



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

**Efeito Protetor do Resveratrol na Hepatotxicidade Induzida por Fármacos Anti-Tuberculose Isoniazida e Rifampicina em Camundongos**

Autor

**Natália Fontana Nicoletti**

Orientador

**Prof. Dr. André Arigony Souto**

Co-orientador

**Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**

Porto Alegre

Novembro de 2010



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

**Efeito Protetor do Resveratrol na Hepatotxicidade Induzida por Fármacos Anti-Tuberculose Isoniazida e Rifampicina em Camundongos**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biologia Celular e Molecular como  
requisito para a obtenção do grau de  
Mestre

Autor  
**Natália Fontana Nicoletti**

Orientador  
**Prof. Dr. André Arigony Souto**

Co-orientador  
**Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**

Porto Alegre  
Novembro de 2010

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. André Arigony Souto, pela acolhida na PUCRS, pela confiança, pelos ensinamentos, troca de experiências, paciência e amizade durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Diógenes Santiago Santos e ao Prof. Luiz Augusto Basso agradeço a oportunidade de participar do grupo de pesquisa CPBMF e INCT-TB, aos ensinamentos e ao apoio fundamental para a realização deste trabalho.

A profa Maria Martha Campos, agradeço pela disponibilidade, paciência, troca de idéias e experiências, pelo conforto, amizade, dedicação e exemplo durante estes dois anos.

Ao prof Eraldo L. Batista Jr pelo apoio, atenção, dedicação e pelos diversos ensinamentos.

Aos amigos André A. dos Santos Jr e Valnês Rodrigues Jr, com quem dividi a bancada, os resultados e as aflições, agradeço pelos ensinamentos, pelas inúmeras sugestões e pela amizade.

A profa Fernanda Bueno Morrone e ao grupo de Farmacologia Aplicada e Instituto de Toxicologia, agradeço pelos bons momentos de diversão e amizade. O auxílio, a disponibilidade e a confiança de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas do CPBMF e INCT-TB e Quatro G Ltda. Pesquisa & Desenvolvimento, agradeço pelo carinho, amizade, ensinamentos, ajuda e força nos momentos complicados. Vocês foram especiais e importantes nestes dois anos.

A minha família:

Pai e Mãe, obrigada por fazerem de mim uma pessoa independente e determinada. Agradeço os bons exemplos de vida e caráter que sempre recebi de vocês. Obrigada pelo incentivo e pela confiança em mim depositada.

Vô Rosalinda, agradeço pelo amor, confiança e orações. Ainda vou precisar muito de tudo isso.

Meu noivo Marcelo, obrigada pela cumplicidade, conselhos, compreensão nos momentos difíceis e amor incondicional. Tu és meu anjo.

Meus irmãos – Rodrigo, Flávia e Renato, obrigada pelo companheirismo, amizade e bons (e maus) exemplos. Vocês contribuíram muito para a minha formação pessoal.

Meus sobrinhos, Valentina e João Vítor, obrigada por tornarem a minha vida mais doce e por proporcionarem momentos sem relógio, sem agenda e sem pressa.

Aos meus cães, obrigada por despertarem em mim o mais puro sentimento de solidariedade e afeto.

## RESUMO

**Introdução/Objetivos:** Isoniazida (INH) e Rifampicina (RIF) são fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose (TB). A hepatotoxicidade induzida pelos fármacos anti-TB causa substancial morbidade, o que diminui a efetividade do tratamento. Neste estudo, investigamos os efeitos do resveratrol (RSV) na hepatotoxicidade induzida por INH e RIF em camundongos. **Métodos:** Protocolos de lesão hepática aguda (3 dias) e crônica (28 dias) foram induzidos em camundongos BALB/c machos pela co-administração de INH e RIF. O RSV foi administrado 30 minutos antes da indução da hepatotoxicidade pelos fármacos anti-TB. Foram avaliados parâmetros bioquímicos, histopatológicos, testes de estresse oxidativo, atividade de MPO, produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IL-10) e expressão de mRNA de CYP2E1, SIRT1-1 e 7, e PPAR- $\gamma$ /PGC1- $\alpha$ . **Resultados:** O tratamento agudo e crônico com os fármacos INH e RIF induziu o dano hepático nos animais tratados. O RSV diminuiu significativamente os níveis de AST e ALT, a atividade de MPO e os níveis de citocinas. Além disto, o RSV restaurou a atividade da catalase e da glutathione e reverteu as alterações histopatológicas associadas ao tratamento com as drogas anti-TB. A modulação da expressão de mRNA de CYP2E1, SIRT1 e SIRT7, e de PPAR- $\gamma$ /PGC1- $\alpha$  parece estar envolvida no efeito protetor do RSV em nosso modelo de hepatotoxicidade. **Conclusões:** Os resultados demonstram que o RSV preveniu a hepatotoxicidade induzida por INH e RIF em camundongos, atuando principalmente através da modulação da expressão de SIRT1, SIRT7 e CYP2E1. O RSV pode representar uma estratégia útil no tratamento da lesão hepática causada por fármacos anti-TB.

**Palavras-chave:** RSV, fármacos anti-TB, hepatotoxicidade, CYP2E1, SIRT1 e SIRT7

## ABSTRACT

**Background/Aims:** Isoniazid (INH) and Rifampicin (RIF) are the first-line drugs used for tuberculosis (TB) treatment. Hepatotoxicity induced by anti-TB drugs leads to substantial morbidity, diminishing treatment effectiveness. Herein, we have investigated the effects of resveratrol (RSV) in the hepatotoxicity caused by INH and RIF in mice.

**Methods:** Acute (3 days) or chronic liver injury (28 days) was induced in male BALB/c mice by co-administering INH and RIF. RSV was dosed 30 min prior to INH-RIF. Serum biochemical tests, liver histopathological examination, oxidative stress, MPO activity, cytokine production (TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IL-10), and mRNA expression of CYP2E1, SIRT1-1 and 7, and PPAR- $\gamma$ /PGC1- $\alpha$  were evaluated. **Results:** Acute or chronic treatment with INH plus RIF induced hepatotoxicity in mice. RSV significantly decreased ALT and AST levels, MPO activity and cytokine levels. Furthermore, RSV reverted the decrease of both catalase and glutathione activities, and ameliorated the histopathological alterations associated to anti-TB drugs. Modulation of CYP2E1, SIRT1 and SIRT7, and PPAR- $\gamma$ /PGC1- $\alpha$  expression is likely involved in the protective effects of RSV in our model. **Conclusions:** Data shows that RSV was able to largely prevent the hepatotoxicity induced by INH and RIF in mice, mainly by modulating SIRT1, SIRT7 and CYP2E1 mRNA expression. RSV might well represent a useful strategy in the treatment of liver failures due to INH-RIF induced toxicity.

**Keywords:** resveratrol, anti-TB drugs, hepatotoxicity, CYP2E1, SIRT1 and SIRT7

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente

CCl<sub>4</sub>: Tetracloroeto de carbono

CYP450: Citocromo P450

DOTS: Sistema de terapia de observação direta

EMB: Etambutol

HDACs: Histonas deacetilases

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

INH: Isonizida

MDR-TB: Cepas resistentes a múltiplas drogas

MS: Ministério da Saúde

NAT2: N-acetiltransferase 2

OMS: Organização Mundial de Saúde

PGC1- $\alpha$ : Peroxissoma proliferador co-ativador de receptor gama

PNT: Programa Nacional de Tuberculose

PPAR- $\gamma$ : Receptor proliferador ativador de peroxissomas gama

PZA: Pirazinamida

RIF: Rifampicina

RSV: Resveratrol

SIRT6: Sirtuínas

TB: Tuberculose

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral

XDR-TB: Cepas extensivamente resistentes a drogas

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Índices de notificação de casos de TB por país em 2009 -----	<b>12</b>
<b>Figura 2:</b> Estruturas dos derivados de resveratrol -----	<b>20</b>
<b>Figura 3:</b> Processos celulares ativados pela proteína sirtuína -----	<b>24</b>



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. Histórico</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2. Ressurgimento e Epidemiologia</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3. Transmissão, Infectividade e Imunopatologia</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4. Tratamento e Hepatotoxicidade</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5. O Resveratrol</b> .....	<b>19</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Manuscrito do Trabalho Experimental</b> .....	<b>27</b>
<b>4. Considerações Finais</b> .....	<b>57</b>
<b>5. Referências</b> .....	<b>59</b>
<b>Anexo I</b> .....	<b>67</b>
Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS	
<b>Anexo II</b> .....	<b>69</b>
Depósito de Patente	
<b>Anexo III</b> .....	<b>75</b>
Carta de Submissão do Manuscrito	

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose humana (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria pertencente à família *Mycobacteriaceae*, fracamente gram-positiva, em forma de bastão, patogênica aeróbia e de crescimento lento, que estabelece sua infecção preferencialmente em macrófagos alveolares do sistema respiratório. O desenvolvimento da doença é regulado pela integridade do sistema imune do hospedeiro, que determina a imediata eliminação do microorganismo ou o condiciona a um estado de latência, onde há um equilíbrio entre a persistência do patógeno e a resposta imune do hospedeiro<sup>1,2</sup>.

### 1.1. Histórico

Durante séculos, a TB foi a principal causa de morte de milhões de pessoas. A história da tuberculose é quase tão antiga quanto a da própria civilização, havendo documentação de casos desde 3.900 a. C. No entanto, a comprovação de seu potencial contágio e a descoberta da sua causa só foram demonstrados no final do século XIX. A TB pulmonar é conhecida desde os tempos de Hipócrates como tísica, termo de origem grega utilizado para referir-se ao enfraquecimento ou desgaste corpóreo<sup>1, 3</sup>. O efeito devastador desta patologia tem sido acompanhado durante séculos pela humanidade, ao longo dos quais serviu de inspiração para a realização de descobertas científicas e para a produção de importantes obras de arte. Nas Américas existem citações de achados compatíveis com TB em múmias pré-colombianas. Entretanto, foi com a chegada dos

européus que a doença realmente se manifestou, de forma grave e aguda entre os ameríndios. Assim, têm-se relatos do acontecido com os índios norte-americanos quando privados de sua liberdade e confinados em reservas: uma taxa de mortalidade 100 para cada 10.000 índios vivos em 1881. Morriam de doença disseminada em todo organismo em um intervalo de tempo que variava de três a nove meses. No Brasil, a chegada dos missionários trouxe também a disseminação da TB entre os índios<sup>4</sup>.

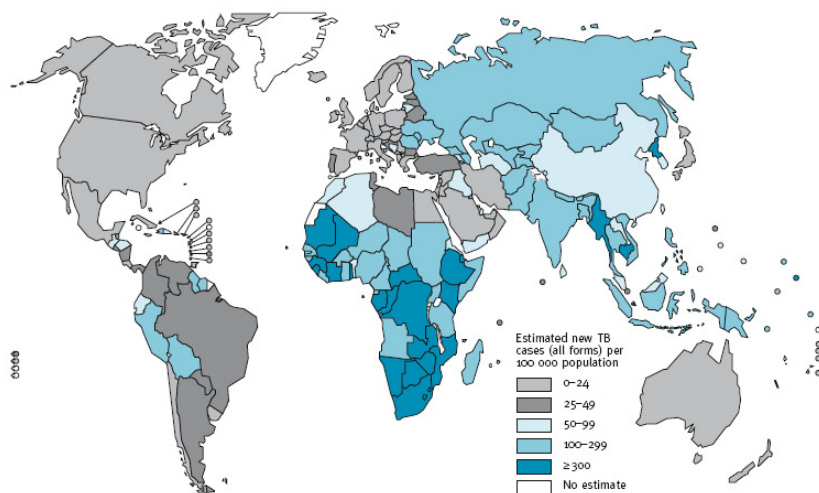
Este panorama começou a ser revertido no final do século XIX, quando Robert Koch identificou o seu agente causador<sup>3,5</sup>. Nesta época, já existia o conhecimento de que a doença era transmissível, mas apenas na metade do século XX é que surgiram os primeiros agentes para tratar a TB, como a isoniazida (INH) e a pirazinamida (PZA). Com a introdução de outros fármacos, entre elas a rifampicina (RIF) e o etambutol (EMB), foi possível criar um esquema terapêutico eficaz e a TB passou a ser considerada como uma doença facilmente tratável<sup>1</sup>. Observou-se uma queda das taxas de novos casos e de mortalidade em países desenvolvidos e uma estabilização destes indicadores em países subdesenvolvidos. De fato, acreditava-se que a TB poderia ser eliminada até o fim do século XX; no entanto, no início da década de 90, houve o surgimento e a disseminação de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB), em especial em países desenvolvidos<sup>6,7</sup>.

## **1.2. Ressurgimento e Epidemiologia**

No ano de 1993, a TB foi declarada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma emergência global à saúde, sendo necessários esforços urgentes para o controle da

doença, como desenvolvimento de novos fármacos, otimização dos métodos de diagnóstico e determinação da suscetibilidade a drogas, além de um rigoroso controle e vigilância sobre a terapia aplicada aos pacientes. Alguns destes objetivos foram alcançados pela disseminação da aplicação do sistema de terapia de observação direta (DOTS) para o tratamento da TB<sup>6,8,9</sup>.

Atualmente, a TB caracteriza-se como uma das maiores causas de morte por doença infecciosa tratável. Cerca de 9,4 milhões de novos casos ocorreram em 2009, e 1,7 milhões de pessoas morreram por TB naquele ano<sup>10</sup>. De acordo com dados publicados recentemente pela OMS, duas regiões dominam a distribuição global de notificações de TB: a Ásia (55% dos casos) e a África (30% dos casos). Outras três regiões apresentam proporções menos significativas de casos: leste do Mediterrâneo (7%), Europa (4%) e América (3%)<sup>10</sup>. A Figura 1 representa os índices de casos de TB divididos por países em 2009, de acordo com a OMS.



**Fig. 1.** Índices de notificação de casos de TB por país em 2009 (Adaptado de World Health Organization; WHO Report 2010. p. 6, fig. 1).

Nos países em desenvolvimento, onde o acesso aos serviços de saúde é limitado e o Programa Nacional de Tuberculose (PNT) não atinge os resultados desejados, a notificação dos dados freqüentemente representa somente uma fração da real incidência dos casos<sup>11</sup>.

Através de hospedeiros imunocomprometidos infectados, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) surgiu como o principal fator de risco para progressão da infecção latente por *M. tuberculosis*<sup>12</sup>. Atualmente, dos 9,4 milhões de casos de TB notificados em 2009, estima-se que 11-13% apresentam a co-infecção HIV/TB, sendo aproximadamente 80% destes localizados na África<sup>10</sup>.

O Brasil, segundo a OMS, ocupa o 14º lugar no *ranking* dos 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo, estimando-se uma prevalência de 57 milhões de infectados<sup>10</sup>. Segundo o Ministério da Saúde (MS), são diagnosticados 75.000 casos novos por e 5.000 óbitos anuais devidos à TB<sup>13, 14</sup>. Este total de casos constitui a 9ª causa de internações por doenças infecciosas, o 7º lugar em gastos com internação do Sistema Único de Saúde (SUS) por doenças infecciosas e a 4ª causa de mortalidade por doenças infecciosas<sup>15</sup>. Neste contexto, portanto, os esquemas terapêuticos para a TB possuem papel fundamental. Em 2009, foram notificados 6.529 casos novos de TB no Rio Grande do Sul, sendo que 21,9% deles representam co-infecção com HIV. Embora esforços sejam realizados pelas equipes de saúde, o percentual de cura no estado para os casos encerrados está em 74,2%, muito abaixo dos 85% preconizados pela OMS<sup>16</sup>.

A ocorrência de resistência às drogas no tratamento de *M. tuberculosis* está se tornando uma grave ameaça ao controle da doença. De acordo com o relatório anual de controle global da TB de 2010 da OMS, durante o ano de 2009, aproximadamente

250.000 casos notificados eram MDR-TB. Mais alarmante é o surgimento da TB extensivamente resistente às drogas (XDR-TB), o que preocupa epidemiologistas e profissionais da saúde com a possível ameaça do retorno da situação da TB à era pré-quimioterapia, quando aproximadamente 50% dos pacientes vinham a óbito. Até julho de 2010, 58 países relataram, pelo menos, um caso de XDR-TB em seu território<sup>10</sup>.

### **1.3. Transmissão, Infectividade e Imunopatologia**

As diferentes espécies de micobactérias apresentam o mesmo tipo de parede celular, composta por uma camada de peptidoglicanos que contém ácido *N*-glicolilmurâmico ao invés de ácido *N*-acetilmurâmico, encontrado na maioria das outras bactérias. Uma característica ainda mais distinta é que cerca de 60% da parede celular micobacteriana é constituída de lipídeos que são ácidos graxos de cadeia longa incomuns, denominados ácidos micólicos<sup>1,17</sup>. Uma terceira propriedade que as distingue das demais bactérias é o fato de sua parede celular reter o corante fucsina básica mesmo na presença de álcool e ácido (coloração de Ziehl-Nielsen). A partir desta técnica, pode-se descorar a parede celular de qualquer tipo de bactéria, exceto a micobacteriana; esta propriedade categorizou o gênero como sendo do tipo bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)<sup>18</sup>. A parede celular incomum presente neste bacilo está associada a patogenicidade e permite que o mesmo sobreviva dentro de macrófagos fagocíticos, além de conferir resistência a uma série de antibióticos<sup>19,20</sup>.

A incapacidade imunológica em conter a evolução da infecção primária confere ao patógeno condições ideais para desencadear a doença ativa em seu hospedeiro. A tosse

em pacientes com a doença ativa caracteriza o sintoma de inflamação pulmonar crônica e constitui o principal mecanismo de disseminação do organismo. Partículas resultantes da formação de aerossóis de secreções respiratórias são expelidas para o ar e permanecem em suspensão durante horas, o que justifica sua alta disseminação.

Os pacientes com TB pulmonar classicamente apresentam-se com vários meses de sintomas constitucionais (febre, perda ponderal e sudorese noturna) e sintomas localizados (tosse e hemoptise). Embora descrita como uma doença crônica, a TB pode evoluir como um processo agudo em praticamente todos os sistemas orgânicos, mimetizando outras infecções ou processos não-infecciosos comuns<sup>21, 22</sup>. Uma vez que o *M. tuberculosis* é inalado pelos pulmões, uma série de eventos imunológicos leva a três possíveis seguimentos: erradicação, infecção primária ou infecção latente. A TB aguda pode iniciar como doença primária ou sob forma de reativação de infecção latente. Na maioria dos indivíduos, a infecção primária é assintomática ou leve; sintomatologia aguda que requer tratamento desenvolve-se somente em 3 a 10% dos casos<sup>23</sup>. Cerca de 2 a 6 semanas após a primo-infecção, é estabelecida a imunidade celular, que resulta na eliminação da maior parte dos bacilos, sem apresentação de sintomatologia clínica<sup>1, 24</sup>. A TB latente afeta aproximadamente um terço da população mundial, todos os quais estão sob risco de reativação e doença aguda. Menos comumente, a re-infecção por TB também pode ocasionar uma síndrome clínica aguda<sup>21, 22</sup>.

#### 1.4. Tratamento e Hepatotoxicidade

A TB ativa geralmente é tratada com múltiplos fármacos. O tratamento de primeira linha indicado pela OMS para os casos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar consiste no uso de dois meses de RIF, INH, PZA e EMB (RHZE), seguido de 4 meses de uso RIF e INH (RH)<sup>9, 14</sup>.

A RIF possui atividade bactericida contra *M. tuberculosis* pela ligação a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase e conseqüente inibição da transcrição de RNA e síntese protéica, dependente do DNA bacteriano<sup>22, 24, 25</sup>. A INH é um pró-fármaco ativado pela catalase-oxidase bacteriana (KatG) e reduz ativamente o crescimento dos bacilos pela inibição da biossíntese de ácidos micólicos, que são componentes essenciais da parede celular do *M. tuberculosis*<sup>25, 26</sup>. Um outro pró-fármaco, a PZA, é ativado pela pirazinamidase bacteriana, o que ocorre apenas em condições ácidas (pH 5,5). O metabólito ativo é o ácido pirazinóico que inibe a síntese de ácidos graxos no *M. tuberculosis*<sup>27, 28</sup>. Este fármaco é utilizada nos dois meses iniciais de tratamento, a fim de reduzir a duração da terapia, não sendo utilizada de forma isolada. O EMB inibe a síntese de alguns metabólitos no crescimento ativo do *M. tuberculosis*, o que causa diminuição do metabolismo celular, inibição da multiplicação e morte celular<sup>29</sup>.

Os efeitos adversos mais freqüentes relacionados ao uso de tuberculostáticos são: hepatotoxicidade, manifestações cutâneas variadas e distúrbios neurológicos e gastrointestinais, sendo a hepatotoxicidade o mais sério destes efeitos<sup>30-32</sup>. Os fármacos usados nos esquemas de tratamento de TB apresentam interações entre si e com outras substâncias, o que aumenta o risco de toxicidade. Os fármacos anti-TB sofrem



metabolização e a incidência de hepatotoxicidade durante o tratamento com a utilização múltiplas drogas varia entre 2% e 28%<sup>31, 33, 34</sup>. As reações adversas causadas pelos fármacos anti-tuberculose contribuem significativamente para a não aderência ao tratamento, o que diminui sua efetividade e aumenta o surgimento de resistência às drogas. A hepatotoxicidade induzida pelos fármacos anti-TB está associada com morbimortalidade significativa e pode diminuir a efetividade do tratamento. Elevações assintomáticas das transaminases são comuns durante o tratamento, mas a hepatotoxicidade pode ser fatal quando não diagnosticada precocemente e quando a terapia não é interrompida a tempo<sup>28, 32, 35</sup>.

O mecanismo exato de hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB é desconhecido. A hepatotoxicidade induzida pela INH é considerada idiossincrática<sup>32, 36</sup>. Sugere-se que os metabólitos reativos sejam os responsáveis pela maioria das reações idiossincráticas a drogas<sup>37</sup>. A maioria dos fármacos anti-TB é lipossolúvel e sua eliminação requer a biotransformação em compostos mais hidrossolúveis. Este processo é realizado principalmente por enzimas hepáticas de biotransformação de fase I e fase II. As reações de fase I geralmente são realizadas por enzimas da família do citocromo P450 (CYP450)<sup>32, 38</sup>, em particular pelas isoformas CYP2E1 e CYP1A1<sup>39-41</sup>. As enzimas envolvidas em reações de fase I, tais como CYP2E1, são amplamente conhecidas por gerar radicais livres como subprodutos, bem como intermediários mais tóxicos após a bioativação<sup>42, 43</sup>.

A via metabólica predominante para o metabolismo da INH consiste na acetilação pela enzima hepática *N*-acetiltransferase 2 (NAT2). A INH é acetilada em acetilisoniazida e, posteriormente, hidrolisada em acetil-hidrazina e ácido isonicotínico. A

acetil-hidrazina é hidrolisada em hidrazina ou acetilada em diacetilhidrazina<sup>32, 44</sup>. Uma pequena parte da INH é diretamente hidrolisada em ácido isonicotínico e hidrazina, e esta via é de maior significância para os acetiladores lentos do que para os rápidos. Estudos recentes sugerem que a hidrazina seria o principal metabólito relacionado à hepatotoxicidade induzida pela INH<sup>33, 45, 46</sup>.

Entre os fatores de risco relacionados à hepatotoxicidade causada por drogas anti-TB, a taxa de acetilação tem sido considerado o mais importante. Polimorfismos genéticos associados a NAT2 são correlacionados ao fenótipo dos indivíduos que são divididos em acetiladores lentos, intermediários e rápidos<sup>32, 47</sup>. Estudos iniciais sugeriram que os acetiladores rápidos eram mais suscetíveis ao desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB<sup>48-50</sup>. Entretanto, estudos recentes demonstraram que os acetiladores lentos desenvolvem hepatotoxicidade induzida por drogas anti-TB mais freqüentemente e de forma mais grave, quando comparados com os acetiladores rápidos<sup>47, 51, 52</sup>.

A RIF pode induzir disfunção hepatocelular precoce no tratamento, que se resolve sem a descontinuidade do fármaco<sup>32, 53</sup>. O mecanismo de hepatotoxicidade induzida pela RIF é desconhecido e não há evidências quanto à existência de um metabólito tóxico. A RIF caracteriza-se como um potente indutor do sistema CYP450 no fígado, o que aumenta o metabolismo de vários outros compostos, incluindo a INH<sup>32, 33, 53</sup>.

O uso combinado de RIF e INH foi associado com risco elevado de hepatotoxicidade. A RIF induz a hidrólise da INH, o que aumenta a produção de hidrazina, quando os dois fármacos são combinados (especialmente em acetiladores lentos)<sup>40, 47, 52</sup>. Além disto, a RIF interage com fármacos anti-retrovirais e altera os níveis

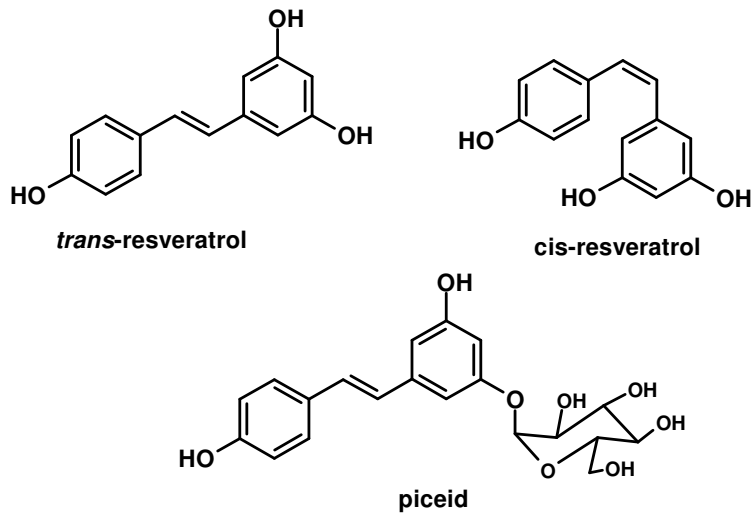
plasmáticos destes fármacos, bem como o risco de hepatotoxicidade<sup>54</sup>. Apesar da disponibilidade de agentes quimioterápicos eficazes para o tratamento da TB, a hepatotoxicidade decorrente do uso destas drogas se tornou um desafio clínico. Neste sentido, a busca de ferramentas farmacológicas que possam prevenir o dano hepático induzido por estes agentes é de grande interesse. Além disso, a identificação de novas alternativas para o tratamento da tuberculose, que sejam mais eficazes e apresentem menos reações adversas também é de extrema relevância.

### 1.5. O Resveratrol

O resveratrol (RSV) (3,4',5-trihidroxiestilbeno) (Figura 2) é um polifenol de ocorrência natural sintetizado em uma ampla variedade de plantas. Este composto é encontrado em pelo menos 72 espécies, sendo muitas delas componentes da dieta humana, como a casca da uva (50-100µg/g), a amora e o amendoim<sup>55-57</sup>. O RSV também foi detectado em outras fontes naturais em concentrações maiores do que na uva, como por exemplo na raiz seca de ruibarbo (*Rheum rhaponticum*) (3,9 mg/g) e *Polygonum cuspidatum* (0,524 mg/g), planta utilizada na medicina tradicional Chinesa e Japonesa<sup>58</sup>.

Nos últimos anos o interesse pela bioatividade da molécula de RSV aumentou de forma significativa, o que despertou a atenção da comunidade científica. De acordo com a pesquisa de Jang e colaboradores (1997)<sup>57</sup>, o RSV foi responsável por inibir eventos celulares associados à iniciação, à promoção e à progressão tumoral. Desde então é conhecido o amplo espectro de ação desta molécula, e diversos dados da literatura têm expressado os efeitos farmacológicos do RSV, como aqueles relacionados a propriedades

antiinflamatórias, modulação do metabolismo de lipídeos, prevenção de doenças cardiovasculares e do câncer, sendo considerado portanto uma molécula promissora<sup>58-60</sup>.



**Fig 2.** Estruturas dos derivados de resveratrol

Outro efeito benéfico relacionado ao RSV está associado ao paradoxo francês. Este é um termo utilizado para descrever o fato de que franceses apresentam baixo risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, embora desfrutem de dieta rica em gorduras saturadas. A baixa prevalência de doenças cardíacas nesta população é creditada ao consumo regular de vinho tinto. Sabe-se que o vinho e outros derivados da uva possuem altas concentrações de RSV. Desta forma, caracterizam-se como foco de diversos estudos por diminuírem a agregação plaquetária, promoverem vasodilatação, supressão da aterosclerose, redução da peroxidação lipídica e melhora nos parâmetros de colesterol e triglicérides<sup>58</sup>.

A despeito dos eventos metabólicos, após sua ingestão oral o RSV atinge a concentração plasmática máxima em aproximadamente 10 minutos, apresentando uma meia vida de 60 minutos<sup>61</sup>. Com relação à toxicidade do RSV, alguns ensaios pré-clínicos têm sido realizados a fim de determinar o metabolismo e o perfil de toxicidade do composto. Até o momento, nenhum estudo de fase I que utilizasse a dosagem terapêutica em animais atribuiu toxicidade clínica ao RSV. Juan *et al.* (2002), em modelo *in vivo* com ratos, administraram 20 mg/kg/peso de RSV, durante 28 dias. Neste período, não foram observados efeitos colaterais relacionados ao tratamento<sup>62</sup>. Em um estudo similar, Crowell *et al.* (2004) demonstraram que a administração oral de 3000 mg/kg/dia de RSV pode causar nefrotoxicidade sem causar nenhuma evidência de hepatotoxicidade<sup>63</sup>. Além disto, Willians *et al.* (2009) demonstraram que o RSV não produziu nenhuma irritação oftálmica ou dermatológica em coelhos<sup>64</sup>.

De interesse, inúmeros estudos *in vivo* têm descrito o efeito hepatoprotetor do RSV. Dados recentes apontam o efeito protetor do RSV sobre a hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos. Foi demonstrado que o dano oxidativo e o acúmulo de neutrófilos nos tecidos, resultantes da toxicidade do acetaminofeno, foram notoriamente inibidos pelo RSV<sup>65, 66</sup>. Além disto, o RSV também se mostrou capaz de prevenir a hepatotoxicidade causada pelo etanol. Em modelos *in vivo*, a administração crônica de etanol produz toxicidade, perda de peso e anorexia e induz hepatotoxicidade. Diversos modelos de hepatotoxicidade por etanol demonstraram que na dieta suplementada com RSV estes efeitos adversos são minimizados, uma vez que o composto inibe a peroxidação lipídica e melhora a atividade de enzimas anti-oxidantes<sup>67-70</sup>. Modelos de hepatotoxicidade com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) demonstraram que o

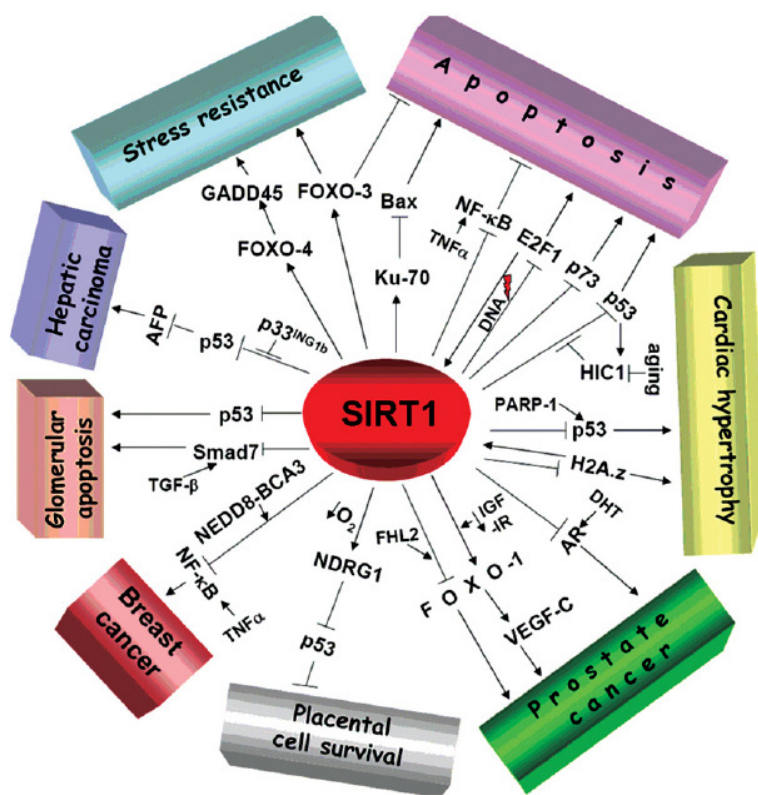
RSV impediu desordens mitocondriais a nível de bicamada lipídica, evento provavelmente mediado por suas propriedades anti-oxidantes e antiinflamatórias<sup>71</sup>. Outros estudos comprovaram que o RSV reduziu a mortalidade em modelos de isquemia-reperfusão hepática e hepatectomia parcial em ratos<sup>72-74</sup>. Entretanto, até o momento não há estudos disponíveis acerca dos possíveis efeitos do RSV sobre a hepatotoxicidade causada por agentes tuberculostáticos.

O mecanismo de ação do RSV ainda não é claro. Uma das hipóteses proposta pela comunidade científica é de que o RSV caracteriza-se como um importante ativador de sirtuínas (SIRTs). As SIRTs, amplamente distribuídas e conservadas, pertencem à grande família das histonas deacetilases (HDACs) de classe III, por possuírem homologia com o repressor transcricional de leveduras *SIR2* e por apresentarem atividade NAD<sup>+</sup>-dependente<sup>75-77</sup>. O gene da *SIR2* da levedura *S. cerevisiae* foi identificado e descrito por Klar *et al.* (1979) como *MAR1* (*mating type regulator 1*) por influenciar o controle de silenciamento transcricional *locus* específico. Subseqüentemente, outros quatro genes foram relacionados a este e identificados como reguladores de silenciamento de informação (SIR 1, 2, 3 e 4)<sup>78</sup>.

A partir da descoberta de *SIR2* em *S. cerevisiae*, homólogos em outros organismos também foram identificados e caracterizados como membros da grande família das SIRTs<sup>79, 80</sup>. Outros microorganismos codificam apenas uma SIRT, enquanto os eucariotos possuem múltiplas SIRTs. Em mamíferos, esta família apresenta sete membros (SIRT1-7) onde, cada um deles é caracterizado por um domínio catalítico com seqüência conservada de 275 aminoácidos e também por uma seqüência adicional N e/ou C-terminal única e de comprimento variável<sup>81, 82</sup>. Além de serem divididas em quatro

diferentes classes, baseadas no seu domínio central, estas enzimas também diferem em sua localização sub-celular: SIRT1, SIRT6 e SIRT7 encontram-se predominantemente no núcleo; SIRT2 reside no citoplasma; e SIRT3, SIRT4 e SIRT5 têm sido descritas como SIRTs mitocondriais<sup>79, 83</sup>.

A SIRT1 – a qual apresenta a melhor caracterização – localiza-se no cromossomo 10 e é homóloga ao gene *SIR2* em leveduras. SIRT1 é uma deacetilase nuclear cujos substratos incluem proteínas primariamente, mas não exclusivamente, envolvidas na regulação transcricional. Esta enzima influencia diversos aspectos da fisiologia, tais como diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular<sup>84, 85</sup>. Seu potencial envolve a regulação da estrutura da cromatina e transcrição gênica, ativação ou supressão da proteína p53, processos apoptóticos, reparo de DNA, regulação de vias pró-inflamatórias e regulação do metabolismo de lipídeos (Figura 3)<sup>79</sup>. No fígado, a SIRT1 parece ter um importante papel na regulação da via glicolítica e na gliconeogênese através da deacetilação do PPAR- $\gamma$ , um coativador de PGC-1 $\alpha$ . Entretanto, PGC-1 $\alpha$  ativa genes envolvidos não só na gliconeogênese, como também na biogênese mitocondrial, na oxidação de ácidos graxos e na respiração. Portanto, a regulação de PGC-1 $\alpha$  por SIRT1 pode influenciar a homeostase de glicose e lipídeos<sup>86, 87</sup>. Com relação à proteção hepática, SIRT1 apresenta um papel importante na modulação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ <sup>88, 89</sup>. Purushotham *et al.* (2009)<sup>90</sup> demonstraram que a deleção do gene SIRT1 resulta em alteração do metabolismo de ácidos graxos, o que gera esteatose hepática e inflamação. Neste contexto, estudos recentes revelaram que o aumento da expressão de SIRT1 apresenta efeito protetor com relação à inflamação, esteatose hepática e intolerância à glicose<sup>91, 92</sup>.



**Fig 3.** Processos celulares ativados pela proteína sirtuína (adaptado de Michan & Sinclair, 2007)

Em resumo, as SIRT1s influenciam diversos processos fisiológicos, que incluem a regulação da expectativa de vida, da atividade metabólica e enzimática, a resposta celular ao estresse, à neurodegeneração, ao reparo de DNA, ao controle de proliferação celular e à apoptose<sup>77, 93, 94</sup>. Atualmente as SIRT1s são alvos importantes de pesquisas relacionadas a restrição calórica, câncer, doenças neurodegenerativas, inflamação e obesidade.

O panorama epidemiológico descrito, associado ao fato de que há mais de quatro décadas não ocorre a introdução de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da TB, evidencia a necessidade de se desenvolverem novas opções terapêuticas, que possam reduzir a toxicidade e a duração do tratamento atual e, conseqüentemente, os custos totais da terapia. A identificação de agentes capazes de diminuir a toxicidade associada à



terapia atual anti-TB, são questões de grande importância na atualidade. Deste modo, investigações acerca do RSV são necessárias para estabelecer o potencial deste composto na prevenção e/ou na reversão da hepatotoxicidade causada pelos fármacos utilizados no tratamento contra TB.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-tuberculose em camundongos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Avaliar os efeitos do RSV sobre as alterações histopatológicas no fígado de camundongos tratados com INH + RIF;

**2.2.2** Analisar os efeitos do RSV com relação aos níveis séricos de aspartato aminotransferases (AST) e alanina aminotransferase (ALT);

**2.2.3** Investigar os efeitos do tratamento com RSV sobre a produção hepática de radicais livres;

**2.2.4** Verificar os efeitos do RSV sobre a atividade da mieloperoxidase no fígado de animais tratados com INH + RIF;

**2.2.5** Avaliar os efeitos do RSV sobre os níveis das citocinas – IL-6, IL-10, IL12p70, MCP-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , no fígado de camundongos tratados com INH+RIF

**2.2.6** Avaliar os efeitos da INH e RIF sobre a expressão das enzimas CYP2E1, CYP1A1, PPAR- $\gamma$ , PGC1- $\alpha$  e Nampt – bem como, avaliar os possíveis efeitos do RSV sobre a expressão de mRNA destas enzimas;

**2.2.7** Avaliar os efeitos do RSV sobre expressão de mRNA das SIRT1-7

### **3. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL**

Este manuscrito foi submetido para a revista **Journal of Hepatology**, com índice de impacto 7,818.

Título: Protective Effects of Resveratrol on Hepatotoxicity Induced by Isoniazid and Rifampicin via modulation of Sirtuins and Cytochrome P450 System

**Protective Effects of Resveratrol on Hepatotoxicity Induced by Isoniazid and Rifampicin via Modulation of Sirtuins and Cytochrome P450 System**

Natália F. Nicoletti<sup>1,2</sup>, André A. dos Santos Jr<sup>1,2</sup>, Valnês Rodrigues-Jr<sup>1,3</sup>, Carlos E. Leite<sup>4</sup>, Maria M. Campos<sup>4,5</sup>, Ana C. O. Dias<sup>1</sup>, Eraldo L. Batista Jr.<sup>1,5</sup>, Luiz A. Basso<sup>1,2</sup>, Diógenes S. Santos<sup>1,2</sup>, André A. Souto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, <sup>4</sup>Instituto de Toxicologia, <sup>5</sup>Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, RS.

**Corresponding Author:** Dr. André A. Souto, Corresponding authors at: Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose(INCT-TB), Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av.Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Predio 92-A, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil. Fax:+55 51 33203629.; E-mail: [arigony@pucrs.br](mailto:arigony@pucrs.br)

**Number of Figures:** 05; **Number of Tables:** 00

**Financial Support:** This work was supported by the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (DECIT/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES) and the Millennium Initiative Program (CNPq) to D.S.S. and L.A.B. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), and M.M.C. (CNPq, 306836/2007-6) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). D.S. S. also acknowledges a grant awarded by BNDES. N.F.N acknowledges an MSc scholarship awarded by CNPq (Ed152008 INCTs DI FB).

## List of Abbreviations

TB, tuberculosis; INH, isoniazid; RIF, rifampicin; CYP450, cytochrome P450; CYP2E1, cytochrome P450 2E1; CYP1A1, cytochrome P450 1A1; RSV, resveratrol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GSH, glutathione; DTNB, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid); CAT, catalase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hydrogen peroxide; MPO, myeloperoxidase; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor $\alpha$ ; IL-12p70, interleukin-12p70; SIRT1, sirtuin 1; SIRT2, sirtuin 2; SIRT3, sirtuin 3; SIRT4, sirtuin 4; SIRT5, sirtuin 5; SIRT6, sirtuin 6; SIRT7, sirtuin 7; PPAR- $\gamma$ , Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ ; PGC1- $\alpha$ , Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; CCL<sub>4</sub>, carbon tetrachloride.

## ABSTRACT

**Background/Aims:** Isoniazid (INH) and Rifampicin (RIF) are the first-line drugs used for tuberculosis (TB) treatment. Hepatotoxicity induced by anti-TB drugs leads to substantial morbidity, diminishing treatment effectiveness. Herein, we have investigated the effects of resveratrol (RSV) in the hepatotoxicity caused by INH-RIF in mice.

**Methods:** Acute (3 days) or chronic liver injury (28 days) was induced in male BALB/c mice by co-administering INH and RIF. RSV was dosed 30 min prior to INH-RIF. Serum biochemical tests, liver histopathological examination, oxidative stress, MPO activity, cytokine production (TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IL-10), and mRNA expression of CYP2E1, SIRT1-1 and 7, and PPAR- $\gamma$ /PGC1- $\alpha$  were evaluated.

**Results:** Acute or chronic treatment with INH plus RIF induced hepatotoxicity in mice. RSV significantly decreased ALT and AST levels, MPO activity and cytokine levels. Furthermore, RSV reverted the decrease of both catalase and glutathione activities, and ameliorated the histopathological alterations associated to anti-TB drugs. Modulation of CYP2E1, SIRT1 and SIRT7, and PPAR- $\gamma$ /PGC1- $\alpha$  expression is likely involved in the protective effects of RSV.

**Conclusions:** Data shows that RSV was able to largely prevent the hepatotoxicity induced by INH and RIF in mice, mainly by modulating SIRT1, SIRT7 and CYP2E1 mRNA expression. RSV might well represent a useful strategy in the treatment of livers failures due to INH-RIF-induced toxicity.

**Keywords:** resveratrol, anti-TB drugs, hepatotoxicity, sirtuins, cytochrome P450 system.

## 1. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major cause of death from a curable infectious disease. About 9.4 million new TB cases occurred in 2009, and 1.7 million people died from TB during that year [44]. The recommended treatment for TB precompiled by the World Health Organization is a regimen of isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamide and ethambutol for 2 months, followed by 4 months of INH and RIF.

The bioactive metabolites of INH generated by the drug-metabolizing enzymes, especially the cytochrome P450 (CYP) 2E1 and 1A1 isoforms, have been implicated in INH-induced hepatotoxicity in humans [17, 51]. The co-administration of RIF is associated to a increase of INH-evoked hepatotoxicity, due to CYP450 induction [49]. Up to 20% of patients taking anti-TB drugs experience hepatic injury, and mortality in such cases is not rare [8, 15]. Importantly, the hepatotoxicity evoked by anti-TB drugs diminishes treatment effectiveness, contributing to non-adherence, and emergence of drug-resistant *M. tuberculosis* strains [40].

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene, RSV) is a natural polyphenol found in a wide variety of plants including grapes, berries and peanuts [38]. RSV has been demonstrated to display protective effects in cardiovascular diseases, cancer, inflammatory diseases, and disturbs of lipid metabolism, possibly due to antioxidant properties and protective effects against DNA damage [5, 6].

Several *in vivo* studies have demonstrated hepatoprotective effects of RSV in animal models of hepatic insult [6]. Recent data pointed out a protective action for RSV in acetaminophen-induced liver failure in mice [36]. RSV has been found to afford

protection against liver damage induced by ethanol [2, 20]. Additionally, RSV reduced mortality and liver damage induced by ischaemia-reperfusion injury [14], transplants and surgical procedures [21, 47]. Accordingly, this study was designed to evaluate, for the first time, the effects of RSV on the hepatotoxicity caused by INH and RIF in mice, and explored the potential molecular mechanisms of action of RSV. We hypothesized that CYP2E1/1A1, SIRT1-7, PPAR- $\gamma$ , PGC1- $\alpha$  and Nampt mRNA expression, and inflammatory cytokines might represent essential regulatory mechanisms.



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals

RSV was purchased from Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brazil). INH was obtained from Acros Organics (New Jersey, USA) and RIF was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All other chemicals are from standard commercial suppliers, having analytical grade quality.

### 2.2. Experimental design

All the experimental protocols were approved by the local Animal Ethics Committee (09/00107). Male BALB/c mice (25 – 30 g; 6 animals/group) were used. Animals were fed with standard chow diet and water *ad libitum*. Both acute and chronic protocols of INH-RIF hepatotoxicity were assessed. The animals were distributed into the following groups: (i) control, (ii) RSV-treated control, (iii) INH-RIF, and (iv) RSV-treated + INH-RIF. In the acute protocol, liver damage was induced by dosing INH (50 mg/kg) and RIF (100 mg/kg), dissolved in a 1% DMSO solution in saline, administered orally, for three consecutive days. RSV (100 mg/kg) was dosed by oral route, 30 min prior to INH-RIF administration, and 2 times daily, each 6 h, until the third day after hepatotoxicity induction. In the chronic protocol, mice were treated with INH (25 mg/kg) and RIF (50 mg/kg) once a day, for 28 consecutive days, and RSV (50 mg/kg) was administered during all the period. In both schedules of treatment, mice were sacrificed 24 h after the last dose of INH-RIF to collect blood and liver tissue. The samples were stored at -80°C.

### ***2.3. Biochemical analysis***

To assess liver function, serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were determined by using AST and ALT commercial kits (Labtest, Brasil).

### ***2.4. Glutathione and catalase assays***

The liver was rinsed in ice-cold saline, minced and a 10% homogenate was prepared in saline. The sample was centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the supernatant was used for the oxidative stress determination. Reduced glutathione (GSH) levels were determined by using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), according to the method described by Shim (2010) [37]. Catalase (CAT) activity was assessed according to the method described by Aebi (1984) [1], with slight modifications.

### ***2.5. Myeloperoxidase activity***

Neutrophil recruitment to the liver was quantified indirectly by determining tissue myeloperoxidase (MPO) activity, according to the method described by Paszcuk et al. (2008) [30].

### ***2.6. Histological preparation and analysis***

Samples of liver tissue were fixed in 10% formaldehyde and processed for embedding in paraffin. Paraffin sections (4 µm) were stained with hematoxylin and eosin

and examined with Zeiss Axiolmager M2 Light microscope (Carl Zeiss, Germany), by an experienced pathologist blinded to the experimental groups.

### **2.7. *NAD<sup>+</sup>/NADH assay***

NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations were measured using a commercial kit (BioChain, USA), according to the manufacturer's recommendations. The intensity of the reduced product color was measured at 565 nm, which is proportional to the NAD<sup>+</sup>/NADH concentration in the sample.

### **2.8. *Detection of cytokines***

The homogenized tissue samples were analyzed using a flow cytometer (FACSCanto II, Becton Dickinson Biosciences, USA) with a 488 nm laser and fitted with a high throughput sampler (HTS). The BD CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) was used to determine the protein levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-12p70 (IL-12p70). Sample data were acquired using BD FACSDiva V6.1.3 (BD Biosciences), and experimental data were analyzed using FCAPArray v1.0.1 (BD Biosciences/Soft Flow Hungary Ltd.) analysis software. The results are expressed in pg/ml.

### **2.9. *Real-time PCR***

Total RNA was extracted from liver tissue using RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN, Germany), according to the manufacturer's protocols. The conversion of total

RNA to cDNA was carried out using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA) with random primers, and 60 ng of total RNA. Real Time PCR was performed using 180 ng cDNA, and amplified using a thermocycler (AB 7500 Applied Biosystems, USA). The Taqman probes (Assays-on-Demand, Applied Biosystems, USA) were Mm00491127\_m1 (mouse CYP2E1), Mm00487218\_m1 (mouse CYP1A1), Mm01168521\_m1 (mouse SIRT1), Mm01149210\_m1 (mouse SIRT2), Mm00452129\_m1 (mouse SIRT3), Mm01201917\_m1 (mouse SIRT4), Mm0066372\_m1 (mouse SIRT5), Mm01149042\_m1 (mouse SIRT6), Mm00461895\_m1 (mouse SIRT7), Mm01184322\_m1 (mouse PPAR- $\gamma$ ), Mm00731216\_m1 (mouse PGC1- $\alpha$ ) and Mm00451938\_m1 (mouse Nampt). Probe for Mm4352932 (mouse GAPDH 20x) was used as an endogenous control. Reactions were run in duplicate. Gene expression values were calculated based on the  $2^{\Delta\Delta C}$  relative expression method [25].

### ***2.10. Statistical analysis***

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was carried out by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' test (GarphPad Prism 5.0, USA). Data was compared. Values of  $p < 0.05$  were regarded as significant.

### 3. RESULTS

Serum AST and ALT levels were determined as an indicative of hepatic function. The levels of AST e ALT were significantly higher in the INH-RIF groups ( $109 \pm 6$  and  $51 \pm 5$  U/ml), when compared to the control groups ( $62 \pm 3$  and  $26 \pm 4$  U/ml), in either the acute or the chronic schedules of hepatic injury induction, correspondingly. The administration of RSV significantly decreased AST and ALT levels ( $36 \pm 8$  % and  $58 \pm 4$  %, respectively), as assessed in the acute protocol. Likewise, the long-term treatment with RSV also produced a significant inhibition of AST and ALT levels ( $30 \pm 4$  % and  $49 \pm 12$  %, respectively), in the chronic protocol of INH-RIF-induced hepatotoxicity (Figure 1).

We have also evaluated the relevance of anti-oxidant systems in the effects of RSV. Figure 2A and B indicates that both GSH and CAT levels in the liver were significantly decreased after INH-RIF administration ( $1.5 \pm 0.3$  and  $8 \pm 0.7$  mmol/mg protein), when compared to the control group ( $2.9 \pm 0.2$  and  $14 \pm 0.9$  mmol/mg protein), according to assessment in the acute and chronic protocols, respectively. Pre-treating mice with RSV significantly reversed INH-RIF-induced GSH depletion and reduced CAT activity ( $89 \pm 15$  % and  $96 \pm 21$  %), respectively, in either schedules of administration.

Neutrophil infiltration is an important hallmark of the inflammatory process. Hepatic MPO activity was significantly increased in the INH-RIF groups ( $0.2 \pm 0.008$  and  $0.2 \pm 0.007$  OD/mg tissue), as compared to the control groups ( $0.1 \pm 0.003$  and  $0.1 \pm 0.003$  OD/mg tissue). Interestingly, RSV treatment significantly reversed this effect ( $19 \pm 2.8$  and  $20 \pm 3$  %), in both the acute and the chronic schedules of treatment (Figure 2C).

Liver histological analysis revealed micro-vesicular steatosis and increased apoptosis in the INH-RIF-treated animals. Conversely, fatty accumulation was rarely observed in livers of control animals or in mice treated with RSV alone. Noteworthy, the treatment with RSV was able to completely prevent hepatic lesion induced by either acute or chronic INH-RIF administration (Figure 3).

Liver injury commonly involves the generation of some inflammatory mediators. In our experimental paradigm, the administration of INH-RIF evoked a marked increase in the levels of TNF $\alpha$ , IL-12p70 and IL-10. Notably, the treatment with RSV almost abolished the production of these cytokines. Nevertheless, the levels of IL-6 and MCP-1 were not significantly different among the groups, whereas IFN $\gamma$  was undetectable in all the samples (Figure 4).

Previous evidence suggests that CYP2E1 is clinically associated with INH-RIF-induced liver injury. Hepatic CYP2E1 mRNA expression was found significantly increased in both acute and long-term schemes of treatment with INH-RIF. Strikingly, the administration of RSV was able to significantly prevent the upregulation of CYP2E1 in liver samples (Figure 5A), when assessed in either protocols.

Sirtuins (SIRT) constitute a family of regulatory molecules (SIRT1 to SIRT7), which have been pointed out as RSV targets. Data on Figure 5B shows that SIRT1 mRNA expression was significantly increased in the groups that had been acutely or chronically treated with RSV, when compared to the groups that received only INH-RIF. A similar increase of SIRT7 mRNA expression was observed following the long-term treatment with RSV (Figure 5C), while its expression was not significantly altered in the acute

protocol. Furthermore, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5 and SIRT6 mRNA expression remained unchanged in all evaluated groups (results not shown).

Transcriptional factor PGC1- $\alpha$  and its co-activator PPAR- $\gamma$  are likely implicated in fatty acid oxidation and steatosis. In the acute protocol, the administration of INH-RIF caused a significant increase of hepatic PPAR- $\gamma$  mRNA expression, and this rise was virtually reverted by RSV. On the other hand, in the chronic scheme of treatment, PPAR- $\gamma$  mRNA expression was found significantly increased in RSV groups, when compared to INH-RIF groups (Figure 5D). Furthermore, the expression of PGC1- $\alpha$  mRNA was significantly reduced by RSV administration in the acute group of treatment (Figure 5E), whereas its levels remained unaffected in the chronic group (results not shown).

Regarding the mRNA expression of Nampt, or NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations, no significant difference among the experimental groups was observed, either in acute or chronic protocols of treatment (results not shown).

#### 4. DISCUSSION

The co-administration of INH and RIF for the chemoprophylaxis and treatment of tuberculosis has been largely associated to severe hepatotoxicity [45]. Here, we demonstrate the protective effects of RSV, in the hepatotoxicity caused by INH-RIF in mice. Furthermore, we have assessed whether the beneficial actions of RSV might involve the modulation of inflammatory markers, sirtuins, and CYP450 enzymes.

The effects of RSV were assessed in two protocols, involving the acute (3 days), and the chronic (28 days) administration of INH-RIF. In both schedules, INH-RIF treatment caused a significant increase in the serum levels of transaminases AST and ALT, and oxidative damage of the liver tissue, as evidenced by a marked decrease in the antioxidant enzymatic systems GSH and CAT. Moreover, liver oxidative injury was accompanied by neutrophil accumulation, as demonstrated by high tissue MPO activity. Of note, this series of hepatic alterations were significantly reverted by RSV. Analyzed together these results suggest that antioxidant and free-radical scavenging activities of RSV involve the modulation of neutrophil influx to the liver. Our results are in accordance with several previous reports [10, 14, 20, 36] showing that RSV is a free radical scavenger and a potent antioxidant, due to its ability of activating a variety of antioxidants enzymes [18, 29].

Histological observations support biochemical findings, as they clearly show morphological alterations related to fatty accumulation and increased apoptosis in INH-RIF-treated groups. In addition, as previously demonstrated by other studies using different hepatotoxins, such as acetaminophen [36], methotrexate [41], ethanol [2, 20],



cadmium [10] and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) [37], RSV treatment was able to almost completely prevent development of INH-RIF liver steatosis.

Both clinical and experimental studies have shown that noxious events in liver are preceded by infiltration of inflammatory cells, which in turn secrete cytokines [24]. The aforementioned studies on RSV actions [16, 26, 36] demonstrate anti-inflammatory effects, as evidenced by decreased production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12p7, allied to an increase of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10. In our study, INH-RIF administration resulted in increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IL-10, an effect that was abolished by RSV. TNF- $\alpha$  and IL-12 are pro-inflammatory cytokines, which have been previously correlated with liver injury elicited by several chemical agents, such as ethanol [2, 20], CCl<sub>4</sub> [37] and acetaminophen [36]. Otherwise, development of hepatotoxicity has been correlated to decreased levels of IL-10. The decrease of IL-10 in the livers of RSV-treated animals was unexpected, since most investigations suggest that RSV leads to IL-10 upregulation [19, 33, 39]. Otherwise, a pancreatitis model induced by caerulein in rats revealed that RSV used alone did not produce any significant alteration of IL-10 levels [43]. It is feasible that RSV may change the requirement for an endogenous anti-inflammatory cytokine as IL-10, obviating its absolute need for the resolution of the process and protection of the organ.

Numerous studies have shown that RSV might also regulate the expression of phase I and phase II xenobiotic metabolizing enzymes. Earlier literature data suggests that CYP450 enzymes are associated to development of INH-RIF-induced hepatotoxicity, particularly the CYP2E1 and CYP1A1 isoforms [17, 40, 52]. The initial biochemical and metabolic events implicated in the toxicity of INH have been well described, and are

likely related to the metabolic conversion of INH to a highly reactive intermediate, namely hydrazine [40, 51, 52]. Moreover, it has been previously demonstrated that RIF administration is able to aggravate INH-induced toxicity in hepatocytes, through CYP2E1 induction [34, 49]. In this study, RSV largely prevented CYP2E1 mRNA upregulation in liver samples of INH-RIF-treated mice, indicating that RSV is able to modulate CYP2E1 expression at the transcriptional level. Therefore, the hepatoprotective effects observed for RSV might depend, at least in part, on the modulation of CYP2E1 expression, consequently preventing the formation of toxic metabolites.

Sirtuins constitute a highly conserved family of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases, which have been implicated in several biological processes, such as transcription, apoptosis, metabolism, and aging [7, 22]. The modulation of sirtuin expression has been suggested as one of the main mechanisms mediating RSV effects [4, 22]. Thus, we investigated how the expression of these proteins might be modified in our experimental protocol. Recent evidence suggests that oxidative stress downregulates SIRT1 expression by triggering SIRT1 mRNA decay, and by reducing SIRT1 protein levels [13, 46]. Accordingly, we show that either the acute or the long-term treatment with INH-RIF led to a marked reduction of SIRT1 mRNA expression in liver, which were almost completely restored by RSV. Therefore, SIRT1 appears to represent one of the main targets of RSV, accounting for its protective effects against hepatotoxicity induced by anti-TB drugs. These pieces of evidence confirm previous literature data indicating the ability of RSV in modulating SIRT1 expression in different biological systems [4, 22].

Concerning inflammation, the role of SIRT1 remains poorly understood. Some pieces of evidence show that SIRT1 knockdown led to an increase of inflammatory gene

expression [48, 50]. Furthermore, hepatic-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism, resulting in hepatic steatosis and inflammation [32]. Additionally, recent studies demonstrated that overexpression of SIRT1 resulted in a protective effect against high-fat induced steatosis and glucose intolerance [3, 31].

It has been recently shown that SIRT7 plays an important role in preventing progressive functional deterioration of heart, and in several cancer types [27, 35, 42]. We demonstrate herein that SIRT7 could play a protective role in liver tissue, as SIRT7 mRNA expression was found diminished in INH-RIF-treated groups, whereas RSV treatment was able to revert this effect. Therefore, we believe that SIRT7 might be crucial for maintaining normal liver functions. Literature data suggests that an imbalance of SIRT1 and SIRT7 expression might result in exaggerated stress responses causing multiple types of damage, what probably involves deacetylation reactions [42].

Recently, it was found that SIRT1 regulates the activity of histone and non-histone proteins such as the PPAR- $\gamma$  receptor and its coactivator PGC1- $\alpha$  [23]. In liver, SIRT1 has been shown to control the glycolytic pathway through the transcriptional coactivator PGC1- $\alpha$ , while PPAR- $\gamma$  has been proposed as an important target for hepatic steatosis. In our study, we show that INH-RIF increased PGC1- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  mRNA levels, while RSV treatment was able to recover the normal levels. This data are somewhat different from recent studies demonstrating that chronic ethanol feeding of mice led to decreased PGC1- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  expression [11, 28]. A few earlier studies demonstrated an increase in PPAR $\gamma$ -ubiquitin conjugate formation in presence of RSV [12]. Interestingly, the chronic protocol showed an augmentation of PPAR- $\gamma$  mRNA levels in RSV groups, that

is in agreement with earlier literature studies [11, 28]. Therefore, we might suggest that long-term activation of PPAR $\gamma$  is likely dependent on regulation of sirtuins by RSV.

NAD<sup>+</sup> is a necessary co-substrate for deacetylase activity of sirtuins [22]. Changes in the expression of Nampt, an enzyme involved in the salvaging of NAD<sup>+</sup> from nicotinamide, lead to significant alterations of SIRT1 activity [9]. In our study, no significant difference of Nampt mRNA expression, or both NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations was observed. Thus, these pathways do not seem to be relevant for RSV effects, at least in our experimental paradigm.

Altogether, our results demonstrate, for the first time, that treatment with RSV was able to prevent the hepatotoxicity induced by INH-RIF. The protective effects of RSV can be mostly attributed to the modulation of SIRT1 and SIRT7, as well as PGC1- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  mRNA expression. Furthermore, downregulation of CYP2E1 might be also involved in the effects of RSV, while the Nampt mRNA expression and NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations remained unaffected. RSV might well represent a useful strategy in the treatment of liver failures due to INH-RIF-induced toxicity.

## 5. REFERENCES

- [1] Aebi H. Catalase. *Methods Enzymol* 1984;105: 121-126.
- [2] Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295(4): G833-842.
- [3] Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L, et al. Sirt1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008;8(4): 333-341.
- [4] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;444(7117): 337-342.
- [5] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(6): 493-506.
- [6] Bishayee A, Darvesh AS, Politis T, McGory R. Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community. *Liver Int* 2010;30(8): 1103-1114.
- [7] Chaudhary N, Pfluger PT. Metabolic benefits from Sirt1 and Sirt1 activators. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12(4): 431-437.
- [8] Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CS, Nam MH, Kim JW, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2007;87(8): 551-556.
- [9] Dominy JEJ, Lee Y, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Nutrient-dependent regulation of PGC-1alpha's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804(8): 1676-1683.
- [10] Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. Comparative study of natural antioxidants - curcumin, resveratrol and melatonin - in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 2006;225: 150-156.
- [11] Fischer M, You M, Matsumoto M, Crabb DW. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist treatment reverses PPARalpha dysfunction and abnormalities in hepatic lipid metabolism in ethanol-fed mice. *J Biol Chem* 2003;278(30): 27997-28004.

- [12] Floyd ZE, Wang ZQ, Kilroy G, Cefalu WT. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol. *Metabolism* 2008;57: 32-38.
- [13] Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD<sup>+</sup> depletion. *Cell Physiol Biochem* 2007;20(1-4): 45-54.
- [14] Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14(46): 7101-7106.
- [15] Haroon M, Martin U, Devlin J. High incidence of intolerance to tuberculosis chemoprophylaxis. *Rheumatol Int* 2010;Epub ahead of print.
- [16] Hassan-Khabbar S, Vamy M, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Savouret JF, et al. Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver. *Biochimie* 2010;92(4): 405-410.
- [17] Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, et al. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003;37: 924-930.
- [18] Ignatowicz E, Baer-Dubowska W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol* 2001;53: 557-569.
- [19] Imler TJJ, Petro TM. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4(-) IFN-gamma+ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. *Int Immunopharmacol* 2009;9(1): 134-143.
- [20] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007;80(11): 1033-1039.
- [21] Kirimlioglu V, Karakayali H, Turkoglu S, Haberal M. Effect of resveratrol on oxidative stress enzymes in rats subject to 70% partial hepatectomy. *Transplant Proc* 2008;40(1): 293-296.
- [22] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006;127(6): 1109-1122.

- [23] Lieber CS, Leo MA, Wang X, Decarli LM. Effect of chronic alcohol consumption on Hepatic SIRT1 and PGC-1alpha in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370(1): 44-48.
- [24] Lin HI, Chu SJ, Wang D, Feng NH. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37: 8-15.
- [25] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2010;25(4): 402-408.
- [26] Masubuchi Y, Sugiyama S, Horie T. Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact* 2009;179(2-3): 273-279.
- [27] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007;404(1): 1-13.
- [28] Nakajima T, Kamijo Y, Tanaka N, Sugiyama E, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against alcohol-induced liver damage. *Hepatology* 2004;40(4): 972-980.
- [29] Parvaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003;17: 1975-1985.
- [30] Paszcuk AF, Quintão NLM, Fernandes ES, Juliano L, Chapman K, Andrade-Gordon P, et al. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. *Eur J Pharmacol* 2008;581(1-2): 204-215.
- [31] Pfluge PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(28): 9793-9798.
- [32] Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab* 2009;9(4): 327-338.
- [33] Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2010;633(1-3): 78-84.
- [34] Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, et al. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(8): 935-952.

- [35] Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 2006;75: 435-465.
- [36] Sener G, Toklu HZ, Sehirli AO, Velioglu-Ogünç A, Cetinel S, Gedik N. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepato Res* 2006;35(1): 62-68.
- [37] Shim J, Kim M, Kim H, Ahn J, Yun Y, Song J. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;242(3): 318-325.
- [38] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 1997;30(2): 91-113.
- [39] Svajger U, Obermajer N, Jeras M. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology* 2010;129(4): 525-535.
- [40] Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, Lange WCM, Van der Ven AJAM, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Consise up-to-date review. *Gastroenterol Hepatol* 2008;23: 192-202.
- [41] Tunali-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G. Resveratrol Protects Against Methotrexate-Induced Hepatic Injury in Rats. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2010;13(2): 303-310.
- [42] Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res* 2008;28(10): 703-710.
- [43] Warzecha Z, Dembiński A, Ceranowicz P, Konturek S, Tomaszewska R, Stachura J, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 reduces the protective effect of hepatocyte growth factor in experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2004;486(1): 107-119.
- [44] WHO. Multidrug and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: 2010 Global Report on Surveillance and Response. World Health Organization Report 2010;Geneva | Washington DC
- [45] Wong WM, Wu PC, Yuen MF, Cheng CC, Yew WW, Wong PC. Anti-tuberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2000;31: 201-206.
- [46] Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Oxidative stress modulates Sir2alpha in rat hippocampus and cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 2006;23(10): 2573-2580.



- [47] Wu S, Yu L, Meng K, Ma Z, Pan C. Resveratrol prolongs allograft survival after liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(30): 4745-4749.
- [48] Yang Z, Kahn BB, Shi H, Xue BZ. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *J Biol Chem* 2010;285(25): 19051-19059.
- [49] Yew WW, Leung CC. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology* 2006;11(6): 699-707.
- [50] Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, Bae EJ, et al. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(3): 419-428.
- [51] Yue J, Peng R, Chen J, Liu Y, Dong G. Effects of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. *Pharmacol Res* 2009;59(2): 112-119.
- [52] Yue J, Peng RX, Yang J, R. K, Liu J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats *Act Pharmacol Sin* 2004;25: 699-704.

## 6. FIGURE LEGENDS

**Figure 1. AST and ALT serum levels.** Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in (A) acute INH (50 mg/kg), RIF (100 mg/kg), RSV (100 mg/kg) and (B) chronic INH (25 mg/kg), RIF (50 mg/kg), RSV (50 mg/kg) protocols of treatment. Each column represents the mean of 6 animals and the vertical lines show the S.E.M.. \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.01$  denote the significance levels in comparison to INH-RIF values; +++  $p < 0.0001$ , +  $p < 0.01$  denote the significance levels in comparison to control values.

**Figure 2. CAT, GSH and MPO levels.** (A) Catalase (CAT), (B) glutathione (GSH), (C) myeloperoxidase (MPO) levels in liver tissue samples levels in acute INH (50 mg/kg), RIF (100 mg/kg), RSV (100 mg/kg) and chronic INH (25 mg/kg), RIF (50 mg/kg), RSV (50 mg/kg) protocols of treatment. Each column represents the mean of 6 animals and the vertical lines show the S.E.M.. \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.002$ , \*  $p < 0.007$  denote the significance levels in comparison to INH-RIF values; +++  $p < 0.0001$ , ++  $p < 0.002$ , +  $p < 0.007$  denote the significance levels in comparison to control values.

**Figure 3. Liver histology.** Liver sections from mice in control group (A) and RSV group (B) showed normal liver histology. Liver sections from a mouse in INH-RIF group (C) revealed fatty accumulation and steatosis reverted with RSV administration (D).

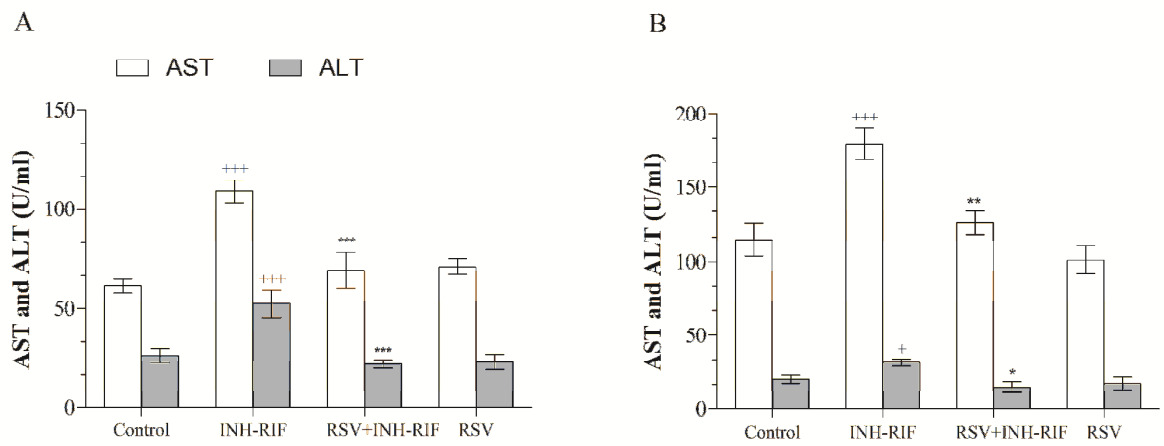
**Figure 4. TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IL-10 levels.** (A) Tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), (B) Interleukin-12p70 (IL-12p70), (C) Interleukin-10 (IL-10) levels in liver tissue samples in

chronic INH (25 mg/kg), RIF (50 mg/kg), RSV (50 mg/kg) protocols of experimental groups. Each column represents the mean of 6 animals and the vertical lines show the S.E.M.. \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*  $p < 0.03$  significantly different between the indicated groups.

**Figure 5. CYP2E1, SIRT1, SIRT7, PPAR- $\gamma$  and PGC1- $\alpha$  mRNA expression.** (A) Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), (B) Sirtuin 1 (SIRT1), (C) Sirtuin 7 (SIRT7), (D) Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) and (E) Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) mRNA relative levels in liver tissue samples in acute INH (50 mg/kg), RIF (100 mg/kg), RSV (100 mg/kg) and chronic INH (25 mg/kg), RIF (50 mg/kg), RSV (50 mg/kg) protocols of treatment. Each column represents the mean of 6 animals and the vertical lines show the S.E.M.. \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.003$ , \*  $p < 0.02$  significantly different between the indicated groups.

## 7. FIGURES

**Figure 1**



**Figure 2**

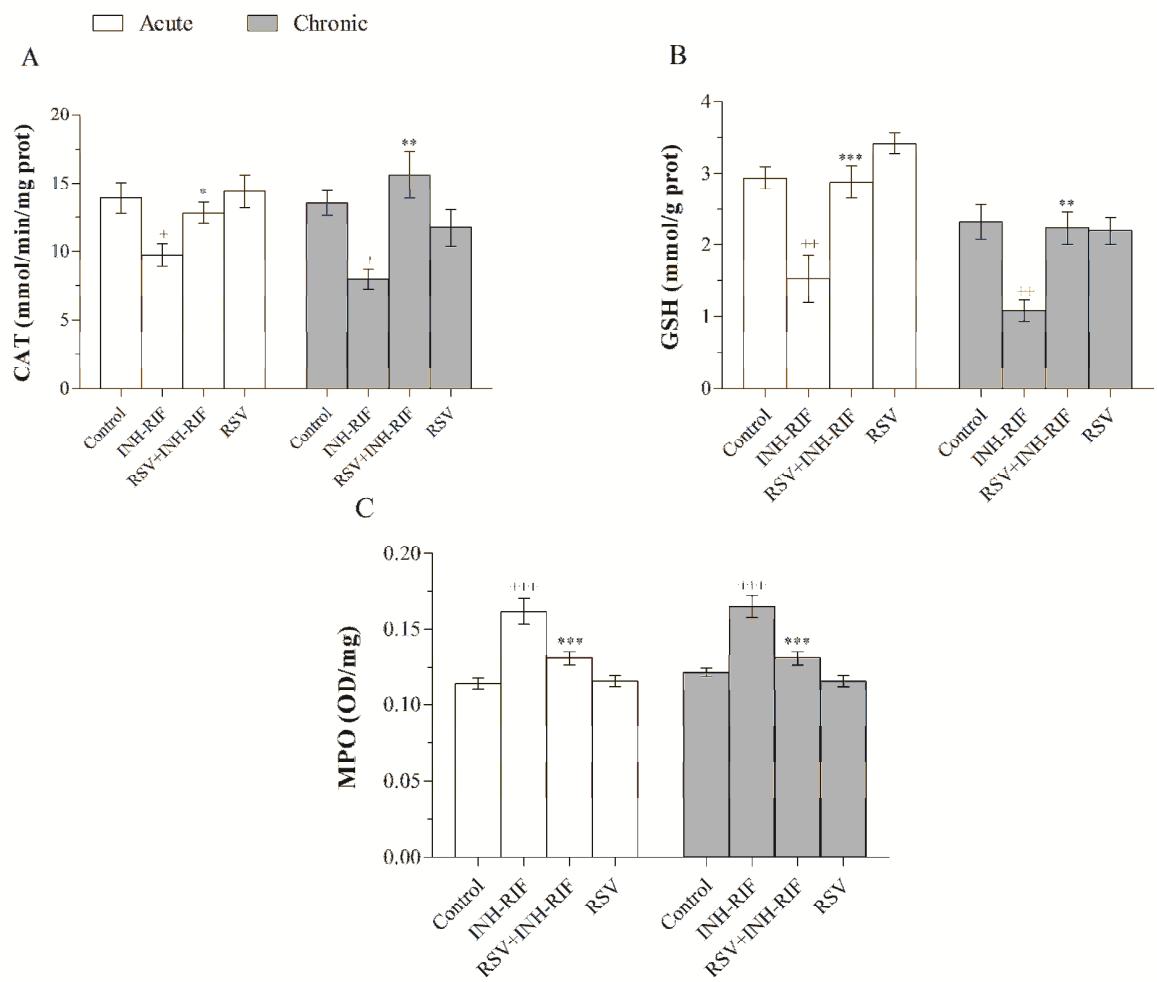
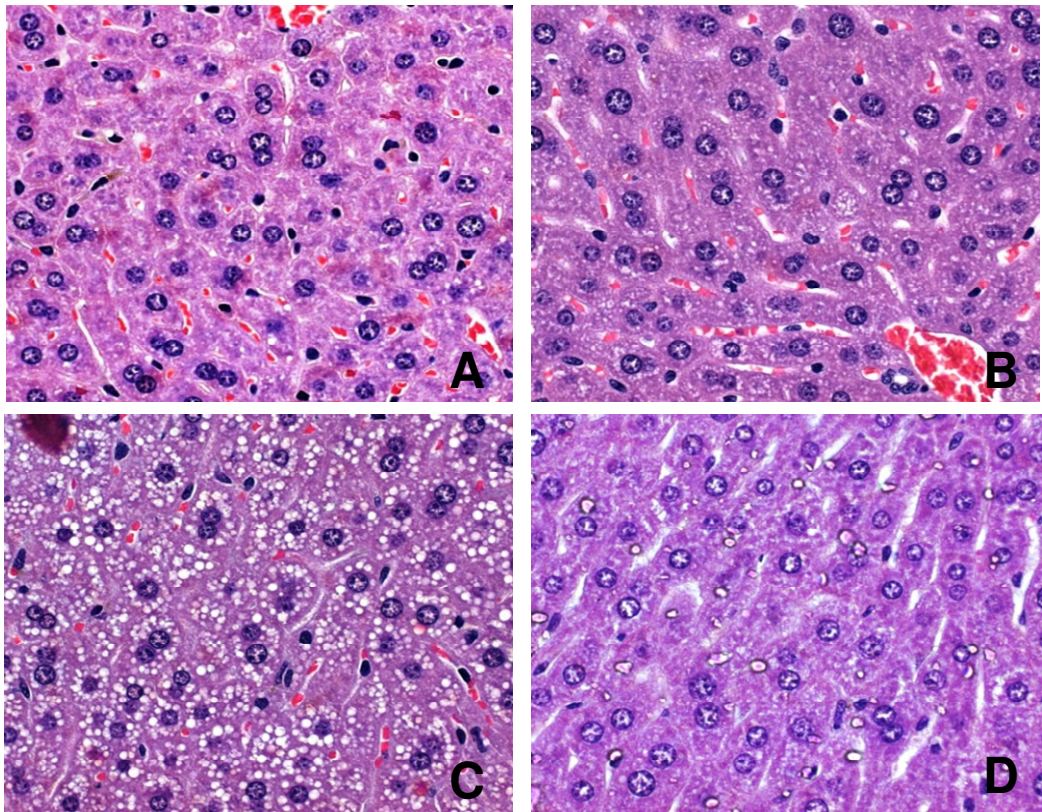
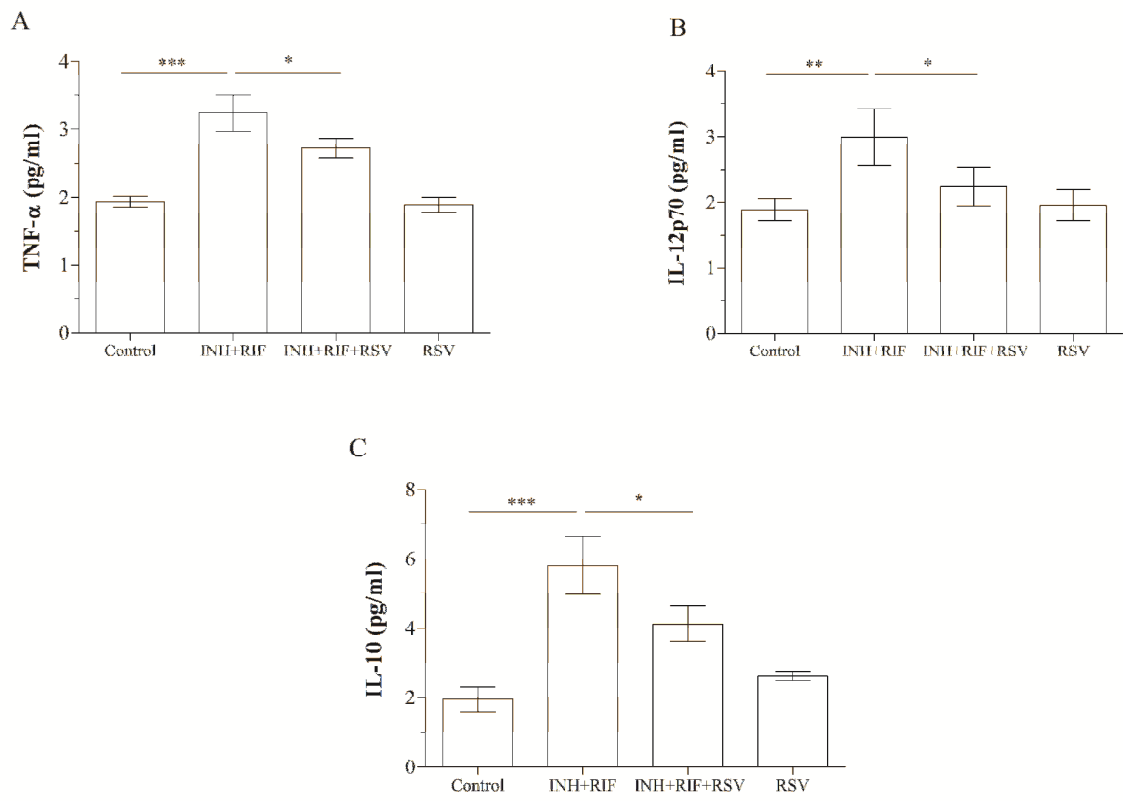


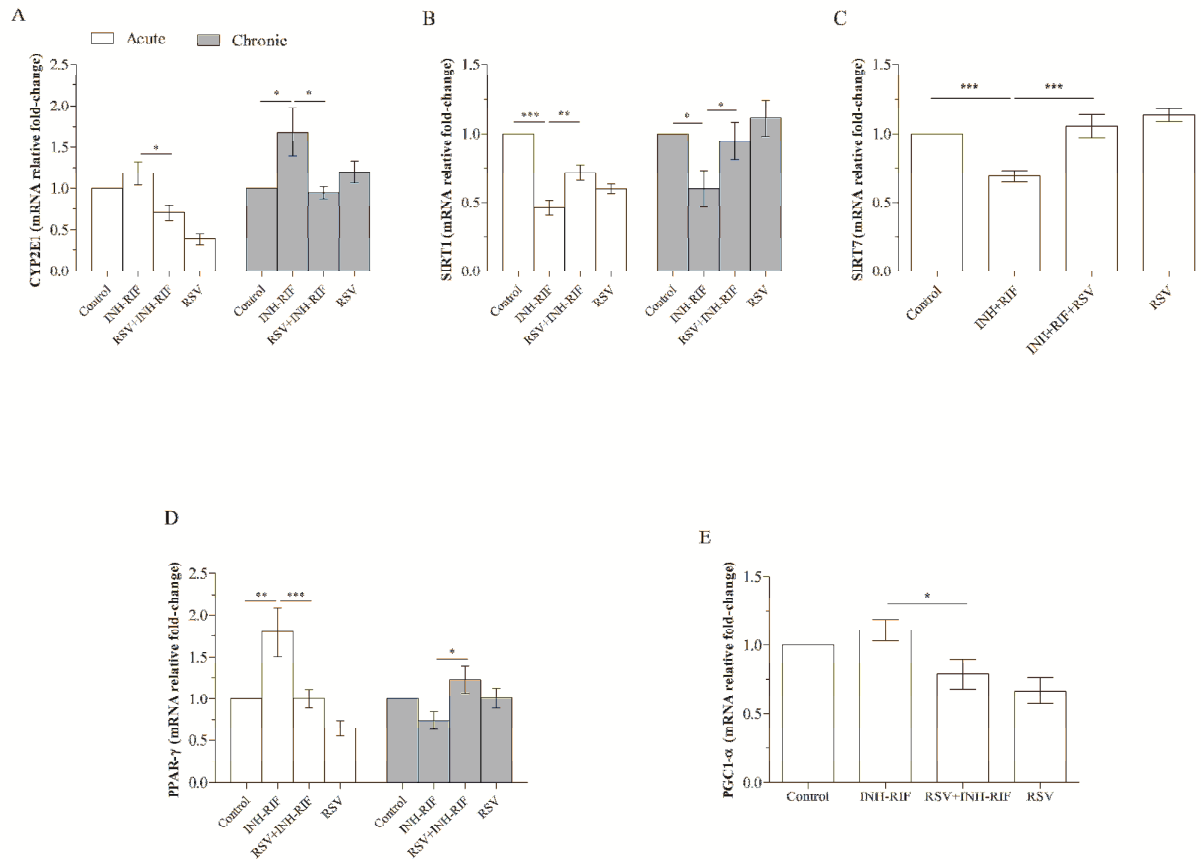
Figure 3



**Figure 4**



**Figure 5**





#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hepatotoxicidade causada pelo uso prolongado de algumas drogas, como aquelas empregadas no tratamento da TB, representa um grave problema de saúde pública. A co-administração de INH e RIF para o tratamento da TB tem sido amplamente associada ao desenvolvimento de dano hepático<sup>95</sup>. Nossos resultados fornecem as primeiras evidências com relação ao efeito protetor do RSV na hepatotoxicidade induzida pela administração de INH e RIF em camundongos.

As intensas análises de caracterização e quantificação do RSV evidenciaram a influência exercida pelo composto em distintas atividades biológicas. O RSV apresenta propriedades antioxidantes bem estabelecidas e sua elevada capacidade de combater os radicais livres presentes nos mais diversos processos biológicos, permite ao RSV atuar na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e no câncer<sup>58</sup>. O nosso estudo estabelece os efeitos antioxidantes do RSV com relação ao dano hepático induzido pelas drogas anti-TB, o que foi evidenciado pela restauração da atividade da catalase e da glutathione.

Os possíveis mecanismos de ação do RSV são amplamente discutidos. O RSV parece ser uma molécula promíscua, já que interage com vários alvos independentes, incluindo receptores, enzimas e canais iônicos<sup>96</sup>. Um dos possíveis mecanismos de atuação do RSV proposto pela comunidade científica é a através da ativação de SIRT6.

No presente estudo, sugerimos alguns mecanismos possíveis de ação do RSV, através do aumento nos níveis de expressão de mRNA de SIRT1 e SIRT7 e da diminuição da expressão de mRNA de CYP2E1. A modulação da expressão de SIRT1 a

nível hepático parece ser um dos principais mecanismos de ação do RSV. Em nosso modelo experimental, o aumento da expressão de SIRT1 foi relacionado com a regulação de vias inflamatórias, o que foi evidenciado pela modulação de citocinas, diminuindo os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e também de IL-10. Além disto, podemos sugerir que o aumento da expressão de SIRT1 induzido pelo RSV atua na via glicolítica através da modulação de PPAR- $\gamma$  e PGC1- $\alpha$ , envolvidos no metabolismo de lipídeos e glicose.

Recentemente foi demonstrado que a SIRT7 está relacionada à progressão da doença cardiovascular e a diversos tipos de câncer<sup>79, 97</sup>. Em nosso estudo, demonstramos que a SIRT7 também pode desempenhar um importante papel hepatoprotetor, auxiliando na homeostase hepática.

A indução do sistema CYP2E1 pelas drogas INH e RIF é amplamente documentada<sup>31</sup>. A isoforma CYP2E1 apresenta um importante papel na metabolização e toxicidade de drogas e no surgimento da hepatotoxicidade, já que cataliza a bioativação de diversos promutágenos e procarcinógenos que contribuem para a geração de radicais livres e para o aumento da peroxidação lipídica<sup>42</sup>. Em nosso modelo, a administração de RSV resultou em significativa redução da expressão de mRNA de CYP2E1, o que indica um possível mecanismo de atuação do RSV como hepatoprotetor.

Os dados obtidos ao longo deste trabalho contribuem para ampliar o conhecimento acerca dos efeitos hepatoprotetores do RSV. Como evidenciamos em nosso estudo, o RSV apresenta significativo potencial na prevenção e/ou reversão da lesão hepática associada às drogas INH e RIF, sugerindo um papel promissor deste composto no tratamento da hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-TB.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Ducati RG, Basso LA, Santos DS. The resumption of Consumption. A Review on Tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(7):697-714.
2. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
3. Daniel TM. *Captain of Death: The Story of Tuberculosis*. Rochester, NY: University of Rochester Press; 1997.
4. Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose - <http://redetb.org/a-historia-da-tuberculose>. 2010. (Accessed 17.11.2010, 2010).
5. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992;257(5073):1055-64.
6. Ruffino-Netto A. Tuberculosis: the neglected calamity. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(1):51-8.
7. Ruffino-Netto A, de Souza AM. Evolution of the health sector and tuberculosis control in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 2001;9(5):306-10.
8. Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999;282:677-86.
9. Blomberg B, Fourie B. Fixed-dose combination drugs for tuberculosis: application in standardised treatment regimens. *Drugs* 2003;63(6):535-53.
10. WHO. *Multidrug and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: 2010 Global Report on Surveillance and Response*. World Health Organization Report 2010; Geneva | Washington DC
11. Dermot M, Raviglione M. Global Epidemiology of Tuberculosis. *Clin Chest Med* 2005;26:167-82.
12. Rieder HL, Cauthen GM, Comstock GW. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epidemiol Ver* 1989;11:79-98.
13. Vieira DRO, Gomes M. Efeitos adversos no tratamento da tuberculose: experiência em serviço ambulatorial de um hospital-escola na cidade de São Paulo. *J Bras Pneumol* 2008;34(12):1049-55.

14. Vranjac A. Mudanças no Tratamento da Tuberculose. Rev Saúde Pública 2010;44(1):197-9.
15. Hijjar MA, Procópio MJ, Freitas LM, et al. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. Pulmão RJ 2005;14(4):310-4.
16. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, RS - [www.saude.rs.br/sinanweb/index.hp](http://www.saude.rs.br/sinanweb/index.hp). 2010. (Accessed 14.07.10, 2010).
17. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995;64:29-63.
18. Glickman MS, Jacobs WR. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. Cell 2001;104:477-485.
19. Nathan C. Taming tuberculosis: a challenge for science and society. Cell Host Microbe 2009;5(3):220-4.
20. Ouellet H, Johnston JB, Ortiz de Montellano PR. The Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 system. Arch Biochem Biophys 2010;493(1):82-95.
21. Jacob JT, Mehta AK, Leonard MK. Acute forms of tuberculosis in adults. Am J Med 2009;122(1):12-7.
22. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med 2009;103(12):1777-90.
23. Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull World Health Organ 1992;70:149-59.
24. Young DB. Blueprint for the white plague. Nature 1998;393:515-6.
25. Timmins GS, Deretic V. Mechanism of action of isoniazid. Mol Microbiol 2006;62:1220-7.
26. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al . The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 1992;358:591-3.
27. Zimhony D, Cox JS, Welch JT, et al. Pyrazinamide inhibits the eucaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of mycobacterium tuberculosis. Nature Medicine 2000;6:1043-7.
28. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, et al. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Curr Issues Mol Biol 2006;8(2):97-111.

29. Aziz MA, Wright A, Laszlo A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis. *Lancet* 2006;368(9553):2142-54.
30. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887-99.
31. Yew WW, Leung CC. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology* 2006;11(6):699-707.
32. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, et al. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(8):935-52.
33. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Consise up-to-date review. *Gastroenterol Hepatol* 2008;23:192-202.
34. Breen RA, Miller RF, Gorsuch T, et al. Adverse events and treatment interruption in tuberculosis patients with and without HIV co-infection. *Thorax* 2006;61:791-4.
35. Kaona FA, Tuba M, Siziya S, et al. An assessment of factors contributing to treatment adherence and knowledge of TB transmission among patients on TB treatment. *BMC Public Health* 2004;4:68.
36. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2000;349:474-85.
37. Knowles SR, Uetrecht J, Shear NH. Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* 2000;356:1587-91.
38. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 1995;333:1118-27.
39. Yue J, Peng R, Chen J, et al. Effects of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. *Pharmacol Res* 2009;59(2):112-9.
40. Huang YS, Chern HD, Su WJ, et al. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003;37:924-30.
41. Sarich TC, Adams SP, Petricca G, et al. Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(2):695-702.

42. Upadhyay G, Singh AK, Kumar A, et al. Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 2008;596(1-3):146-52.
43. Cederbaum AI, Wu D, Mari M, et al. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1539-43.
44. Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, et al. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann Intern Med* 1976;84(2):181-92.
45. Shen C, Meng Q, Zhang G, et al. Rifampicin exacerbates isoniazid-induced toxicity in human but not in rat hepatocytes in tissue-like cultures. *Br J Pharmacol* 2008;153(4):784-91.
46. Tasduq SA, Kaiser P, Sharma SC, et al. Potentiation of isoniazid-induced liver toxicity by rifampicin in a combinational therapy of antitubercular drugs (rifampicin, isoniazid and pyrazinamide) in Wistar rats: A toxicity profile study. *Hepatol Res* 2007;37(10):845-53.
47. Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2007;87(8):551-6.
48. Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, et al. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1717-22.
49. Yamamoto T, Suou T, Hirayama C. Elevated serum aminotransferase induced by isoniazid in relation to isoniazid acetylator phenotype. *Hepatology* 1986;6(2):295-8.
50. Mitchell JR, Thorgeirsson UP, Black M, et al. Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydranize metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 1975;18(1):70-9.
51. Huang YS, Chern HD, Su WJ, et al. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002;35(4):883-9.
52. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, et al. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4(3):256-61.
53. Girling DJ. Adverse reactions to rifampicin in antituberculosis regimens. *J Antimicrob Chemother* 1977;3:115-32.

54. Kwara A, Flanigan TP, Carter EJ. Highly active antiretroviral therapy (HAART) in adults with tuberculosis: current status. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:248-57.
55. Wang Q, Yu S, Simonyi A, et al. Resveratrol Protects Against Neurotoxicity Induced by Kainic Acid. *Neurochem Res* 2004;29:2105-12.
56. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000;66(8):663-73.
57. Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218-20.
58. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(6):493-506.
59. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004;24:2783-840.
60. Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int J Mol Med* 2001;8(1):3-17.
61. Juan ME, Buenafuente J, Casals I, et al. Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. *Food Res Int* 2020;35:195-9.
62. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr* 2002;132(2):257-60.
63. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, et al. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 2004;82(2):614-9.
64. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, et al. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol* 2009;47(9):2170-82.
65. Sener G, Toklu HZ, Sehirli AO, et al. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 2006;35(1):62-8.
66. Masubuchi Y, Sugiyama S, Horie T. Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact* 2009;179(2-3):273-9.
67. Raal A, Pokk P, Arend A, et al. Trans-resveratrol alone and hydroxystilbenes of rhubarb (*Rheum raphaniticum* L.) root reduce liver damage induced by chronic ethanol administration: a comparative study in mice. *Phytother Res* 2009;23(4):525-32.

68. Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295(4):G833-42.
69. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007;80(11):1033-9.
70. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol* 2006;41(3):236-9.
71. Shim J, Kim M, Kim H, et al. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;242(3):318-25.
72. Kirimlioglu V, Karakayali H, Turkoglu S, et al. Effect of resveratrol on oxidative stress enzymes in rats subject to 70% partial hepatectomy. *Transplant Proc* 2008;40(1):293-6.
73. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14(46):7101-6.
74. Wu S, Yu L, Meng K, et al. Resveratrol prolongs allograft survival after liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(30):4745-49.
75. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425(6954):191-6.
76. Morrison BE, Majdzadeh N, D'Mello SR. Histone deacetylases: focus on the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(17):2258-69.
77. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, et al. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 2006;75:435-65.
78. Rine J, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1987; 116:9-22.
79. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007;404(1):1-13.
80. Taylor DM, Maxwell MM, Luthi-Carter R, et al. Biological and Potential Therapeutic Roles of Sirtuin Deacetylases. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(24):4000-18.
81. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273(2):793-8.



82. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 2007;282(9):6823-32.
83. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *MolBiolCell* 2005;16(10):4623-35.
84. Anastasiou D, Krek W. SIRT1: linking adaptive cellular responses to aging-associated changes in organismal physiology. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:404-10.
85. Vaziri H, Dessain SK, Ng EE, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001;107(2):149-59.
86. Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 2006;444(7121):868-74.
87. Fischer M, You M, Matsumoto M, Crabb DW. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist treatment reverses PPARalpha dysfunction and abnormalities in hepatic lipid metabolism in ethanol-fed mice. *J Biol Chem* 2003;278(30):27997-8004.
88. Yang Z, Kahn BB, Shi H, et al. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *J Biol Chem* 2010;285(25):19051-9.
89. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, et al. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(3):419-28.
90. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab* 2009;9(4):327-38.
91. Banks AS, Kon N, Knight C, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008;8(4):333-41.
92. Pfluge PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(28):9793-8.
93. Porcu M, Chiarugi A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:94-103.

94. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 2007;21(8):1745-55.
95. Wong WM, Wu PC, Yuen MF, et al. Anti-tuberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2000;31:201-6.
96. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, et al. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 2010;285(11):8340-51.
97. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res* 2008;28(10):703-10.

## **ANEXO I**

Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 087/09 – CEUA

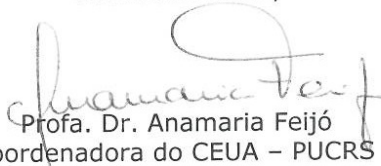
Porto Alegre, 04 de setembro de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00107, intitulado: **"Avaliação dos efeitos do resveratrol sobre a hepatotoxicidade induzida por fármacos anti-tuberculosos em camundongos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Profa. Dr. Anamaria Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. André Arigony Souto  
Faculdade de Química  
N/Universidade

PUCRS

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60 sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## **ANEXO II**

Depósito de Patente

**CÓPIA**  
Saúde  
e  
Biotecnologia

< Uso exclusivo do INPI >



Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

## DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

### Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

#### 1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA – Mantenedora da PUCRS  
1.2 Qualificação: Instituto privado  
1.3 CNPJ/CPF: 88630413000109  
1.4 Endereço Completo: AV. IPIRANGA, 56R1, PRÉDIO 96 C SALA 119 PARTENON, Porto Alegre, RS, Brasil.  
1.5 CEP: 1.6 Telefone: 1.7 Fax:  
1.8 E-mail:  continua em folha anexa

2. Natureza:  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

#### 3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA REDUZIR HEPATOTOXICIDADE

continua em folha anexa

4. Pedido da Divisão: do pedido Nº Data de Depósito:

5. Prioridade:  interna  unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

#### 6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: André Arigony Souto  
6.2 Qualificação: Brasileiro, Casado, Professor 6.3 CPF: 5539880068  
6.4 Endereço completo: Eça de Queirós 901/402, Porto Alegre, RS, Brasil  
6.5 CEP: 90670-020 6.6 Telefone: 6.7 Fax:  
6.8 E-Mail: arigony@puers.br

continua em folha anexa

**ANEXO INVENTORES:**

**Inventor (72):**

---

Nome: **Diógenes Santiago Santos**  
Qualificação: **Brasileiro, Divorciado, Professor** CPF: **187.292.588-04**  
Endereço completo: **Rua Felipe de Oliveira 734, Petrópolis, Porto Alegre, RS, Brasil**  
CEP: **90630-000**  
Telefone: (     )                      Fax: (     ) )  
E-mail: **diogenes@puers.br**

---

Nome: **Luiz Augusto Basso**  
Qualificação: **Brasileiro, Divorciado, Professor** CPF: **293.924.890-73**  
Endereço completo: **Rua Domingos José de Almeida 96/502, Porto Alegre, RS, Brasil**  
CEP: **90420-200**  
Telefone: (     )                      Fax: (     ) )  
E-mail: **luiz.basso@puers.br**

---

Nome: **Maria Martha Campos**  
Qualificação: **Brasileira, Solteira, Professora** CPF: **910.385.619-49**  
Endereço completo: **Rua Miguel Tostes - 139 - 906, Porto Alegre, RS, Brasil**  
CEP: **90430-061**  
Telefone: (     )                      Fax: (     ) )  
E-mail: **maria.campos@puers.br**

---

Nome: **Natália Fontana Nicoletti**  
Qualificação: **Brasileira, Solteira, Estudante** CPF: **010.442.500-89**  
Endereço completo: **Vicente Da Fontoura, 2412, Ap 113, Porto Alegre, RS, Brasil**  
CEP: **90640-002**  
Telefone: (     )                      Fax: (     ) )  
E-mail: **natinfo@gmail.com**

---

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: ATEM E REMER ASSES. CONSULT. PROP. INT. LTDA

9.2 CNPJ/CPF: 07336918/0001-55

9.3 API/CAB: 1946

9.4 Endereço completo: PRAÇA FLORIANO, 19/28º ANDAR - RJ

9.5 CEF: 20031-050

9.6 Telefone: 21 3212-8200

9.7 Fax: 21 3212-8201

9.8 E-Mail: patents@atemeremer.com.br

10. Listagem de sequências biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (origina e cópia).
- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: 1.
- Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	12 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	3 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)				fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 20 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Rio de Janeiro, 22 de abril de 2010

Local e Data

Assinatura e Carimbo

ATEM E REMER ASSESSORIA E CONSULTORIA EM  
PROPRIEDADE INTELECTUAL LTDA.  
CNPJ No. 07.336.918/0001-55



## PROCURAÇÃO


União Brasileira de Educação e Assistência - UBEA, mantenedora da PUCRS, inscrita no CNPJ sob nº 86630413/0001-09 e sediada na Cidade de Porto Alegre, RS, na Av. Ipiranga, 668 1, prédio 96 C, sala 118, neste ato representada por seu Pró-Reitor de Administração e Finanças, Paulo Roberto Girardello Franco, professor, portador da cédula de identidade RG No. 7010347155, expedida pelo SJS/RS, inscrito no CPF/MF sob No. 024.776.610-00, pela presente, outorga aos Srs. BERNARDO ATEM FRANCISCHETTI - CPF No. 005.824.817-06 - OAB/RJ 81.517, RICARDO AMARAL REMER - CPF No. 714.863.749-15, API No. 1.856, SIMONE VILLAÇA AGUIAR - CPF No. 008.909.097-23 - OAB/SP 181.496 DOMICIANO NORONHA DE SA - CPF No. 085.741.307-06 - OAB/RJ 123.116, JORGE NOGUEIRA PINTO - CPF No. 093.760.067-20 - OAB/RJ 79.776, GARRIFIA DA SILVA SANTOS CPF No. 080.499.047-44 - OAB/RJ 125.971, MIRIAM ESPINHAÇO - CPF No. 007.438.788-09 - OAB/SP 155.222, todos brasileiros, residentes e domiciliados em território brasileiro e integrantes de ATEM & REMER ASSESSORIA E CONSULTORIA DE PROPRIEDADE INTELECTUAL LTDA., inscrita no CNPJ sob No. 07.936.918/0001 55, API No. 1.940, com escritórios na Praça Firmino, 19, 28º andar, na Cidade do Rio de Janeiro, RJ e na Rua Padre João Maria, 1.212 - 6º andar, na Cidade de São Paulo, SP, República Federativa do Brasil, poderes para conjunta ou separadamente e independentemente da ordem de nomeação, representar a(o) Outorgante perante a União, os Estados, os Territórios, o Distrito Federal e seus órgãos de administração direta ou indireta, em especial o Instituto Nacional da Propriedade Industrial, o Banco Central do Brasil, o Departamento Nacional de Registro de Comércio, as Juízas Comerciais dos Estados, o Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, o Núcleo de Informação e Coordenação do Ponto BR - NIC BR, o Comitê Gestor Internet do Brasil, o Conselho Nacional de Auto-Regulamentação Publicitária ("CONAR"), para o fim de obter a proteção de direitos relativos à propriedade industrial e intelectual e agir na defesa ativa e passiva dos interesses a(o) Outorgante, podendo, para tais efeitos, requerer e obter a extensão da proteção de nome empresarial, registros de marcas de produto e/ou serviço, de marcas coletivas de certificação e tridimensionais, de indicações geográficas, de desenhos industriais, de programas de computador e de nomes de domínio, requerer e obter privilégio de invenção e de modelos de utilidade, bem como certificados de adição de invenção; promover a prova de uso de marcas, de patentes e de nomes de domínio; pagar retribuições e anuidades; requerer prorrogações ou renovações; apresentar protestos, oposições, recursos e petições, réplicas e defesas, escritas ou orais; Instaurar processos administrativos de nulidade; cumprir exigências; requerer anulações de cessão e/ou transferência de titular, alterações de nome e/ou de sede; requerer a averbação e registro de contratos de licença para exploração relacionados a quaisquer dos direitos acima mencionados, contratos de prestação de serviços técnicos e de fornecimento de tecnologia, de participação em curso de pesquisa e desenvolvimento, contratos de franquia e outros atos ou contratos correlatos; pedir vistas de processos, enviar notificações extrajudiciais e contra-notificar as recebidas de terceiros; desistir, receber e dar quitação e substabelecer e revogar, no todo ou em parte, os poderes aqui conferidos, incluindo-se nos presentes poderes os da cláusula "ad judicia", bem como os de receber citações judiciais em ações relativas a direitos de propriedade intelectual, neste e data do depósito dos pedidos feitos ou processados com base na presente procuração, tanto em relação aos quais a presente procuração foi apresentada, como durante a vigência dos respectivos privilégios ou registros. For fim, são, pela presente, ratificados todos os atos já praticados pelos Outorgados em conformidade com a presente procuração.

Porto Alegre, 17 de Dezembro de 2008.

911 MANICA  
5º TABELIONATO

União Brasileira de Educação e Assistência - UBEA

Prof. Paulo Roberto Girardello Franco  
Pró-Reitor de Administração e Finanças  
PUCRS

<b>BANCO DO BRASIL</b>		001-9		<b>RECIBO DO SACADO</b>	
<b>Local de Pagamento</b>				<b>Precatório</b>	
<b>Pagável em qualquer Banco até o vencimento.</b>				22/05/2010	
<b>Cedente</b>				Agência/Código Cedente	
<b>INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial</b>				2234-9/333.028-1	
<b>Data do Documento</b>	<b>Nº do Documento</b>	<b>Especie do Documento</b>	<b>Data do Precat.</b>	<b>Nº do Precat.</b>	
22/04/2010	1002159797	RC	22/04/2010	00.000.2.2.10.0215979.7	
<b>Use Banco</b>	<b>Carteira</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor</b>	<b>(*) Valor Documento</b>	
	18/027			<b>RS 80,00</b>	
<b>Processo:</b>				<b>(*) Descontos/Retenções</b>	
NN Complementar: Atividade: Patente de Invenção (PI).					
<b>Recebimento: Papel</b>				<b>(.) Outros descontos</b>	
<b>Ced.</b>	<b>Serviço</b>	<b>SPI</b>	<b>Valor</b>		
200 - Depósito de pedido Nacional de Invenção (PI), Certificado de Adição de Invenção (CI) ou Modelo de Utilidade (MU) e Entrada no Furo Nacional de PCT			RS 80,00		
<b>API:</b>				<b>(-) Outros acréscimos</b>	
API: 1946 Procurador: Escritório ATEM & REMER ASSESSORIA E					
<b>Gov. Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança</b>				<b>(*) Valor Cobrado</b>	
				<b>RS 80,00</b>	
<b>Sacado</b>					
<b>UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA</b>					
Av. Ipiranga 6681 - Bairro Partenon, Porto Alegre, BR/RS, 90001-970					
<b>Sacador/Avalista</b>					
<b>Curso ou linha postulado</b>				<b>80,00C TITBIN</b>	
0130 030181413 220410				<b>Autenticação mecânica - Controle Cedente</b>	

### **ANEXO III**

Carta de Submissão do Manuscrito

From: ees.jhepat.0.d55cd.47f6932a@eesmail.elsevier.com on behalf of Journal of Hepatology  
Sent: Mon 11/22/2010 08:17  
To: Andre Arigony Souto  
Subject: Submission Confirmation

Dear Dr. Andre Arigony,

We have received your article "Protective Effects of Resveratrol on Hepatotoxicity Induced by Isoniazid and Rifampicin via modulation of Sirtuins and cytochrome P450 system" for consideration for publication in Journal of Hepatology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jhepat/>

2. Enter these login details:  
Your username is: arigony

If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/jhepat/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jhepat/automail_query.asp)

3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Hepatology