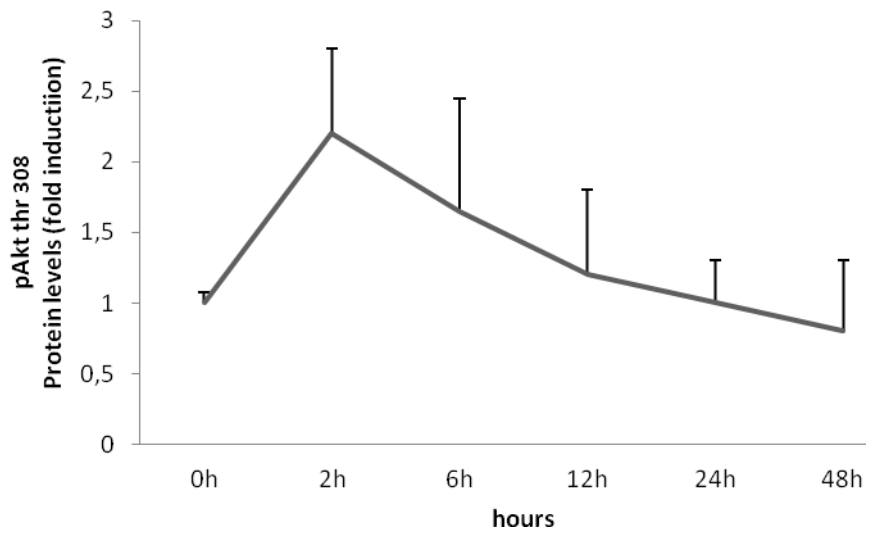


Fig 5

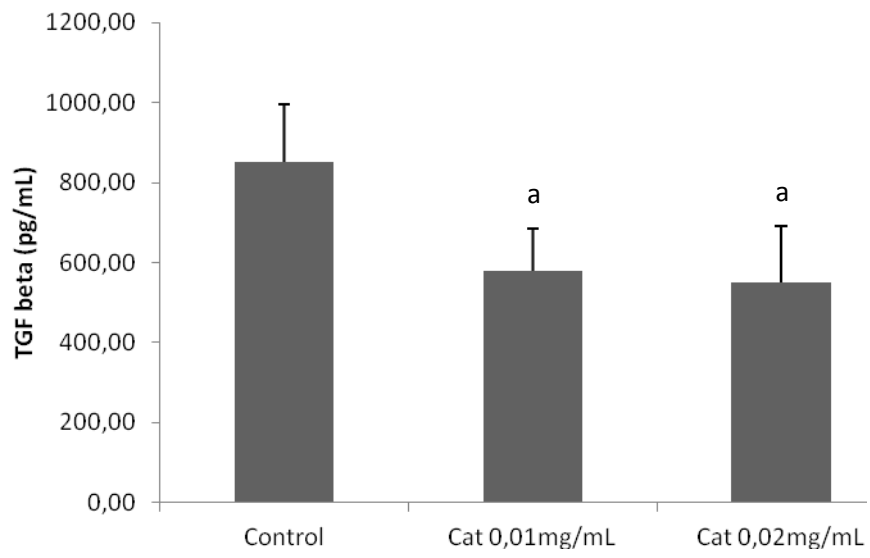


Fig 6

CAPÍTULO III

REVERSÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS HSC TRATADAS COM CATEQUINA

Artigo a ser enviado para publicação

REVERSÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS HSC ATIVADAS TRATADAS COM CATEQUINA

Cristina Machado Bragança de Moraes¹, Shanna Bitencourt¹; Denizar Mello¹; Fernanda Cristina Mesquita¹; Leticia Paranhos de Oliveira¹; Gabriela Viegas¹; Eduardo Caberlon¹; Bruno de Souza Basso¹; Gabriela Acevedo Ferreira¹; Ramon Bartrons²; Jose Luis Rosa²; Francesc Pujol Ventura² and Jarbas Rodrigues de Oliveira^{1,3}

¹ Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain.

³ Para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 263, CEP: 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: jarbas@pucrs.br

RESUMO

Os compostos fenólicos presentes em sementes de cacau têm sido amplamente estudados devido aos seus benefícios a saúde, tais como, atividade antioxidante e ação anti-inflamatória. A fibrose é uma resposta que ocorre em quase todos os pacientes com lesão hepática crônica. Um grande número de citocinas e mediadores intercelular solúveis estão relacionadas a mudanças no comportamento e fenótipo da célula hepática estrelada (HSC) que desenvolvem um fenótipo fibrogênico em resposta a um aumento na produção de fibrose. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade do extrato de cacau e da catequina na reversão fenotípica das células GRX. Após tratamento das células com cacau, assim como com a catequina, pode-se observar o aparecimento de gotículas de gordura nas células tratadas em todas as concentrações testadas, sugerindo a reversão do fenótipo miofibroblástico para o fenótipo lipocítico após 10 dias de incubação. Para entender seu possível mecanismo de ação, avaliamos a produção de colágeno por estas células, o fator lipogênico PPAR α e a glutathione, um fator antioxidante. Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa do RNAm do colágeno tipo 1 e um aumento do PPAR α . Este estudo demonstra que a catequina possui efeito lipogênico sobre as células GRX, sugerindo um potencial efeito antifibrótico.

Palavras Chave: células GRX, catequina, colágeno, glutathione, PPAR α

INTRODUÇÃO

A fibrose hepática é consequência de um dano hepático grave e ocorre em muitas formas de lesões hepáticas crônicas, incluindo infecção por vírus, doenças auto-imunes e abuso de álcool (Bissel, 1998).

As células hepáticas estreladas (HSC) são reconhecidas como a principal fonte de componentes da matriz celular na doença hepática crônica e desempenham um papel crítico no desenvolvimento da fibrose hepática (Wu, Zern, 2000).

A linhagem celular GRX é representativa das HSCs em camundongos (Guimarães et al 2006; Vincent et al 1998; Souza et al 2008). Estas células, podem expressar um fenótipo miofibroblástico ativado em resposta a tratamento in vitro com substâncias pró-fibrogênicas, ou expressar um fenótipo lipocítico quiescente se tratada com retinol, ácido retinóico ou drogas que modificam o metabolismo lipídico, como a indometacina (Souza et al. 2008). No estado de repouso, há alterações fenotípicas, como uma reorganização do citoesqueleto de actina, um acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma e alterações na atividade secretora de colágeno (Guimarães et al. 2006). Assim, a linhagem celular GRX é considerada um modelo in vitro das HSCs.

Entre os compostos fenólicos presentes nas sementes de cacau, aproximadamente 60% destes correspondem a catequina, a qual tem sido estudada em relação a vários benefícios à saúde, como alta atividade antioxidante (Zeebe et al., 2000; Bharrhan et al., 2011; Salah et al., 1995; Steinberg et al., 2003; Wan et al., 2001) e redução na concentração plasmática de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estudos provaram que as procianidinas do cacau são capazes de reduzir a ativação plaquetária, auxiliando na manutenção da saúde cardiovascular e modulando o sistema imunológico (Steinberg et al., 2003; Wan et al., 2001; Ursini, Sevanian, 2002;. Auger et al., 2004).

Portanto, o objetivo deste estudo foi o de avaliar a atividade do cacau e da catequina na reversão fenotípica das Células GRX.

MATERIAIS E MÉTODOS:

As sementes de cacau são da variedade Forastero, provenientes da CEPLAC/CEPEC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira e Centro de Pesquisas do Cacau) localizada em Ilhéus/BA, Brasil.

Preparação do extrato de cacau

Os polifenóis das sementes de cacau foram extraídos segundo metodologia descrita por Jonfia-Essien et al. (2008), com adaptações. As sementes foram desengorduras em soxhlet, utilizando ciclo-hexano como solvente, após o cacau foi colocado em capela de fluxo até a evaporação total do solvente e a partir daí foi pesado 10g de cacau e adicionado 100mL de metanol (MeOH 70%), o qual foi levado a agitação por 2hs, protegido da luz. Após a solução foi filtrada e seca em evaporador rotatório.

Catequina

A catequina utilizada foi a (+)-Catechin hydrate $\geq 98\%$ (C₁₅H₁₄O₆) da marca Sigma[®].

Cultura de células

As células GRX foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As células foram mantidas em DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium) (Invitrogen) suplementado com 5% SFB (soro fetal bovino), 1% penicilina/streptomicina e pH 7.4, e foram mantidas em incubadora umidificada a 5% de CO₂ e 37°C.

Detecção de lipídios por Oil Red

Para visualizar a morfologia da células e o acúmulo de lipídios após 10 dias de incubação as células foram coradas com Oil Red-O (ORO) (Sigma, USA). Os lipídios intracelulares foram analisados utilizando microscópio invertido e as fotos foram tiradas em câmera digital (Bel Photonics, Italy).

Quantificação do Colágeno Total

O conteúdo de colágeno das células GRX foi medido usando Picro-sirius vermelho. Resumidamente, 100 mL do sobrenadante das células foram coletadas e 1mL de Picro-sirius foi adicionado para formar um complexo colágeno-corante. Após, a tintura não ligada ao colágeno foi removida através de centrifugação e o complexo colágeno-corante foi dissolvido em NaOH. A absorbância foi medida em 540 nm em um leitor de placas ELISA. Cada amostra foi normalizada pela quantidade relativa de proteína total medida pelo método de Bradford (1976).

Expressão do RNAm do Colágeno do Tipo 1 por RT-PCR em tempo real

O RNA total foi isolado a partir de células GRX usando o Ultraspec RNA Isolation System (Biotecx). A seguir, 5 mg de RNA total foi transcrito usando um cDNA RT kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EUA). As PCRs quantitativas foram realizadas utilizando um ABI Prism 7900 HT Rápido Real-Time PCR System e um sonda Taqman 5'-nuclease. Todas as transcrições foram normalizadas com GAPDH.

Expressão do RNAm de peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) por RT-PCR

O RNA total foi extraído das células usando reagente TRIzol (Invitrogen, EUA). O RNA foi reversamente transcrito em cDNA usando Superscript III First-Strand (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Foi testado mRNA PPAR γ , cujo primer direto foi 5'- TGGAATTAGATGACAGTGA CTTGG-3' e o primer reverso foi 5' CTCTGTGACGATCTGCCTGAG -3' e mRNA β -Actina cujo primer direto foi 5'-TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG-3' e o primer reverso foi 3'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-5' (Guimarães et al., 2007).

A intensidade das bandas foi quantificada por densidade óptica usando o software ImageJ (NIH, USA). Todos os resultados correspondem a quantificação relativa usando β -actina como controle interno.

Dosagem de Glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH foi realizada pelo método preconizado por BEUTLER et al. (1963).

Análise Estatística

Os dados foram apresentados em estatísticas descritivas simples (média e desvio-padrão). Para a comparação entre as medias foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o Post Hoc Test de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95% e os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, versão 15.0. (SPSS Inc. Ohio, USA).

RESULTADOS

Para estudar o efeito do extrato de cacau na reversão do fenótipo fibroblástico para o fenótipo lipocítico, as células GRX foram tratadas com extrato de cacau em concentrações de 0,06 e 0,120mg/mL e incubadas durante 10 dias. Conforme a Fig.1, pode-se observar que o extrato de cacau induziu a mudança do fenótipo quando comparado com o grupo controle, onde podemos observar o aparecimento de gotículas de gordura e a perda da característica alongada, comum no fenótipo fibroblástico.

Assim como foi observado com o extrato de cacau, a catequina, um dos compostos mais importantes da semente, também demonstrou a capacidade de alterar o fenótipo das células GRX, apresentando acúmulo de gotículas de gordura nos grupos tratados com catequina nas concentrações 0,01 e 0,02mg/mL quando comparadas com o grupo controle, adquirindo assim, características das células com fenótipo lipocítico.

Como se sabe a fibrose hepática é caracterizada por um acúmulo anormal de proteínas da matriz extracelular, especialmente colágeno, principalmente colágeno do tipo 1 e 3 (Gressner, 1998). Sendo assim, foi avaliado o colágeno

total e a expressão do mRNA do colágeno do tipo 1a1, com o objetivo de verificar o efeito da catequina na redução destes.

A fim de avaliar a produção de colágeno nos grupos em estudo, determinamos a concentração do colágeno total no sobrenadante das culturas celulares. Como podemos ver na fig.3, a concentração de colágeno total não sofreu alterações significativas em 24hs de incubação.

Porém, ao ser avaliada a expressão do mRNA do colágeno do tipo 1a1, conforme Fig.4, pode-se observar uma diminuição significativa deste nas células tratadas com catequina tanto na concentração 0,01 como na 0,02mg/mL quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,05$).

Como a catequina provocou uma alteração do fenótipo miofibroblástico para o lipocítico, avaliamos a expressão do RNAm do PPARs. Nossos resultados apresentaram um aumento significativo nos grupos tratados com as duas concentrações de catequina ($P < 0,05$), quando comparados com o grupo controle. Estes resultados aparecem na fig.5.

Para avaliar a influência do estresse oxidativo na ativação das células estreladas GRX, determinamos a concentração de glutathiona reduzida nos grupos estudados. Na fig.6 podemos ver que não houve alteração significativa em 24hs de incubação.

DISCUSSÃO

No estado fisiológico, as células estreladas hepáticas (HSC) possuem fenótipo lipocítico, caracterizado pela presença de gotículas de gordura em seu citoplasma. Quando ativadas, em resposta a um dano celular hepático, elas perdem as gotículas de gordura e adquirem um fenótipo miofibroblástico (Friedman, 2008). Outra característica das HSCs em estado ativado é o aumento de produção de componentes da matriz extracelular, especialmente colágeno, que vem sendo implicado na patogênese da fibrose hepática (Bataller, Brenner, 2005). Quando a fibrose hepática ocorre, a produção de colágeno, principalmente colágeno do tipo 1 e 3 são responsáveis por até 50%

das proteínas totais do fígado fibrótico (Gressner, 1998). Portanto, o colágeno tipo 1 é um parâmetro importante que reflete a síntese de colágeno no fígado (Friedman, 1990).

No nosso estudo observamos que tanto o extrato de cacau como a catequina alteraram o fenótipo das células GRX para lipocítico. Uma das hipóteses da reversão fenotípica dessas células é a regressão da fibrose, que pode ser acompanhada pelo aumento na síntese de lipídios e reaparecimento das gotículas de gordura em seu citoplasma.

No intuito de avaliar se esta alteração envolveria a diminuição da produção de colágeno, determinamos a concentração de colágeno total no sobrenadante das culturas celulares. Observamos que não houve uma diminuição significativa deste parâmetro. Este resultado provavelmente se deve ao pouco tempo de incubação (24 horas).

Ao avaliar a expressão do RNAm de colágeno do tipo 1, observamos uma diminuição significativa, evidenciando que as células estavam apresentando uma característica mais lipocítica, o que sugere que a catequina mostrou-se eficiente na redução da fibrose provocada por estas células.

O PPAR γ é membro de uma superfamília de receptores nucleares, e é considerado um dos principais reguladores da adipogênese. Neste estudo, verificamos que este fator nuclear estava significativamente aumentado nos grupos tratados com catequina. Este resultado nos indica um provável mecanismo de ação da catequina, sugerindo que este mecanismo pode induzir o fenótipo lipocítico.

O estresse oxidativo é um importante fator pró-fibrogênico. A glutathiona reduzida é um dos principais componentes hepáticos de proteção contra os radicais livres. O estresse oxidativo é capaz de induzir a expressão de proteínas da matriz extracelular em diferentes tipos celulares, entre eles, as células hepáticas estreladas (HSC) (Greenwel et al., 2000). O papel desempenhado pelo estresse oxidativo na produção de colágeno pelas HSC está bem estabelecido. Em patologias hepáticas em que o estresse oxidativo é induzido, as HSC apresentam um fenótipo ativado (miofibroblástico),

caracterizado pela produção da citocina fibrogênicas TGF- β e indução de proteínas de matriz extracelular matriz, principalmente o colágeno tipo I (Reeves, Friedman, 2002). Em estudos “in vivo” e “in vitro” com HSCs, tem-se encontrado estrita a relação entre estresse oxidativo e a produção de colágeno através de diferentes mecanismos moleculares, como a indução do colágeno 1 α 1, síntese de peróxido de hidrogênio gerados em resposta ao TGF- β (García-Trevijano, 1999) ou por peroxidação lipídica (Parola, 1999). Em nosso estudo não detectamos um aumento na glutathione reduzida, mostrando que os primeiros eventos que provocam a alteração fenotípica não se devem ao aumento deste parâmetro antioxidante.

Em conclusão, tanto o extrato de cacau, como a catequina tem a propriedade de reverter o fenótipo ativado das células GRX para um estado quiescente, e que este mecanismo pode ser via ativação da rota metabólica do PPAR γ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Auger, C., Al-Awwadi, N., Bornet, A., Rouanet, J., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P., 2004. Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Res. Int.* 37, 233–245.

Bataller, R., Brenner, D. A., 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 115, 209-218.

Bharrhan, S., Koul, A., Chopra, K., Rishi, P., 2011. Catechin Suppresses an Array of Signalling Molecules and Modulates Alcohol-Induced Endotoxin Mediated Liver Injury in a Rat Model. *PLoS ONE.* 6, e20635. DOI:10.1371.

Bissell, D.M., 1998. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol.* 33, 295-302.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Protein assay by dye binding.* 248-255.

Fortuna, V. A., Trugo, L., Borojevic, R., 2001. Acyl-CoA:retinol acyltransferase (ARAT) and lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) activation during the lipocyte phenotype induction in hepatic stellate cells. *J Nutr Biochem.* 12, 610–621.

Friedman, S. L., 1990. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Semin Liver Dis.* 10, 20-29.

García-Trevijano, E. R., Iraburu, M. J., Fontana, L., Dominguez-Rosales, J. A., Auster, A., Covarrubias-Pinedo, A. et al. 1999. Transforming growth factor b1

induces expression of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP β dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 29, 960-70.

Greenwel, P., Dominguez-Rosales, J.A., Mavi, G., Rivas-Estilla, A. M., Rojkind M., 2000. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited $\alpha 1(I)$ collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology*. 31,109-16.

Gressner, A. M., 1998. The cell biology of liver fibrogenesis na imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res*. 292, 447-452.

Guimarães, E.L., Franceschi, M.F., Andrade, C.M., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Margis, R., et al., 2007. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int*. 27, 1255-64.

Guimarães, E.L., Franceschi, M.F., Grivicich, I., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Margis, R., Guma, F.C., 2006. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int*. 26, 477–485.

Guma, F. C. R., Mello, T. G., Mermelstein, C. S., Fortuna, V.A., Wofchuk, S.T., Gottfried, C., Guaragna, R. M., Costa, M.L., Borojevic, R., 2001. Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. *Biochem Cell Biol*. 79, 409–417.

Herrmann, J., Gressner, A. M., Weiskirchen, R., 2007. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med*. 11, 704–722.

Parola, M., Robino, G., Dianzani, M. U., 1999. 4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis. *Int J Mol Med*. 4, 425-432.

Reeves, H. L., Friedman, S.L., 2002. Activation of hepatic stellate cells a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*. 7, 808-826.

Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C., 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 322, 339–346.

Souza, I.C., Martins, L.A., Coelho, B.P., Grivicich, I., Guaragna, R.M., Gottfried, C., Borojevic, R., Guma, F.C., 2008. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Mol. cell. biochem*. 315, 1-7.

Steinberg, F.M., Bearden, M.M., Keen, C.L., 2003. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc*. 103, 215-223.

Ursini, F., Sevanian, A., 2002. Wine polyphenols and optimal nutrition. *Ann. N. Y. Acad. sci*. 957, 200–209.

Vincente, C.P., Fortuna, V.A., Margis, R., Trugo, L.C., Borojevic, R., 1998. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem.* 187, 11–21.

Wan, Y., Vinson, J.A., Etherton, T.D., Proch, J.; Lazarus, S.A., Kris-Etherton, P.M., 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am. j. clin. nutr.* 74, 596-602.

Wu J, Zern M. A., 2000. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 35, 665-672.

Zeeb, D.J., Nelson, B.C., Albert, K., Dalluge, J.J., 2000. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Chem.* 72, 5020–5026.

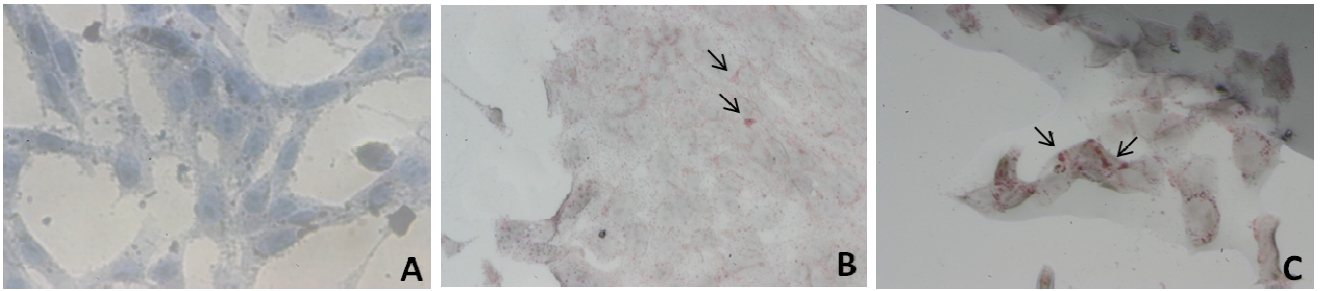


Fig.1: Células GRX coradas com Oil-Red-O (ORO) após 10 dias de incubação. **A:** Controle (40X); **B:** Extrato de cacau 0,06mg/mL (40X); **C:** Extrato de cacau 0,120mg/mL (40X). As fotografias B e C demonstram presença de gotículas de gordura nas células, o que não se observa na fotografia do A do grupo controle.

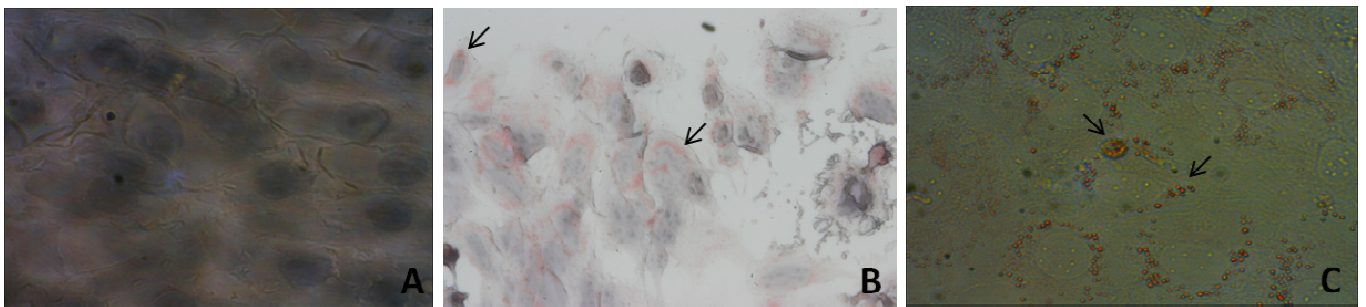


Fig.2: Células GRX coradas com Oil-Red-O (ORO) após 10 dias de incubação. **A:** Controle (40X); **B:** Catequina 0,06mg/mL (40X); **C:** Catequina 0,01mg/mL (40X). As fotografias B e C demonstram presença de gotículas de gordura nas células, o que não se observa na fotografia do A do grupo controle.

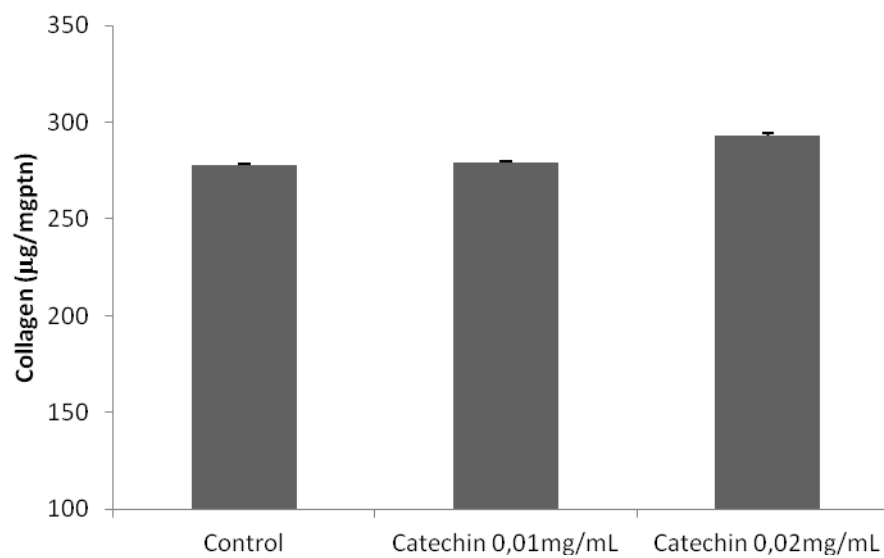


Fig.3: Colágeno total em células GRX tratadas com catequina em concentrações de 0,01 e 0,02 mg/mL em 24h de encubação ($p>0,05$). Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão.

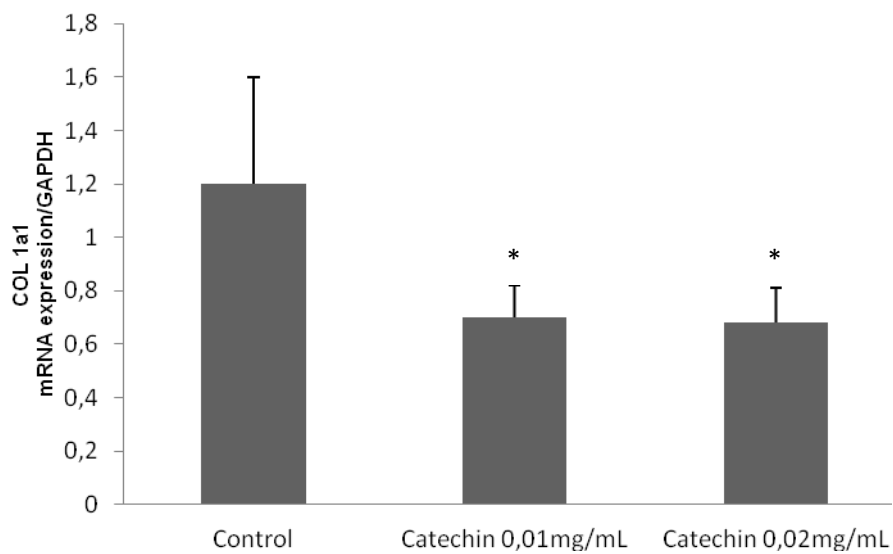


Fig.4: Expressão de mRNA de Col 1a1 por RT-PCR em Tempo Real em células tratadas com catequina nas concentrações 0,01 and 0,02 mg/mL em 24h de incubação. *Catequina 0.01 mg/mL, e *Catequina 0.02 mg/mL < controle ($P < 0,05$). Os mRNAs indicados foram normalizados com Gapdh. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

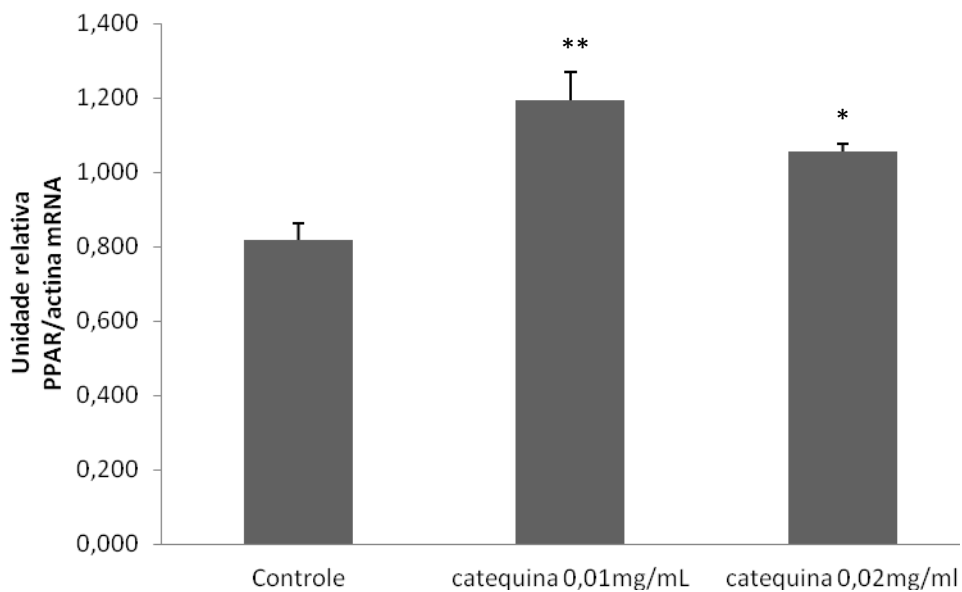


Fig.5: Efeito da catequina na expressão de mRNA de PPARS das células tratadas com catequina 0,01 e 0,02mg/mL por 24h. ** catequina 0,01 mg/mL < controle (p=0,002) e *catequina 0.02 mg/mL < controle (P=0,004). Os resultados são expressos como unidade relativa usando β -actina como controle de expressão de mRNA. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

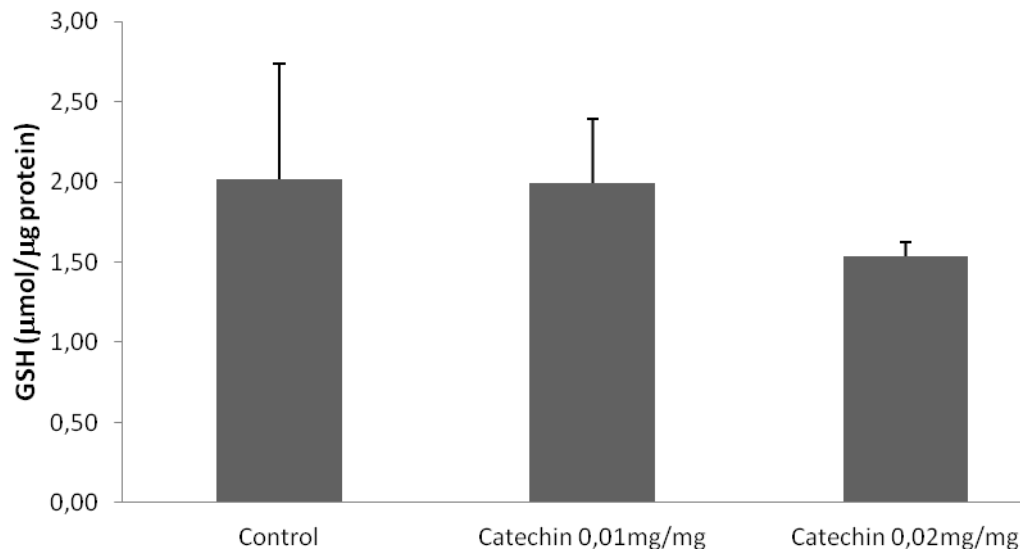


Fig. 6: Glutathiona (GSH) em células GRX tratadas com catequina em concentrações 0,01 e 0,02 mg/mL em 24h de incubação ($P>0,05$). Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo baseou-se em evidências que as pessoas de uma maneira geral estão buscando nos alimentos ricos em substâncias bioativas benefícios à saúde.

O cacau vem sendo amplamente especulado, como um alimento com capacidade funcional, ou seja, capacidade de provocar efeitos benéficos à saúde. Com isso, a indústria alimentícia vem explorando sua utilização como ingrediente em vários tipos de alimentos.

Conforme descrito na literatura, o cacau é rico em uma variedade de compostos fenólicos com atividades biológicas bastante variadas e um desses compostos, o majoritário entre os fenóis, é a catequina. Com isso, buscamos identificar possíveis atividades da catequina em células hepáticas estreladas (HSC) ativadas para fibrose.

Nosso estudo baseou-se na propriedade antioxidante e anti-inflamatória da catequina e, baseados nisso, iniciamos a investigação para verificar se a catequina apresentava capacidade em reduzir o crescimento ou reverter o fenótipo das células GRX, mimetizando uma redução do quadro fibrótico.

A idéia inicial do presente estudo foi de isolar a catequina das sementes de cacau e usá-la para todas as demais análises. Porém, como o cacau é rico em uma variedade muito grande de compostos fenólicos, além dos não fenólicos, a purificação desta substância tornou-se inviável tanto por questões metodológicas como econômicas, assim, optou-se por utilizar a catequina comercial (Sigma®) para dar seguimento nas pesquisas.

No primeiro estudo (Capítulo II), iniciamos a avaliação das atividades do extrato bruto de cacau, extraído com MEOH 70%, no crescimento das células

GRX, e observamos que o extrato de cacau reduziu o crescimento das células GRX, a qual apresenta uma característica já muito bem descrita de apresentar um crescimento bastante acelerado quando em estado ativado.

Após isso, conhecendo através da literatura a concentração de catequina encontrada nas sementes de cacau, pode-se calcular concentrações da catequina para serem usadas nas análises posteriores.

A catequina foi testada no crescimento das células GRX e assim como o cacau, mostrou-se capaz de reduzir de forma significativa o crescimento celular.

O segundo passo do trabalho foi investigar o caminho pelo qual as células estavam diminuindo crescimento, e a primeira opção foi verificar se este efeito poderia estar ocorrendo por necrose celular. A presença de necrose foi avaliada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelas células, o que não ocorreu. Concluímos com estes dados que a catequina não possuía ação tóxica sobre estas células nas concentrações testadas.

A seguir avaliamos a morte celular programada pela análise por Western blot de Caspase 3, PARP e LC3, marcadores de apoptose e autofagia respectivamente. Percebemos que conforme as proteínas avaliadas, a redução de crescimento não foi por estes mecanismos.

Passamos a investigar a possibilidade de a catequina estar parando o ciclo celular. Assim, avaliamos a expressão de proteínas que estão envolvidas em fases importantes de regulação do ciclo celular, a p27 e p53, as quais mostraram aumento de sua expressão em 24h demonstrando que possivelmente este seja um dos caminhos pelo qual o crescimento celular

esteja diminuído. O ciclo celular também foi avaliado por citometria de fluxo, porém houve muitas dificuldades na padronização deste método, especificamente na sincronização das células, o que tornou inviável a utilização dos resultados obtidos, o que acreditamos ser importante que seja avaliado posteriormente.

Na busca de outros mecanismos de ação da catequina, investigou-se o envolvimento de mecanismos antiinflamatórios, os quais poderiam estar diminuindo crescimento, visto que, há uma estreita relação entre o processo de fibrose e alguns mecanismos inflamatórios. Neste contexto, verificamos que a catequina reduziu significativamente a expressão da IL-6, e COX-2, que são citocinas amplamente descritas com atividade pró-inflamatória. Ainda complementando esses resultados, verificamos uma significativa redução na concentração de TGF- β no sobrenadante das células tratadas com catequina. Neste sentido, sabemos que o TGF β é um dos mais importantes fatores envolvidos na fibrose hepática.

No segundo estudo (Capítulo II), após conhecer as rotas pelas quais a catequina diminuiu o crescimento celular nas células GRX, buscamos investigar se a catequina, assim como o extrato de cacau, seriam capazes de reverter o fenótipo miofibroblástico das células GRX para o fenótipo lipocítico, revertendo assim o estado fibrogênico destas células.

Para isso investigou-se a presença de gordura nas células tratadas com extrato de cacau e catequina, por meio do corante Oil Red, uma substância capaz de corar as gotículas de gordura presentes na células. Detectamos de forma qualitativa que os grupos tratados com extrato de cacau, assim como os

grupos tratados com catequina mostraram o aparecimento de gotículas de gordura após tratamento. A investigação quantitativa de lipídios nas células foi testada, porém o método que tínhamos disponível não se mostrou sensível e exato.

Além disso, investigamos o efeito da catequina na produção de colágeno pelas células estudadas, visto que o colágeno é um dos elementos mais expressos por células hepáticas estreladas em estado ativado. Para isso foi avaliado o colágeno total, o qual não mostrou diferença significativa após tratamento com catequina. O colágeno do tipo 1, que segundo a literatura, é, juntamente, com o colágeno tipo 3 os mais expressos em células HSC ativadas, mostrou uma diminuição significativa após tratamento com a catequina, sugerindo uma capacidade potencial em diminuir a síntese de colágeno por células HSC ativadas.

Um dos resultados mais importantes da segunda parte deste estudo foi o aumento de da expressão do RNAm do PPAR γ pelas células GRX.

O PPAR é uma importante rota lipogênica em diversos tipos de células. Nosso estudo mostrou que a catequina ativa este fator e que este pode ser o seu principal mecanismo de ação. Com este resultado, nos questionamos se a catequina poderia ter esse efeito sobre outros tipos celulares, como por exemplo, na fibrose pulmonar. Portanto, pretendemos aprofundar nossos estudos sobre a catequina em outros tipos de fibrose.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

- 1) O extrato de cacau, assim como a catequina diminuem o crescimento das células GRX.
- 2) A diminuição de crescimento celular induzida pela catequina não ocorre por apoptose ou autofagia, mas através de seu efeito anti-inflamatório e parada do ciclo celular.
- 3) A catequina reduziu a síntese de TGF- β , o que demonstra um elevado potencial da catequina no controle da fibrose hepática.
- 4) O extrato de cacau e a catequina alteraram o estado fibrogênico das células GRX, modificando seu fenótipo miofibroblástico para lipocítico.
- 5) A catequina diminuiu a expressão do Colágeno do tipo 1.
- 6) O efeito lipogênico da catequina pode ser mediado pela ativação do PPAR γ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Arts ICW, Hollman PCH, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n.1, 317S-325S, January 2005.

Auger C, Al-Awwadi N, Bornet A, Rouanet J, Gasc F, Cros G, Teissedre P (2004) Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. **Food Research International** 37: 233–245

Beutler, E.; Duron, O.; Kelly, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v.61, p. 882-890, 1963.

Duke JA. Biological activity summary for cocoa (*theobroma cocoa L.*). **J. Med. Food** 2000; 3:115-119.

Efraim P, Tucci ML, Pezoa-García NH, Haddad R, Eberlin MN. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacauero de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology** 2006; 4(9): 228-236.

Friedman, S. L. Hepatic fibrosis-Overview. **Toxicology**. v. 254, n.3, p.120-129, 2008-a.

Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Gastroenterology**. v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008-b.

Guimarães, E.L.M. et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. **Liver International**. v. 26. p. 477-485, 2006.

Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH (2000) Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. **Journal of Nutrition**, 130(Suppl. 8S): 2086S–2092S

Iredale, J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: Exploiting the biology of inflammation and repair. **Pharmacological Research**. v. 58, n.2, p. 129-136, 2008.

Keen C. Chocolate: Food as Medicine/Medicine as food. **J Am Coll Nutr** 2001; 5(20):436S-439S.

Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. **American Journal Clinical Nutrition** 2005; (81):289-303.

Kerdilès, M.C.L.B. et al. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur. Cytokine Netw.* v. 19, n.2, p.69-80, 2008.

Kris-Etherton PM, Kenn CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. ***Curr Opin Lipidol*** 2002; (13):41-49.

Krizhanovsky, V. et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. ***Cell.*** v.134, n. 4, p.657-667, 2008.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. ***J Agric Food Chem*** 2003; (51):7292-7295.

Mao, T.K., Powell, J.W., Keen, C. L. et al., 2000. The effect of cacao procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β . ***Life Sciences.*** 15, 1377-1386.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2008. ***Farmacologia***, 6th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Rimm EB. Fruit and vegetables – building a solid foundation. ***Am J Clin Nutr*** 2002; (76):1-2.

Sanbongi C, Osakabe N, Natsume M et al. Antioxidative polyphenols isolated from theobroma cacao. ***J Agric Food Chem*** 1998; 2(46):454-457.

Sarem, M. et al. Lãs células estrelladas del hígado: su importancia em condiciones normales y patológicas. ***Gastroenterología y hepatología***, 2006.

Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M, Polyphenols: antioxidants and beyond. ***American Journal of Clinical Nutrition***, v.81, n.1, 215S-217S, January 2005

Senoo, H. Structure and function of hepatic stellate cells. ***Medical Electron Microscopy.*** v. 37, n.1, p.3-15, 2004.

Souza, I. C. et al. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. ***Molecular and Cellular Biochemistry.*** v. 315. p. 1-7, 2008.

Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. ***J Am Diet Assoc*** 2003; 2(103):215-223.

Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H, German JB (1996) Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. ***Journal of the Science of Food and Agriculture.*** 122: 157–168.

Ursini F, Sevanian, A (2002) Wine polyphenols and optimal nutrition. **Annals of New York Academy of Sciences**, 957, 200–209.

Vincente, C. P. et al. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 187, p.11-21, 1998.

Weisburger JH, Williams GM. The disfunction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicologic Science** 2000; (49):231-246.

Winau, F. et al. Starring stellate cells in liver immunology. **Current Opinion in Immunology**. v. 20, n.1, p. 68-74, 2008.