UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Sérgio Souza Figueiredo

Efeito do Ácido Gálico sobre a fibrogênese hepática murina

Ribeirão Preto
2012

SÉRGIO SOUZA FIGUEIREDO

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Efeito do Ácido Gálico sobre a fibrogênese hepática murina

Dissertação apresentada ao
Departamento de Patologia e
Medicina Legal da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas,

Área de concentração: Patologia

Opção:
Patologia Experimental

Orientadora: Prof. Dr. Leandra
Náira Zambelli Ramalho

Ribeirão Preto
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Figueiredo, Sérgio Souza

Efeito do Ácido Gálico sobre a fibrogênese hepática murina.

Ribeirão Preto, 2012.

47 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Náira Zambelli Ramalho, Leandra.

1. Cirrose hepática. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes.
4. Ácido Gálico.

Nome: FIGUEIREDO, Sérgio Souza

Título: Efeito do Ácido Gálico sobre a fibrogênese hepática murina

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, na Área de Concentração: Patologia, opção: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof.Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof.Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha extensa família, pelo suporte, paciência, carinho e compreensão que sempre demonstraram.

À dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto, por me introduzir no meio acadêmico, por sua amizade, competência, lisura e honestidade, pelo infinito incentivo e confiança em mim.

Aos meus amigos de longa data, Rodrigo Macário Rigobello, André Augusto Costa Carvalho, Maxwel Sturari Longo, Gustavo Figueiredo Pinzan e Raul Bortolin pelo companheirismo, sincera amizade e intermináveis horas de conversas filosóficas.

Aos meus amigos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Jean Gonzales, Livia Della Porta Cosac, Paula Prudente Guelfi, Luísiane D'avila, Natália Alle Parreira, Marlei Augusto, Livia Ferreira, Danilo Figueiredo, João Paulo, Giorgia Gobbi, Sheila Sanches, Felipe Danipote, Paulo Soares, Mariana Mendez e Vinícius Kannen.

Ao meu tricolor do Morumbi, de tantas tristezas e alegrias, mas que sempre me faz ter questão de acompanhar e ser VERDADEIRAMENTE FIEL!!!

À minha eterna amada Ana Carolina Sanches Felix, pelo carinho, afeto, paciência e por me fazer viver e sentir plenamente o que é amor. Nina, Amo-te!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho, por me aceitar como orientando, por sua paciência, dedicação, empenho, confiança e compreensão a mim destinadas.

À Dra. Rosana Rosa Miranda Correa e à Dra. Ana Maria de Oliveira, por aceitarem participar da banca examinadora e pela imensurável contribuição ao trabalho final apresentado.

À Marlei Augusto, Livia Della Porta Cosac, Livia Ferreira e Cecília Gonçalves pela importante colaboração na realização do projeto.

RESUMO

FIGUEIREDO, S. S. Efeito do Ácido Gálico sobre a fibrogênese hepática murina. 2012. 47 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Os processos fibrogênicos, ativados por mecanismos como estresse oxidativo, podem levar a um quadro de cirrose hepática, que representa uma das principais causas de morte no ocidente. Entretanto, em alguns estudos, substâncias fenólicas, como o Ácido Gálico (AG), demonstraram inibir e até regredir esses processos. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do composto fenólico AG no processo fibrogênico hepático murino. Os mesmos foram avaliados tanto na fase de progressão da fibrose, como na cirrose hepática estabelecida pela administração crônica de tetracloreto de carbono em camundongos C57. Para isso foram realizadas análises histológicas, imuno-histoquímicas, PCR e Western-blotting, estimando-se fatores relacionados à fibrogênese e mediadores inflamatórios associados. Observou-se uma diminuição importante na percentagem de áreas coradas pelo *Sirius red*, ou seja, redução na percentagem de fibrose nos grupos tratados com AG, tanto durante a prevenção ($p < 0,05$), quanto na regressão da cirrose ($p < 0,05$). Esta melhora foi acompanhada de redução no número de células marcadas pela α SMA nos grupos tratados ($p < 0,05$). Estes mesmos parâmetros foram confirmados através da análise genômica para colágeno, assim como pelo TIMP e pelo TGF $\beta 1$; e proteômica para NF κ B e p38 MAPK. Os achados do presente estudo demonstraram o efeito do AG sobre a prevenção e reversão do processo fibrogênico hepático. Os principais mecanismos deste processo envolvem atividades anti-inflamatórias via TGF- $\beta 1$ e p38 MAPK, principalmente durante a indução de fibrose; assim como restrição da capacidade anti-apoptótica do NF κ B sobre as células estreladas hepáticas (CEH) na cirrose já estabelecida.

Palavras-chave: Cirrose hepática. Compostos fenólicos. Antioxidantes. Ácido Gálico.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, S. S. Effect of Gallic Acid in murine hepatic fibrogenesis. 2012. 47 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The fibrogenic processes activate by mechanisms such as oxidative stress can lead to a picture of liver cirrhosis, which represents a major cause of death in West. However, in some studies, phenolic substances, such as Gallic Acid (GA) shown to inhibit and even regress theses processes. The aim of this study was to investigate the effects of the phenolic compound GA in murine liver fibrogenic process. They were evaluated both in progression of fibrosis and in liver cirrhosis established by administration carbon tetrachloride im mice C57. For this, was performed histological, immunohistochemical, PCR and Western blotting analysis, estimating factors related to fibrogenesis and inflammatory mediators associated. There was a significant decrease of area stained by Sirius Red, which means reduction in the percentage of fibrosis in the groups treated with GA. Both for prevention ($p < 0,05$) and for the regression of the cirrhosis ($p < 0,05$). This improvement was accompanied by a reduction in the number of cells marked by α SMA in the treated groups ($p < 0,05$). These parameters was confirmed by genomic analysis for collagen, as well as by TIMP 1 and TGF β 1, and proteomics for p38 MPK and NFkB. The findings of this study demonstrade the effect of GA in the prevention and of liver fibrogenic process. The main mechanisms of this process involves anti-inflammatory activity via TGF β 1 and p38 MAPK, especially during induction of fibrosis, as well as restriction of anti-apoptotic capacity of NFkB on the CEH in established cirrhosis.

Keywords: Liver cirrhosis. Phenolic compounds. Antioxidants. Gallic Acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	19
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
3.3. EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL	20
3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA	20
3.5. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	21
3.6. EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	21
3.7. EXPRESSÃO PROTÉICA POR WESTERN BLOTTING	22
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4. RESULTADOS	25
4.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	26
4.2. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	28
4.3. EXPRESSÃO GÊNICA	30
4.4. EXPRESSÃO PROTEICA	31
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. Introdução

A cirrose hepática é uma designação genérica para o estágio final do processo de fibrogênese que, atualmente, representa uma das principais causas mundiais de morbi/mortalidade devido a hepatite viral crônica e a esteatose hepática associada a obesidade (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). A hipertensão portal é um dos mais importantes fatores que contribuem para o óbito entre os pacientes cirróticos (CÁRDENAS; GINÈS, 2011).

Um axioma instituído há mais de meio século, quando o diagnóstico era fundamentado unicamente nos sinais clínicos de hepatopatia avançada, considerava que a cirrose, uma vez estabelecida, teria um caráter irreversível (CALLEA et al., 1991). Entretanto, o conhecimento atual provê uma explicação racional para a potencialidade de regressão da cirrose. A deposição de matriz extracelular (MEC) nas doenças hepáticas crônicas não corresponde a um evento estático e unidirecional, mas a um processo dinâmico, altamente regulado e passível de intervenção (POVERO et al., 2010). Evidências de regressão de fibrose têm sido documentadas em uma série de hepatopatias crônicas, como hepatite auto-imune, hepatites virais, obstrução biliar, sobrecarga de ferro e esteato-hepatite não alcoólica (FRIEDMAN; BANSAL, 2006). Indiferentemente à etiologia da cirrose, sua regressão envolve mecanismos de inativação e apoptose das principais células precursoras da fibrogênese hepática, as células estreladas hepáticas (CEH).

As CEH, também conhecidas como células de Ito, células armazenadoras de gordura ou lipócitos, foram observadas pela primeira vez em 1876 por von Kupffer, sendo pouco estudadas por quase 100 anos. Em 1982, Knook relatou as funções metabólicas destas células isoladas em cultura (KNOOK; SEFFELAAR; DE LEEUW, 1982). As CEH são células mesenquimais localizadas adjacentes ao espaço de Disse, entre o endotélio fenestrado do sinusóide e o cordão de hepatócitos, mais freqüentemente observadas nas proximidades da veia centrolobular (zona 3 do ácino hepático) (RAPPAPORT et al., 1954). As CEH correspondem a aproximadamente 15% do número total de células hepáticas e provavelmente têm sua origem na crista neural (FRIEDMAN, 2000). Estas células mantêm, em grânulos lipídicos característicos, o principal estoque de vitamina A do

organismo. As CEH também participam da manutenção da MEC no espaço de Disse (FRIEDMAN, 2000; GEERTS, 2001).

As CEH possuem processos citoplasmáticos contrácteis, os quais em íntimo contato com os sinusóides podem interferir no fluxo sanguíneo intra-hepático.

Devido à privilegiada localização em contato simultâneo com os sinusóides e com os hepatócitos, foram atribuídas às CEH a regulação parácrina de diversas funções hepáticas e capacidade neurotransmissora local (KAWADA, 1997). Além de uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e outras substâncias bioativas produzidos pelas CEH em resposta a agentes nocivos, estas células desempenham papel crucial nos mecanismos de lesão, regeneração e fibrose hepáticas (RIPPE, 1998).

As CEH quiescentes (não ativadas), induzidas por estímulos autócrinos e parácrinos, sofrem uma série de alterações morfofuncionais conhecidas como processo de ativação (FRIEDMAN, 2000; PINZANI; MARRA, 2001). Este processo pode ser subdividido em três fases:

Iniciação: as CEH recebem estímulos parácrinos provenientes dos hepatócitos lesados, das células endoteliais, das células de Küpffer e da MEC alterada pela agressão. Diante disso, as CEH tornam-se mais responsivas às citocinas (FRIEDMAN, 2000; PINZANI; MARRA, 2001).

Perpetuação: as CEH começam a produzir citocinas que atraem e estimulam a si próprias e a leucócitos, por mecanismos autócrinos e parácrinos, respectivamente. Em seguida, as CEH passam a proliferar (SCHNABL et al., 2003), perdem seus depósitos de vitamina A, adquirem capacidade contrátil e produzem grande quantidade de colágeno fibrilar (tipo I). Por isso, as CEH ativadas são ainda conhecidas como células “semelhantes aos miofibroblastos” (FRIEDMAN, 2000; PINZANI; MARRA, 2001). Este novo fenótipo celular é caracterizado também por maior expressão da proteína α -actina de músculo liso (α -SMA) (KNITTEL et al., 1999). O resultado deste processo é a fibrose hepática progressiva e hipertensão portal (SPRENGER et al., 1997). Desta forma, a hipertensão portal pode estar associada tanto à contractilidade das CEH quanto à colagenização do espaço de Disse (ZIMMERMANN et al., 1999).

Resolução: a fibrose pode ser revertida mediante aumento da atividade de collagenases e redução do número de CEH ativadas, desde que ocorra a remoção dos fatores lesivos e não configure um quadro de fibrose avançada. É

provável que a interleucina 10 (IL-10) tenha participação nesta fase (FRIEDMAN, 2000).

Durante o processo de ativação, a proliferação das CEH é estimulada pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sendo que parte do PDGF é produzida pelas próprias CEH (KAWADA et al., 1993; PINZANI; MARRA; CARLONI, 1998; MARRA, 1999; FRIEDMAN, 2000; MAHER, 2001; PINZANI; MARRA, 2001). A interleucina 1 (IL-1), uma potente citocina pró-inflamatória, também atua induzindo a proliferação de CEH (PINZANI; MARRA, 2001). A endotelina-1 elicia principalmente a contractilidade das CEH (KAWADA et al., 1993; PINZANI; MARRA; CARLONI, 1998; MARRA, 1999; FRIEDMAN, 2000; MAHER, 2001; PINZANI; MARRA, 2001). A ativação das CEH também acarreta aumento dos níveis celulares do RNA mensageiro do colágeno tipo $\alpha 1(I)$ (BRENNER et al., 2000), culminando em incremento na síntese de MEC pelas CEH. Esta resposta autócrina das CEH é estimulada principalmente pelo fator transformador do crescimento beta-1 (TGF- $\beta 1$) (PINZANI; MARRA; CARLONI, 1998; MARRA, 1999; FRIEDMAN, 2000; MAHER, 2001; PINZANI; MARRA, 2001). A produção e secreção de citocinas pelas CEH ativadas também resulta em aumento da resposta inflamatória hepática. A proteína quimiotática para monócitos tipo 1 (MCP-1), produzida pelas CEH, participa tanto na atração de leucócitos, como na estimulação de novas CEH (SPRENGER et al., 1997; PINZANI; MARRA; CARLONI, 1998; MARRA, 1999; FRIEDMAN, 2000; MAHER, 2001; PINZANI; MARRA, 2001). Enfim, o processo de ativação das CEH representa um ponto crucial na geração da fibrose hepática (KNITTEL et al., 1999; FRIEDMAN, 2008).

Vários fatores se associam para a ativação das CEH, como interações imunológicas, quimiocinas, adiponectinas, além de mediadores neuroendócrinos e de estresse oxidativo (FRIEDMAN, 2008). O estresse oxidativo é reconhecido como um evento patogênico grave associado a diversas hepatopatias, podendo ser observado no espectro que perfaz desde doenças inflamatórias até metabólicas, tais como a hepatite viral crônica, hepatite auto-imune, doença hepática alcoólica e esteato-hepatite não alcoólica. Diversas observações *in vitro* e *in vivo* sugerem que produtos do estresse oxidativo e seus efeitos lesivos podem representar um elo comum entre as diferentes formas de agressão crônica e fibrose hepática (ALMEIDA, 2009; LEE; FRIEDMAN, 2011). Mais detalhadamente, trata-se de um

distúrbio no equilíbrio de oxidação-antioxidação levando a potenciais danos celulares.

A maioria das células podem tolerar um grau leve de estresse oxidativo porque têm capacidade de defesa antioxidante suficiente, que atuando conjuntamente com os sistemas de reparo, reconhece e remove moléculas comprometidas pela oxidação. A perda da regulação entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes pode ocorrer tanto pela falta da atividade antioxidante causada por distúrbios na produção e distribuição dos agentes antioxidantes endógenos, quanto pelo excesso de substâncias pró-oxidantes, especialmente as espécies reativas de oxigênio (ROS) (NOVO; PAROLA, 2008; HA; SHIN; YU, 2010).

As ROS podem ativar diretamente as CEH e assim, estimular a fibrogênese hepática (CHOJKIER et al., 1989). Produtos da peroxidação lipídica induzem à expressão e síntese do colágeno $\alpha 1(I)$ pelas CEH em cultura (MAHER; TZAGARAKIS; GIMENEZ, 1994; ADACHI et al., 2005). A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase é a principal produtora de ROS. Esta enzima oxida o NADPH citoplasmático para NADP⁺ e reduz o oxigênio molecular para íon superóxido e subsequente para peróxido de hidrogênio. Inclusive foi observada menor quantidade de fibrose hepática em camundongos geneticamente deficientes de NADPH oxidase, quando tratados cronicamente com tetracloreto de carbono (CCl₄) (ARAM et al., 2009). Outro exemplo, os inibidores da coenzima 3-hidroxi-3-metilglutaril redutase A, também conhecidos como estatinas, são capazes de diminuir fatores pró-inflamatórios derivados do estresse oxidativo como o HNE e fatores de transcrição, no caso do fator nuclear da cadeia kappa de linfócitos B (NF κ B) (MORENO et al., 2009).

Além disso, algumas citocinas têm sua produção e secreção aumentadas em resposta às ROS durante a inflamação, através de sinais parácrinos liberados a partir de células do sistema imunológico, e contribuem para a ativação das CEH. Uma vez ativadas, as CEH passam a responder ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e ao fator transformador de crescimento beta (TGF- β). O PDGF facilita a progressão da fibrose hepática em humanos, aumentando o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma das principais moléculas do tipo ROS nas próprias CEH. Além de também produzir o aumento das ROS, o TGF- β atua diminuindo as concentrações endógenas de glutatona, um importante agente antioxidante (NOVO; PAROLA, 2008; ALMEIDA et al., 2009; HA; SHIN; YU, 2010).

Desta forma, a identificação de agentes anti-oxidantes, capazes de inibir a geração de ROS, e desta forma, reduzir a ativação e proliferação das CEH tem sido alvo de diversos estudos (SOON; YEE, 2008).

Um importante exemplo de substâncias antioxidantes são os (poli)fenóis ou compostos fenólicos. Os compostos fenólicos, constituintes encontrados abundantemente nas plantas, podem ser normalmente ingeridos de forma indireta na dieta. O efeito mais evidente dos compostos fenólicos é sua potente atividade antioxidante, através da neutralização de radicais livres, da inativação de metais catalíticos pela quelação e da redução de íons superóxido para derivados hidroxila mais estáveis, interagindo sinergicamente com outros compostos redutores.²⁵ Alguns estudos demonstram ainda sua atividade preventiva para doenças cardiovasculares e neoplásicas (PHAN et al., 2003).

Particularmente em relação ao fígado, foi observado que o comprometimento dos sistemas de defesa antioxidantes, incluindo a redução no tocoferol, selênio e glutathione, acompanha algumas doenças hepáticas, o que sugere o uso de agentes antioxidantes nestes casos (ALMEIDA et al., 2009). Como o estresse oxidativo parece estar intimamente relacionado à progressão da fibrose hepática, o emprego dos compostos fenólicos como substâncias antioxidantes pode ser considerado como uma estratégia terapêutica lógica para as hepatopatias crônicas, embora estudos clínicos com um grande número de pacientes ainda não tenham sido realizados.

Dentre os compostos fenólicos com potencial terapêutico, destaca-se o 3,4,5-ácido trihidroxibenzóico (Figura 1), ou ácido gálico (AG), o qual é encontrado amplamente distribuído em plantas. O AG pode ser detectado como uma molécula livre ou como um dos componentes químicos de outros ativos fenólicos, como os taninos (HEMINGWAY; GROSS; YOSHIDA, 1999). O AG e seus derivados também estão presentes em cascas de carvalho, uvas e folhas de chá como um dos principais componentes fenólicos (OW; STUPANS, 2003).

Figura 1 - Estrutura química do Ácido Gálico.

Estudos recentes demonstraram que o AG apresenta várias propriedades terapêuticas, incluindo atividades anti-diarréica (NAMKUNG et al., 2010), anti-fúngica, anti-bacteriana, anti-inflamatória, anti-viral, antioxidante e anti-neoplásica (FIUZA et al., 2004; SAMEERMAHMOOD et al., 2010). Além de o AG ser utilizado até mesmo como matéria-prima para tintas, sua capacidade antioxidante permite seu emprego na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (ZHAO; IKHLAS; FRONCZEK, 2011). Outros autores apontam, ainda, o AG como sendo efetivamente responsável por prevenir superprodução de ROS e colágeno tipo I durante a fibrose cardíaca (SUTRA et al., 2008), inclusive com a inibição *in vitro* de proliferação e diminuição da contratilidade de fibroblastos (PHAN et al., 2003).

A principal ação antioxidante do AG está associada ao fato de que este composto fenólico induz o aumento dos níveis de enzimas hepáticas como glutathione, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione s-transferase, além da enzima sérica catalase. Essas enzimas são responsáveis pela metabolização de radicais livres, tais quais as ROS, transformando-as em outras substâncias mais estáveis e, por isso, menos reativas ou oxidativas (CHUANG et al., 2010).

Embora a potente ação antioxidante dos compostos fenólicos, tais como o AG, sejam conhecidas, pesquisas realizadas com linhagem celular de fibroblastos de pulmão sugerem atividade apoptótica dessas células justamente por uma ação pró-oxidante, tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca, através da ativação das caspases 8, 9 e 3. Além disso, a ativação da p53 e outras proteínas importantes no processo de apoptose induzida por estresse oxidativo, foram comprovadamente implicadas à administração do AG, relacionando uma possível atividade pró-oxidante nesses fibroblastos (CHUANG et al., 2010). A ação citotóxica do AG também foi comprovada em várias linhagens tumorais e em fibroblastos renais - morfofisiologicamente análogos às CEH, porém o mesmo não foi observado quando administrado em outras linhagens celulares normais como queratinócitos, células endoteliais e hepatócitos, demonstrando nenhuma ou muito baixa atividade citotóxica (PHAN et al., 2003; CHUANG et al., 2010). Muito pelo contrário, além de não ser citotóxico aos hepatócitos, foi atribuído ao AG um importante papel de proteção hepatocelular (HSU; YEN, 2007).

Esta capacidade “seletiva”, promovendo apoptose apenas em linhagens celulares tumorais e fibroblastos ativados e preservando células normais deste

mesmo processo, é mais um indicativo do potencial terapêutico do AG e sua importância nas pesquisas científicas, tanto em tumores quanto em fibrogênese de diversos órgãos. Todavia, o papel do AG durante a fibrose hepática ainda não foi esclarecido, tampouco se um possível efeito anti-fibrogênico estaria associado ao seu potencial antioxidante.

Assim, diante das características apresentadas do AG, nossa hipótese é de que seu uso no tratamento de fibrogênese hepática é eficaz tanto na inibição quanto na regressão deste processo.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram os de investigar o papel do composto fenólico AG nos processos fibrogênicos hepáticos em murinos, e se os possíveis efeitos estariam relacionados ao seu potencial antioxidante.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais de experimentação

Camundongos C57 (n=46), provenientes do Biotério Geral do Campus da Universidade de São Paulo, foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P., em uma sala com ciclos luz-escuro de 12 horas. Os animais serão alojados em caixas de polipropileno, alimentados com ração padrão para laboratório (Purina Nutrimentos Ltda.) e receberão água *ad libitum*. Todos os animais serão tratados de acordo com o International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985), com protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P. (nº 174/ 2010).

3.2. Delineamento experimental

Os animais foram alocados em 5 grupos distintos:

Grupo 1 – **Cirrose** (n=10): inoculados com solução de 300µl/kg de CCl₄ / óleo de oliva (20% v/v) via intraperitoneal (i.p.), 2 vezes por semana, durante 8 semanas (GUIMOND et al., 2007). Posteriormente, receberam água destilada deionizada i.p., em dias alternados, por mais 2 semanas.

Grupo 2 – **Cirrose/AG** (n=10): inoculados com solução de 300µl/kg de CCl₄ / óleo de oliva (20%v/v) i.p., 2 vezes por semana, durante 8 semanas (GUIMOND et al., 2007). Posteriormente, receberam AG (100mg/kg/dia) (HSU; YEN, 2007), i.p., em dias alternados, por mais 2 semanas.

Grupo 3 – **Fibrose** (n=10): inoculados com solução de 300µl/kg de CCl₄ / óleo de oliva (20% v/v) i.p., 2 vezes por semana, durante 8 semanas (GUIMOND et al., 2007). A partir da 7ª semana, foi inoculada água destilada deionizada i.p., em dias alternados, por 2 semanas.

Grupo 4 – **Fibrose/AG** (n=10): inoculados com solução de 300µl/kg de CCl₄ / óleo de oliva (20%v/v) i.p., 2 vezes por semana, durante 8 semanas (GUIMOND et al., 2007). A partir da 7ª semana, foi inoculado AG (100mg/kg/dia) ((HSU; YEN, 2007), i.p., em dias alternados, por 2 semanas.

Grupo 5 - **SHAM** (n=6): inoculados com óleo de oliva i.p., 2 vezes por semana, por 8 semanas.

Grupos	Quantidade de semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Grupo 1. Cirrose + Ácido Gálico n=10	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Grupo 2. Cirrose n=10	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Grupo 3. Fibrose + Ácido Gálico n=10	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Grupo 4. Fibrose n=10	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Grupo 5. Sham n=6	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤

Solução de 300µl/kg de CCl₄ / óleo de oliva (20% v/v) i.p. 2 x semana – Indutora de fibrose
Solução de AG (100mg/kg/dia) i.p. em dias alternados – Fármaco a ser testado
Água destilada deionizada i.p. em dias alternados – Veículo do AG
Óleo de oliva i.p. 2 x semana – Veículo do Indutor de fibrose

3.3. Eutanásia e coleta do material

Após os períodos de 8 (grupos 3, 4 e 5) e 10 semanas (grupos 1 e 2), os animais foram anestesiados com xilazina/ketamina e submetidos à laparotomia para biópsia hepática e coleta de sangue e posteriormente à eutanásia por dessangramento. Fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol tamponado a 10% por 48 horas e incluídos em parafina. Pequenas amostras do parênquima hepático foram coletadas em solução estabilizadora de RNA (RNAlater RNA Stabilization Reagent, QIAGEN, Turnberry Lane, CA, USA), congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C (SANCHO-BRU et al., 2007).

3.4. Análise histológica

As amostras hepáticas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas, embebidas em parafina e submetidas ao processamento histológico de rotina. As lâminas foram preparadas com secções de 5 µm de espessura e coradas pelo método de *Sirius red*. Os depósitos de colágeno foram estimados como porcentagem de áreas coradas pelo *Sirius red* (em vermelho) em dez campos

randômicos no aumento microscópico de 40×, utilizando o programa de computador *Image J* (NIH) (SANCHO-BRU et al., 2007).

3.5. Estudo imuno-histoquímico

Foram realizadas preparações adicionais para o estudo imuno-histoquímico. Sucintamente, secções de 4 µm de espessura, montadas em laminas recobertas com poli-L-lisina, foram desparafinadas, reidratadas, imersas em tampão citrato (10 mmol / L- pH 6.0), e submetidas a recuperação antigênica por calor, utilizando uma panela a vapor a 95°C por 45 min. As lâminas foram então lavadas com tampão fosfato (PBS) e expostas a peróxido de hidrogênio a 3% por 20 min, para bloqueio da peroxidase endógena. Ligações protéicas inespecíficas foram bloqueadas com a utilização de soro normal (Vectastain Elite ABC Kit, Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) por 30 min. As preparações foram em seguida incubadas com anticorpo primário específico para a proteína alfa-actina de músculo liso (α -SM actin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:100), por 2 h, em temperatura ambiente (25°C) e câmara úmida. Após lavagens sucessivas com PBS, o anticorpo secundário biotinilado (Vectastain Elite ABC Kit, Universal, Vector Laboratories Inc.) foi aplicado sobre as lâminas por 30 min e banhadas com PBS. A seguir, as preparações foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit, Universal, Vector Laboratories Inc.) por 30 min e reveladas com diaminobenzidina (DAB kit, Vector Laboratories Inc.) por 5 min. As lâminas foram então contra-coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com Permount (Biomed, Foster City, CA, USA). Como controle negativo, as preparações foram conduzidas sob condições idênticas, porém com a omissão do anticorpo primário. As células α -SMA-positivas foram quantificadas randomicamente, em 30 campos representativos no maior aumento (40×), e os resultados foram expressos como número de células α -SMA-positivas por campo microscópico (SANCHO-BRU et al., 2007).

3.6. Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

Amostras hepáticas estocadas a -80°C foram também utilizadas para a quantificação da expressão gênica dos peptídeos pró-colágeno α 1(I), TGF-beta1 e TIMP-1. As amostras teciduais, homogeneizadas com auxílio de um

homogeneizador Polytron (PT 2100, Kinematica Polytron, Newark, NJ, E.U.A.) foram submetidas à extração do RNA total utilizando centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R, Eppendorf do Brasil, São Paulo) e kit específico (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). O DNA complementar foi obtido por transcrição reversa a partir de 5 µg de RNA total utilizando kits de retro-transcrição (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads e pd(N)₆ Random Hexamer, Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, E.U.A.).

A amplificação gênica com simultânea quantificação foi realizada por meio do emprego do Sistema “real-time” PCR iQ5 BIO-RAD (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.), utilizando-se *primers* específicos para os genes do pró-colágeno $\alpha 1(I)$, TGF-beta1, TIMP-1 e 18S (Assays-on-Demand Gene Expression Products, Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.), e a enzima Taq Polimerase (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - 2X, Applied Biosystems,). Foi empregado o método ΔCT para a análise das diferenças entre as amostras, utilizando-se o gene 18S como referência (SANCHO-BRU et al., 2007).

3.7. Expressão protéica por Western blotting

Os extratos celulares foram obtidos a partir das amostras hepáticas congeladas, utilizando o tampão de lise Triton contendo inibidores de proteases e fosfatases, homogeneizando-se as proteínas extraídas de 5 animais representativos de cada grupo. Foram infundidos 25 µg por grupo, em géis SDS-acrilamida a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos primários para p38 MAPK ou p65 NFkB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), além de beta-actina (Sigma, St Louis, MI, USA), como controle. A seguir, as membranas foram lavadas com tampão e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase. As proteínas foram detectadas e quantificadas por quimioluminescência ECL (Amersham) (SANCHO-BRU et al., 2007).

3.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Dada à natureza das variáveis, para as comparações estatísticas foi aplicado o teste não paramétrico “U” de Mann-

Whitney. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados significantes.

4. Resultados

A tabela 1 sintetiza os resultados encontrados pelo presente estudo. Foram observadas evidências de atividade anti-fibrogênese do AG com alta relevância estatística nas análises realizadas, tanto no período de fibrogênese (F + AG) quanto no de cirrose já estabelecida (C + AG), frente aos respectivos controles (F e C). (Tabela 1)

Tabela 1 - Resultados do teste não paramétrico “U” de Mann-Whitney, demonstrando a relevância estatística dos resultados obtidos. Resultados de valores unitários oriundos da técnica de Western Blot

Variáveis	F × F + AG		C × C + AG	
Histologia (quantificação de colágeno I)	p=0,0104		p=0,0350	
Imunohistoquímica (quantificação de CEH)	p=0,0360		p<0.0001	
PCR - pró-colágeno α1(I)	p<0,0001		p=0,0011	
PCR - TIMP1	p<0,0001		p=0,0008	
PCR - TGF-β1	p=0,0031		p=0,0014	
Variáveis (valores unitários)	F	F + AG	C	C + AG
Western Blot - p38 MAPK	1,72	0,26	0,42	0,59
Western Blot – p65 NFκB	1,27	0,38	0,68	0,29

F= grupo fibrose

F+AG= grupo fibrose +ácido gálico

C= grupo cirrose

C+AG= grupo cirrose +ácido gálico.

4.1. Análise Histológica

Houve um aumento significativo nas percentagens de áreas marcadas pelo *Sirius red* em todos os animais expostos ao CCl_4 em relação animais do grupo SHAM ($0,46 \pm 0,18$) ($p < 0,01$). Observou-se diminuição estatisticamente significativa na percentagem de áreas coradas pelo *Sirius red* no grupo F+AG ($1,19 \pm 0,18$) em relação ao seu controle ($1,51 \pm 0,55$) ($p = 0,01$). O mesmo foi observado no grupo C+AG ($1,49 \pm 0,19$), quando comparado aos animais cirróticos não tratados com AG ($2,17 \pm 0,6$) ($p = 0,03$). Embora tenha existido melhora nos dois grupos administrados com AG, nota-se que o AG foi mais eficaz durante o período de fibrogênese do que na cirrose estabelecida, atingindo valores mais próximos aos dos animais do grupo SHAM. (Fig. 2)

Figura 2 - Gráfico da quantificação percentual de colágeno corado por *Sirius red*. SHAM= grupo controle; F= grupo fibrose; F+AG= grupo fibrose +ácido gálico; C= grupo cirrose; C+AG= grupo cirrose +ácido gálico.

* $p = 0,01$, F $\times$ F+AG

$p = 0,03$, C $\times$ C+AG

As fotomicrografias demonstram que nos animais induzidos com CCl_4 sem tratamento com AG, houve a presença de septos fibrosos (SF) e nódulos de regeneração (NR) nos grupos fibrose (F) e cirrose (C), respectivamente (Fig. 3A e 3B). Todavia, a fibrose permaneceu restrita aos tratos portais no grupo fibrose sob o uso de AG (F+AG) (Fig. 3C), havendo regressão dos nódulos de regeneração a septos fibrosos nos animais cirróticos tratados com AG (C+AG) (Fig. 3D).

Figura 3 - Fotomicrografias histológicas demonstrando: presença de septos fibrosos (SF) e nódulos de regeneração (NR) nos grupos fibrose (F) e cirrose (C), respectivamente (Fig. 3A e 3B); fibrose permanecendo restrita aos tratos portais no grupo fibrose sob o uso de AG (F+AG) (Fig. 3C); e regressão dos nódulos de regeneração a septos fibrosos nos animais cirróticos tratados com AG (C+AG) (Fig. 3D).

4.2. Estudo Imuno-histoquímico

As células α -SMA positivas foram mais freqüentes na maior parte dos grupos inoculados com CCl_4 em relação ao grupo SHAM ($11,45 \pm 3,60$) ($p < 0,05$). Observou-se ainda, redução na quantidade de células α -SMA positivas por campo, nos grupos F+AG ($14,40 \pm 5,24$) e C+AG ($11,45 \pm 3,35$), frente aos seus respectivos controles ($16,53 \pm 5,77$ e $18,17 \pm 4,76$; $p = 0,0360$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Ao contrário dos depósitos de colágeno, o grupo C+AG apresentou acentuada redução no número de células α -SMA positivas, praticamente compatíveis com animais do grupo SHAM. (Fig. 4)

Figura 4 - Gráfico da quantificação do número de células α -SMA positivas por campo. SHAM= grupo controle; F= grupo fibrose; F+AG= grupo fibrose +ácido gálico; C= grupo cirrose; C+AG= grupo cirrose +ácido gálico.

* $p = 0,0360$, F $\times$ F+AG

$p < 0,0001$. C $\times$ C+AG

Nas fotomicrografias é possível observar uma menor quantidade de células marcadas pela α -SMA nos animais administrados com AG, F+AG e C+AG (Fig. 5A e 5B), em relação aos seus respectivos controles, F e C (Fig. 5C e 5D).

Figura 5 - Fotomicrografias da Imunoistoquímica demonstrando a quantificação do número de células α -SMA positivas por campo (setas amarelas). Nota-se sensível diminuição no número de CEH ativadas nos grupos F+AG = grupo fibrose + ácido gálico (A), e C+AG = grupo cirrose + ácido gálico (B) quando comparados aos respectivos controles F = grupo fibrose (C), e C = grupo cirrose (D).

4.3. Expressão gênica

Houve diminuição significativa na expressão gênica do pró-colágeno $\alpha 1(I)$, TIMP1 e TGF- $\beta 1$ ($0,97 \pm 0,32$; $0,94 \pm 0,22$ e $1,88 \pm 0,42$, respectivamente) no grupo F+AG, quando comparado ao grupo F ($8,13 \pm 0,41$; $6,36 \pm 0,34$ e $14,33 \pm 1,91$) ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,0031$, respectivamente). O mesmo ocorreu nos animais C+AG quanto à expressão gênica de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ ($11,89 \pm 0,68$), TIMP1 ($0,92 \pm 0,43$) e TGF- $\beta 1$ ($1,11 \pm 0,49$), em relação ao grupo C ($7,65 \pm 0,71$; $5,20 \pm 0,67$ e $6,17 \pm 0,69$) ($p = 0,0011$; $p = 0,0008$; $p = 0,0014$, respectivamente). Não obstante o AG tenha papel significativo em todos os períodos de tratamento, seu efeito foi mais evidente durante o período de fibrogênese do que no de cirrose já estabelecida. A figura 7 demonstra a quantificação gênica de pró-colágeno $\alpha 1(I)$, TIMP1 e TGF- $\beta 1$.

Figura 7 - Gráficos da quantificação da expressão gênica normalizada pelo grupo SHAM, de pró-colágeno $\alpha 1(I)$, TIMP 1 e TGF- $\beta 1$, respectivamente. F= grupo fibrose; F+AG= grupo fibrose +ácido gálico; C= grupo cirrose; C+AG= grupo cirrose +ácido gálico.

* $p < 0,01$, F $\times$ F+AG

$p < 0,01$, C $\times$ C+AG

4.4. Expressão Proteica

Em relação às análises proteômicas, observou-se grande redução nas quantidades de p38 MAPK no grupo F+AG (1,72) quando comparado ao seu controle (0,26). Todavia, essa diferença não foi expressiva durante o período de cirrose, havendo praticamente a mesma quantidade desta proteína nos animais do grupo C+AG (0,59) e C (0,42), respectivamente. (Fig. 5A) Em relação ao p65 NFκB, houve importante diminuição em sua expressão tanto no grupo F+AG (0,38), quanto no grupo C+AG (0,29) em relação aos seus respectivos controles (1,27 e 0,68). (Fig. 5B) Estas análises podem ser visualizadas através das bandas protéicas expressas na figura 5C.

Figura 6 - Gráficos das expressões protéicas do P38 MAPK (A) e p65 NFκB (B), normalizadas pelo grupo SHAM. F= grupo fibrose; F+AG= grupo fibrose +ácido gálico; C= grupo cirrose; C+AG= grupo cirrose +ácido gálico. A figura C demonstra as bandas protéicas expressas para cada um destes marcadores nos diferentes grupos.

5. Discussão

Os resultados encontrados pelo presente estudo demonstraram evidências de atividade anti-fibrogênica do AG nos diferentes parâmetros avaliados, tanto no período de fibrogênese quanto na cirrose já estabelecida.

Para se abordar mais detalhadamente as possíveis conseqüências e mecanismos implicados nestes achados, há que se recordar primeiramente que a produção de algumas proteínas se altera drasticamente durante o processo de ativação das CEH e fibrogênese hepática. A α -SMA, uma das seis isoformas de actina expressa em tecidos de mamíferos, constitui-se em uma proteína de citoesqueleto presente nas células musculares lisas vasculares e miofibroblastos, ou fibroblastos contráteis, onde está localizada dentro de feixes microfilamentares (FRIEDMAN, 2010). Conforme referido anteriormente, a α -SMA se torna super-expressa nas CEH após o processo de ativação (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006), conferindo a estas uma característica de maior contratilidade (REYNAERT; URBAIN; GEERTS, 2008). Considerando-se ainda que a α -SMA está ausente em outras células hepáticas residentes no fígado normal ou injuriado, exceto nas células do músculo liso ao redor dos grandes vasos, o estudo da expressão desta proteína representa um marcador importante para a detecção do processo de ativação das CEH (BATALLER; BRENNER, 2005; FRIEDMAN, 2010). Além disso, a identificação de uma maior quantidade de células marcadas pela α -SMA traduz-se em um maior número de CEH ativadas e por conseqüência, em um aumento na fibrogênese hepática. Assim, a diminuição das células α -SMA positivas observada nos animais tratados, quer seja durante o período de indução de fibrose, quer seja nos casos de cirrose já estabelecida, embora tenha ocorrido de maneira mais importante neste último grupo, comprova o efeito do AG tanto inibindo como regredindo o desenvolvimento da fibrose hepática.

Uma das principais conseqüências da transdiferenciação e proliferação das CEH, induzidas por diferentes vias sinalizadoras (fibrogênicas, mitogênicas e inflamatórias), é a deposição e substituição excessiva dos hepatócitos necróticos ou apoptóticos por fibras colágenas, principalmente as do tipo I, III e IV (BATALLER; BRENNER, 2005; TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; LEE; FRIEDMAN, 2011). Apesar da produção de outros tipos de colágeno e do crescente número de

diferentes tipos de colágenos identificados no fígado, os dois colágenos mais comumente associados à fibrose e que são drasticamente aumentados são os tipos I e III. Durante o processo fibrogênico, observa-se, tanto em níveis protéicos quanto em mRNA, que há um aumento mais dramático no colágeno tipo I em relação ao tipo III (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006). Assim, um outro sinal relevante a ser considerado no processo de fibrogênese hepática, é a avaliação dos níveis de colágeno, principalmente do tipo I, que pode ser estimado *in loco* pela quantificação de áreas marcadas pelo *Sirius red* ou pelo método quantitativo através da expressão gênica do pró-colágeno $\alpha 1(I)$ (SANCHO-BRU et al., 2007). No presente estudo, foi possível observar a intensa atividade anti-fibrogênica do AG, reduzindo os depósitos de colágeno detectados nas preparações pelo *Sirius red*. Do mesmo modo, o AG promoveu diminuição na expressão gênica de pró-colágeno $\alpha 1(I)$. Embora se tenha encontrado também este efeito sob a forma de regressão da cirrose, os achados mais evidentes ocorreram no grupo onde havia apenas fibrose, ou seja, o AG atua principalmente prevenindo a cirrose.

Além disso, o processo de fibrose hepática é um reflexo do balanço entre a produção e a degradação de proteínas da MEC (BATALLER; BRENNER, 2005; FRIEDMAN, 2010). Um elemento crítico no remodelamento da MEC é uma família de metaloproteinases de matriz (também conhecida como matrixinas). Estas são enzimas dependentes de cálcio e zinco (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006) que degradam especificamente colágenos e substratos não colagenosos. Como regra geral, as metaloproteinases se enquadram em cinco categorias com base em sua especificidade de substrato: collagenases intersticiais (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9, e proteína de ativação de fibroblastos), estromelisinases (MMP-3, -7, -10, -11), do tipo de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25), e metaloelastase (MMP-12). É importante ressaltar que um fator determinante para o desenvolvimento da fibrose hepática é o acúmulo intersticial do colágeno tipo I, sendo a MMP-1 a principal responsável por sua degradação (BATALLER; BRENNER, 2005; FRIEDMAN, 2010). Em contrapartida, existem uma família de proteínas que possuem a função de inibir a atividade das metaloproteinases, chamadas de inibidores de metaloproteinases ou TIMPs (BATALLER; BRENNER, 2005; TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; RAMACHANDRAN; IREDALE, 2009). As próprias CEH secretam os TIMP-1 e TIMP-2, e sua presença durante a lesão

hepática pode inibir a atividade de collagenases intersticiais, levando a uma degradação reduzida da MEC acumulada (FRIEDMAN, 2010).

A produção do TIMP-1 é diretamente proporcional ao processo de ativação das CEH, ou seja, esta proteína sofre um aumento significativo de sua expressão em virtude de um maior número de CEH ativadas, causando uma conseqüentemente inibição da ação da MMP-1 e incremento nos depósitos de colágeno (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; LEE; FRIEDMAN, 2011). Outra função significativa do TIMP-1 é sua atividade anti-apoptótica nas CEH, aumentando sua população ativada e agravando o quadro fibrótico (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; FRIEDMAN, 2010). Ainda, o estudo quantitativo da expressão gênica do TIMP-1 é importante para se estimar a dimensão do processo de fibrogênese hepática, quer durante a instalação e até mesmo nos caso de regressão da fibrose (SANCHO-BRU et al., 2007). Em conclusão, uma menor quantidade de TIMP-1 conduziria a duas implicações principais: diminuição dos depósitos de colágeno e do número de CEH ativadas. Tal afirmativa está em acordo com o presente estudo, onde foi observada redução na expressão gênica de TIMP-1, em consonância com a diminuição no número de CEH ativadas e de depósitos de colágeno nos animais tratados com AG tanto na prevenção quanto na regressão da cirrose.

Além dos mecanismos que permitem a detecção do aumento ou diminuição dos depósitos de colágeno, é possível também avaliar os diversos fatores associados à ativação das CEH, como por exemplo, as citocinas. As citocinas em particular, modulam a resposta inflamatória à lesão e a indução de fibrose *in vivo* e *in vitro*. Dentre as principais citocinas, destaca-se o TGF- β 1 o qual desempenha importantes funções no processo da fibrogênese hepática em humanos (BATALLER; BRENNER, 2005; LIU; HU; YIN, 2006). O TGF- β 1 é reconhecidamente o mais potente fator estimulador da fibrose hepática, com sua principal origem a partir das CEH ativadas (LIU; HU; YIN, 2006; TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; LEE; FRIEDMAN, 2011). Conforme reportado anteriormente, o TGF- β 1 atua de forma parácrina e autócrina, favorecendo a transdiferenciação das CEH para o fenótipo semelhante a miofibroblastos, estimulando a síntese de proteínas da MEC, e inibindo a sua degradação (LEE; FRIEDMAN, 2011). Mesmo que antagonizar terapêuticamente o TGF- β 1 possa ser um grande desafio devido ao seu papel anti-inflamatório e regulador de crescimento celular em fígados normais (LEE; FRIEDMAN, 2011), estratégias destinadas a

romper sua síntese e/ou vias de sinalização podem diminuir acentuadamente a fibrose hepática em modelos experimentais (BATALLER; BRENNER, 2005; LIU; HU; YIN, 2006).

De qualquer forma, a avaliação quantitativa da expressão gênica do TGF- β 1 pode ser considerado um método fidedigno para se abordar um importante mecanismo de ativação da fibrogênese hepática. No presente estudo, o AG foi capaz de reduzir a expressão gênica de TGF- β 1, neste caso, suprimindo sobretudo sua função pró-fibrogênica, visto que houve consequente diminuição de depósitos fibróticos e de CEH ativadas nos animais tratados tanto no período de desenvolvimento da fibrose, quanto na fase cirrótica, proporcionando sua atenuação.

As vias de sinalização intracelular são também importantes na fibrogênese hepática, como por exemplo, os fatores de transcrição. Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a sítios específicos de reconhecimento de alguns genes, no sentido de ativar ou amplificar a transcrição desses genes. Originalmente identificado em linfócitos B, o fator nuclear da cadeia “kappa” de linfócitos B (NF- κ B) é encontrado em quase todos os tipos celulares, incluindo hepatócitos e células hepáticas não parenquimatosas, como as CEH (MANN; SMART, 2002). O NF κ B normalmente é retido no citoplasma sob uma forma inativa através da interação com proteínas inibitórias I κ B. A ativação do NF κ B está associada com fosforilação e subsequente degradação do I κ B. O complexo NF κ B ativado se transloca para o núcleo, onde passa a regular a expressão gênica através de sua ligação com os sítios κ B. Este fenômeno ocorre após exposição das células a lipopolissacárides (LPS), citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a interleucina 1, estresse oxidativo e outros estímulos patogênicos (BALDWIN, 1996; CIMINO et al., 1997; ALMEIDA et al., 2009).

Mais especificamente, as ROS estimulam as demais vias de estresse oxidativo, tais como p38 MAPK, JNK e ERK, que por sua vez ativam citocinas, como o TNF- α . Estas citocinas são responsáveis pela ativação do NF κ B, o qual passa a induzir a transcrição gênica de várias proteínas, especialmente do TGF- β 1, apontado anteriormente como sendo o mais potente fator estimulador de fibrose hepática (LIU et al., 2009; WENG et al., 2009). Esta atividade DNA-ligante do NF κ B ocorre em CEH ativadas, mas não em CEH quiescentes (SCHRECK; ALBERMANN; BAEUERLE, 1992). Todas essas ponderações suportam o papel crucial que o NF κ B

possui na ativação das CEH, e consequentemente na fibrogênese hepática, além de sua suscetibilidade às ROS.

No presente estudo foi observada significativa redução na quantidade de p65 NFκB, sua forma ativada, nos animais tratados com AG tanto no período de desenvolvimento da fibrose, quanto na cirrose já estabelecida, o que se correlacionou com todos os outros parâmetros de fibrogênese analisados. E ainda, os picos protéicos do p65 NFκB tanto para os animais tratados com AG, quanto para seus respectivos controles, foram mais evidentes no período de indução que na cirrose estabelecida. Como o p65 NFκB é considerado um fator de transcrição pró-inflamatório em resposta ao estresse oxidativo (BALDWIN, 1996; CIMINO et al., 1997; LEE; FRIEDMAN, 2011), estes achados sugerem um possível efeito anti-inflamatório do AG, mais acentuado na fase precoce de exposição ao CCL₄.

Outro mecanismo intracelular que implica em fibrogênese hepática desencadeada por estresse oxidativo é o da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) de sinalização em cascata, a qual representa uma via de interação intracelular que está estimulada em CEH ativadas. Membros da família MAPK, incluindo a quinase extracelular regulada (ERK), a quinase c-jun N-terminal/proteína quinase-1 ativada por estresse (JNK/SAPK-1), e p38 MAPK são ativadas por vários fatores de crescimento e estresse, e posteriormente translocadas para o núcleo (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; LIN et al., 2010). Em sua fase intranuclear, sofrem fosforilação e ativam diversos fatores de transcrição, resultando em diferentes respostas celulares, incluindo proliferação, diferenciação, e regulação de vias metabólicas específicas. A via de sinalização em cascata p38 MAPK, por exemplo, é ativada em resposta a fatores de crescimento, choque térmico e injúria por isquemia/reperfusão. O TGF-β1 age como mediador das MAPK quinases-6 e 3 (MKK6 e MKK3) e da quinase-1 ativada por TGF-β1 (TAK-1) de modo diretamente proporcional à quantidade de p38 MAPK secretada, levando a sua fosforilação. Uma vez ativada, a p38 MAPK interage também com outros fatores indutores de transcrição, funcionando como mais uma via de ativação e proliferação das CEH (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006). Assim, uma maior quantificação da proteína p38 MAPK em sua forma ativada é compatível com um aumento no desenvolvimento da fibrose hepática (SANCHO-BRU et al., 2007). O tratamento com AG induziu à intensa redução na expressão de p38 MAPK durante a fibrogênese

hepática. Todavia, tal efeito não foi observado em vigência de cirrose já estabelecida.

Quando os achados do atual estudo são considerados em conjunto pode-se perceber claramente o efeito do AG sobre os parâmetros diretamente relacionados à fibrose hepática, como no caso da diminuição na população de células α -SMA positivas, redução dos depósitos de colágeno, menor expressão gênica de colágeno $\alpha 1(I)$, TIMP-1 e TGF- $\beta 1$. Todavia, alguns resultados aparentemente divergentes requerem uma abordagem minuciosa, principalmente se forem considerados os dois períodos distintos de utilização do AG. Talvez, a raiz das possíveis diferenças se baseie na discrepância de produção do TGF- $\beta 1$ sob estímulos inflamatórios mais agudos ou mais estabilizados. Os valores da expressão gênica de TGF- $\beta 1$ foram maiores tanto para os animais tratados com AG quanto para os respectivos controles na fase de indução de fibrose quando comparados com seus equivalentes já cirróticos.

É possível que este fenômeno esteja associado à resposta inflamatória mais intensa observada nos períodos mais precoces, o que estimularia a produção de maior quantidade de TGF- $\beta 1$. Já na fase cirrótica o estímulo inflamatório atingiria níveis mais estáveis devido a sua cronicidade, não respondendo com grandes aumentos na expressão gênica de TGF- $\beta 1$. Inclusive, o próprio modelo experimental preconiza interrupção da exposição ao CCl₄ após as oito semanas de estabelecimento da cirrose, para permitir o tratamento por mais duas semanas. Esta constatação, provavelmente está relacionada a não diminuição da expressão proteica do p38 MAPK na fase cirrótica, uma vez que as quantidades de p38 MAPK estão diretamente associadas às de TGF- $\beta 1$ (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006).

Assim, esta não diminuição na expressão de p38 MAPK nos animais cirróticos tratados com AG talvez esteja correlacionada aos menores picos de expressão gênica do TGF- $\beta 1$ observados na fase de cirrose, uma vez comparados com o período de fibrogênese, não atingindo uma amplitude suficiente dos níveis proteicos de p38 MAPK para se observar diferenças significativas entre os grupos cirróticos tratados ou não com o AG.

Como altos níveis de TGF- $\beta 1$ está intimamente relacionado com um maior número de CEH ativadas (BATALLER; BRENNER, 2005) e a apoptose de CEH ativadas secundária a produtos de estresse oxidativo, como íons de superóxido, seja dependente do aumento na produção de p38 MAPK (JAMEEL et al., 2009), restaria

uma dúvida a ser esclarecida. Se os picos de TGF- β 1 foram tão discretos na fase de cirrose em relação à de fibrose, a ponto de não determinar variações com a expressão protéica de p38 MAPK, o que poderia explicar uma diminuição tão acentuada no número de CEH ativadas nos animais cirróticos tratados com AG?

Na verdade, embora não tenham sido observadas diferenças evidentes entre as quantidades protéicas de p38 MAPK nos animais cirróticos tratados ou não com AG, o AG não reduziu de modo significativo a produção desta proteína a ponto de impedir a ocorrência de apoptose das CEH via p38MAPK. Todavia, como a produção de p38MAPK foi pequena na fase cirrótica, não é possível considerar esta proteína como principal responsável pela diminuição numérica de CEH ativadas neste período. Por outro lado, o NF κ B é também um conhecido fator anti-apoptótico, inclusive para as CEH (BRAZ et al., 2010). Desta forma, é possível que a restrição na produção do NF κ B determinada pelo tratamento com AG, não apresentou apenas efeito anti-inflamatório, mas coibiu o papel anti-apoptótico do NF κ B sobre as CEH, sobretudo nos casos de cirrose estabelecida, acarretando uma redução mais expressiva no número de células α -SMA positivas nestes animais. E ainda, como a produção de NF κ B é diretamente proporcional à de TGF- β 1 (LIU et al., 2009; LIN et al, 2010), e TGF- β 1 é o principal indutor de ativação e proliferação de CEH (LEE; FRIEDMAN, 2011), os baixos níveis de TGF- β 1 em associação à diminuição proteica de p65 NF κ B induzida pelo AG, pode ter resultado também em redução na ativação e proliferação das CEH. Assim, o menor número de CEH ativadas observado nos animais tratados com AG, principalmente no grupo cirrótico, pode estar relacionado à restrição na produção de p65 NF κ B, tanto limitando seu efeito anti-apoptótico sobre as CEH ativadas, quanto impedindo a ativação de TGF- β 1, com consequente diminuição na ativação e proliferação sobre estas células.

6. Conclusões

Os achados do presente estudo, considerando os diversos parâmetros diretamente relacionados à fibrose hepática, como no caso da diminuição na população de células α -SMA positivas, redução dos depósitos de colágeno I, menor expressão gênica de colágeno $\alpha 1(I)$, TIMP-1 e TGF- $\beta 1$, demonstram o efeito do AG sobre a prevenção e reversão do processo fibrogênico hepático. Os principais mecanismos deste processo envolvem atividades anti-inflamatórias via TGF- $\beta 1$ e p38 MAPK, principalmente durante a indução de fibrose; assim como restrição da capacidade anti-apoptótica do NF κ B sobre as CEH ativadas na cirrose já estabelecida, corroborando a hipótese de potencial inibitório e regressor do AG no processo fibrogênico hepático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ADACHI, T.; TOGASHI, H.; SUZUKI, A.; KASAI, S.; ITO, I.; SUGAHARA, K.; KAWATA, S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology*, v. 41, n. 6, p. 1272-1281, 2005.

ALMEIDA, I. F.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L .F. C.; COSTA, P. C.; BAHIA, M. F. In vitro protective effect of hypericumandrosaemumextract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 105, p. 222-207, 2009.

ARAM, G.; POTTER, J.J.; LIU, X.; WANG, L.; TORBENSON, M.S; MEZEY, E. Deficiency of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form Oxidase Enhances Hepatocellular Injury But Attenuates Fibrosis After Chronic Carbon Tetrachloride Administration. *Hepatology*, v. 49, n. 3, p. 911-919, 2009.

BALDWIN, A. S. JR. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol*, v. 14, p. 649–683, 1996.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest*, v. 115, p. 209-218, 2005.

BRAZ, M. M.; RAMALHO, F. S.; CARDOSO, R. L; ZUCOLOTO, S.; COSTA, R. S.; RAMALHO, L. N. Slight activation of nuclear factor kappa-B is associated with increased hepatic stellate cell apoptosis in human schistosomal fibrosis. *Acta Trop*, v. 113, n .1, p. 66-71, 2010.

BRENNER, D. A.; WATERBOER, T.; CHOI, S.K.; LINDQUIST, J.N.; STEFANOVIC, B.; BURCHARDT, E.; YAMAUCHI, M.; GILLAN, A.; RIPPE, R. A. New aspects of hepatic fibrosis. *J. Hepatol*, v. 32 (1 Suppl), p. 32-38, 2000.

CALLEA, F.; BRISIGOTTI, M.; FABBRETTI, G.; SCIOT, R.; VAN EYKEN, P.; FAVRET, M. Cirrhosis of the liver. A regenerative process. *Dig. Dis. Sci*, v. 36, n. 9, p. 1287-1293, 1991.

CÁRDENAS, A.; GINÈS, P. Management of patients with cirrhosis awaiting liver transplantation. *Gut*, v. 60, n. 3, p.412-421, 2011.

CHOJKIER, M.; HOUGLUM, K.; SOLIS-HERRUZO, J.; BRENNER, D. A. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts: a role for lipid peroxidation? *J Biol Chem*, v. 264, n. 28, p. 16957-16962, 1989.

CHUANG, C. Y.; LIU, H. C.; WU, L. C.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. T. Gallic acid induces apoptosis of lung fibroblasts via a reactive oxygen species-dependent ataxia telangiectasia mutated-p53 activation pathway. *J Agric Food Chem*, v. 58, n. 5, p. 2943-2951, 2010.

CIMINO, F.; ESPOSITO, F.; AMMENDOLA, R.; RUSSO, T. Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr. Top. Cell. Regul.*, v. 35, p. 123–148, 1997.

FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J GIRÃO DA CRUZ, M. T.; CORDEIRO, M. N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties- a structural- activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acid. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 13, n. 13, p. 3581-3589, 2004.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008.

FRIEDMAN, S.L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, v. 7, p. 425-436, 2010.

FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem*, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.

FRIEDMAN, S.L.; BANSAL, M.B. Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? *Hepatology*, v. 43 (2 Suppl 1), p. S82-S88, 2006.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis*, v. 21, n. 3, p. 311-335, 2001.

GUIMOND, A.; TELETIN, M.; GARO, E.; D'SA, A.; SELLOUM, M.; CHAMPY, M.F.; VONESCH, J.L.; MONASSIER, L. Quantitative ultrasonic tissue characterization as a new tool for continuous monitoring of chronic liver remodelling in mice. *Liver Int*, v. 27, p. 854-864, 2007.

HA, H.L.; SHIN, H.J; YU, D.Y. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol*, v. 16, n. 48, p. 6035-43, 2010.

HEMINGWAY, R.W.; GROSS, G.G.; YOSHIDA, T. *Plant Polyphenols: Chemistry and Biology*. New York: Plenum Press, 1999.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Ver. Pathol*, v.6, p. 425-456, 2011.

HSU, C.L.; YEN, G. C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br. J. Nutr*, v. 98, n. 4, p. 727-735, 2007.

JAMEEL, N. M.; THIRUNAVUKKARASU, C.; WU, T.; WATKINS, S .C.; FRIEDMAN, S. L, GANDHI, C. R. p38-MAPK- and caspase-3-mediated superoxide-induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: reversal by retinoic acid. *J Cell Physiol*, v. 218, n. 1, p. 157- 166, 2009.

KAWADA, N. The hepatic perisinusoidal stellate cell. *Histol. Histopathol*, v. 12, n. 4, p. 1069-1080, 1997.

KAWADA, N.; TRAN-THI, T.-A.; KLEIN, H.; DECKER, K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances: possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur. J. Biochem*, v. 213, n. 2, p. 815-823, 1993.

KNITTEL, T.; KOBOLD, D.; PISCAGLIA, F.; SAILE, B.; NEUBAUER, K.; MEHDE, M.; TIMPI, R.; RAMADORI, G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and disease rat livers: distinct roles of myofibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem. Cell Biol*, v. 112, n. 5, p. 387-401, 1999.

KNOOK, D.L.; SEFFELAAR, A.M.; DE LEEUW, A.M. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp. Cell Res*, v. 139, n. 2, p. 468-471, 1982.

LEE, U.E.; FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, v. 25, p. 195-206, 2011.

LIN, W.; TSAI, W.L.; SHAO, R.X.; WU, G.; PENG, L.F.; BARLOW, L.L.; CHUNG, W.J.; ZHANG, L.; ZHAO, H.; JANG, J.Y.; CHUNG, R.T. Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. *Gastroenterology*, v. 138, p. 2509-2518, 2010.

LIU, X.; HU, H.; YIN, J. Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int*, v. 26, p. 8-22, 2006.

LIU, Y.; WEN, X. M.; LUI, E. L. H.; FRIEDMAN, S. L.; CUI, WEI.; HO, N. P. S.; LI, LEI.; YE, TAO.; FAN, S. T.; ZHANG, H. Therapeutic targeting of the PDGF and TGF- β - signaling pathways in hepatic stellate cells by PTK787/ZK22258. *Lab Invest*, v. 89, n. 10, p. 1152-1160, 2009.

MAHER, J. J. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin. Liver Dis*, v. 21, n. 3, p. 417-426, 2001.

MAHER, J.J.; TZAGARAKIS, C.; GIMENEZ, A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol*, v. 29, n. 5, p. 605-610, 1994.

MANN, D. A.; SMART, D. E. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*, v. 50, n. 6, p. 891-896, 2002.

MARRA, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J. Hepatol*, v. 31, n. 6, p. 1120-1130, 1999.

MORENO, M.; RAMALHO, L. N.; SANCHO-BRU, P.; RUIZ-ORTEGA, M.; RAMALHO, F.; ABRALDES, J.G.; COLMENERO, J.; DOMINGUEZ, M.; EGIDO, J.; ARROYO, V.; GINÈS, P.; BATALLER, R. Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, v. 296, n. 2, p. G147-156, 2009.

NAMKUNG, W.; THIAGARAJAH, J. R.; PHUAN, P. W.; VERKMAN, A. S. Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^- channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea. *FASEB J*, v. 24, n. 11, p. 4178-4186, 2010.

NOVO, E.; PAROLA, M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, v. 1, n. 1, p. 1-58, 2008.

OW, Y.Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab*, v. 4, n. 3, p. 241-248, 2003.

PHAN, T.T.; SUN, L.; BAY, B.H.; CHAN, S.Y.; LEE, S.T. Dietary compounds inhibit proliferation and contraction of keloid and hypertrophic scar-derived fibroblasts in vitro: therapeutic implication of excessive scarring. *J Trauma*, v. 54, n. 6, p. 1212-1224, 2003.

PINZANI, M.; MARRA F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis*, v. 21, n. 3, p. 397-416, 2001.

PINZANI, M.; MARRA, F.; CARLONI, V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver*, v. 18, n. 1, p. 2-13, 1998.

POVERO, D.; BUSLETTA, C.; NOVO, E.; DI BONZO, L.V.; CANNITO, S.; PATERNOSTRO, C.; PAROLA, M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol. Histopathol*, v. 25, n.8, p. 1075-1091, 2010.

RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J. P. Reversibility of liver fibrosis. *Ann. Hepatol*, v. 8, p. 283-291, 2009.

RAPPAPORT, A.M.; BOROWY, Z.J.; LOUGHEED, W.M.; LOTTO, W.N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. *Anat. Rec*, v. 119, n. 1, p. 11-33, 1954.

REYNAERT, H.; URBAIN, D.; GEERTS, A. Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat. Rec. (Hoboken)*, v. 291, p. 693-698, 2008.

RIPPE, R. A. Life or death: the fate of the hepatic stellate cell following hepatic injury. *Hepatology*, v. 27, n. 5, p. 1447-1448, 1998.

SAMEERMAHMOOD, Z. S.; RAJI, L.; SARAVANAN, T.; VAIDYA, A.; MOHAN, V.; MUTHUSWAMY, B. Gallic acid protects RINm5F β -cells from glucolipotoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions. *Phytother. Res. Suppl*, v. 24, n. S1, p. S83-94, 2010.

SANCHO-BRU, P.; BATALLER, R.; FERNANDEZ-VARO, G.; MORENO, M.; RAMALHO, L. N.; COLMENERO, J.; MARÍ, M.; CLÀRIA, J.; JIMÉNEZ, W.; ARROYO, V.; BRENNER, D. A.; GINÈS, P. Bradykinin attenuates hepatocellular

damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. *Gastroenterology*, v. 133, n. 6, p. 2019-2028, 2007.

SCHNABL, B.; PURBECK, C. A.; CHOI, Y.H.; HAGEDORN, C.H.; BRENNER, D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*, v. 37, n. 3, p. 653-664, 2003.

SCHRECK, R.; ALBERMANN, K.; BAEUERLE, P. A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic. Res. Commun*, v. 17, n. 4, p. 221-237, 1992.

SOON, R. K JR.; YEE, H. F JR. Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target. *Clin. Liver Dis*, v. 12, n. 4, p. 791-803, 2008.

SPRENGER, H.; KAUFMANN, A.; GARN, H.; LAHME B.; GEMSA, D.; GRESSNER, A. M. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, v. 113, n. 1, p. 277-285, 1997.

SUTRA, T.; OIRY, C.; AZAY-MILHAU, J.; YOUL, E.; MAGOUS, R.; TEISSÈDRE, P. L.; CRISTOL, J. P.; CROS, G. Preventive Effects of Nutritional Doses of Polyphenolic Molecules on Cardiac Fibrosis Associated with Metabolic Syndrome: Involvement of Osteopontin and Oxidative Stress. *J Agric Food Chem*, v. 56, n. 24, p. 11683-11687, 2008.

TSUKADA, S.; PARSONS, C. J.; RIPPE, R. A. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta*, v. 364, p. 33-60, 2006.

WENG, T. C.; SHEN, C. C.; CHIU, Y. T.; LIN, Y. L.; KUO, C. K.; HUANG, Y. T. Inhibitory effects of artemepavine against hepatic fibrosis in rats. *J Biomed Sci*, v. 16, p. 78, 2009.

ZHAO, J.; IKHLAS, A.K.; FRONCZEK, F.R. Gallic acid. *Acta Cryst*, 2011.

ZIMMERMANN, A.; ZIMMERMANN, H.; FELLAY, M.; REICHEN, J. Cells with morphological and immunohistochemical features of hepatic stellate cells (Ito cells) form an extralittoral (extrasinusoidal) compartment in the cirrhotic rat liver. *Histol. Histopathol*, v. 14, n. 3, p. 719-727, 1999.