

Daniela Bonzanini de Lima<sup>1</sup>, Mariana Ilha<sup>1</sup>, Leo Anderson Meira Martins<sup>1</sup>, Moema Queiroz Vieira<sup>1,2</sup>, Radovan Borojevic<sup>3</sup>, Carmem Gottfried<sup>1</sup>, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma<sup>1</sup> (orient.) (UFRGS).

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

## Introdução

As doenças hepáticas representam as manifestações patológicas mais comuns e figuram entre os maiores problemas mundiais de saúde [1]. Danos crônicos ao fígado, causados, entre outros fatores, por estresse oxidativo, levam a um processo de cicatrização que pode resultar em fibrose hepática. Esta é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), em especial colágeno tipo I e III, devido ao desequilíbrio entre sua produção e degradação [2,3]. As células estreladas hepáticas (HSC) possuem papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática e se caracterizam por expressar dois fenótipos: *Quiescente* (Lipócito com baixa proliferação e pouca produção de MEC), associado ao estado normal do fígado; e *Ativado* (Miofibroblasto com alta proliferação e produção de MEC, caracterizado pela perda da capacidade de armazenamento de lipídios), associado com o estado patológico fibrogênico [Figura 1] [4].

A linhagem celular GRX é representativa das HSC. Estas células apresentam um fenótipo ativado intermediário e podem ser induzidas a expressarem o fenótipo quiescente durante o tratamento com retinol ou indometacina [5,6]. Quando expostas a algumas citocinas, fatores de crescimento e/ou estresse oxidativo, a GRX responde com a modulação para o fenótipo miofibroblástico ativado [Figura 2] [7]. O Resveratrol (RSV - 3,4',5-tri-hidroxi-trans-estilbeno) é uma fitoalexina presente na casca

de uvas vermelhas e nos vinhos tintos. Trata-se de um polifenol que pode se apresentar sob duas formas isoméricas (*cis* e *trans*-resveratrol [Figura 3], que está associado a muitos efeitos benéficos à saúde devido suas diversas propriedades, entre estas, a antioxidante. Recentemente, tem se discutido uma possível ação pró-oxidante do RSV [8-10]. Anteriormente, mostramos que o resveratrol estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), a lipoperoxidação e a migração das células GRX.

Em trabalho anterior, foi constatado o potencial pro-oxidante do RSV sobre a linhagem GRX, bem como um aumento de atividade da Superóxido Dismutase (SOD) ao longo de 120 horas de tratamento. Este é um trabalho preliminar que visa o estudo dos efeitos do Resveratrol sobre a biogênese e atividade de mitocôndrias na linhagem celular GRX, representativa de HSC.

## Materiais e Métodos

### Cultura Celular

As células GRX foram obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram estabelecidas culturas que receberam meio Dulbecco's (DMEM, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Campinas, SP) e tampão 2g/L HEPES, pH 7,4, sob atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para o tratamento, foram divididos 5 grupos: o primeiro recebeu apenas o meio (controle) e os demais receberam as concentrações 0,1, 0,5, 1, 10, 50 µM de RSV, diluídos sequencialmente no referido meio. Para o estudo, foi estabelecido um modelo de exposição aguda (24 horas) e um modelo de exposição crônica (120 horas) ao RSV nas concentrações mencionadas.

### Biogênese mitocondrial

A avaliação de biogênese de mitocôndrias foi realizada usando os marcadores fluorescentes Mitotracker Green (MTG) e Mitotracker Orange (MTO). Terminado o tempo de tratamento, as células foram incubadas com meio contendo 100 nM de MTG ou MTO por 30 minutos. A leitura de fluorescência foi realizada em fluorômetro de placas M5, com parâmetros de Emissão e Excitação de 488 nm e 520 nm para MTG e .....para MTO. Os resultados foram expressos como unidades relativas de fluorescência (URF).

### Microscopia Confocal

As células GRX foram cultivadas e tratadas sobre lâminulas dispostas em placas de 24 poços. Após o período de tratamento, foi realizada a incubação com meio contendo 100 nM de Mitotracker Green (MTG) por 30 minutos. As células foram então lavadas e após fixadas com Paraformaldeído 0,4 %, e as lâminulas foram montadas para observação em microscópio Confocal.

### Análise de proteínas

A quantidade de proteínas foi analisada pelo método descrito por Peterson [11].

### Análise estatística

Foi realizada por ANOVA de uma via [p<0,05] seguido do teste de Duncan e ANOVA de duas vias [p<0,01]. Os experimentos foram realizados em quadruplicada e os resultados foram expressos como média ± o erro padrão.

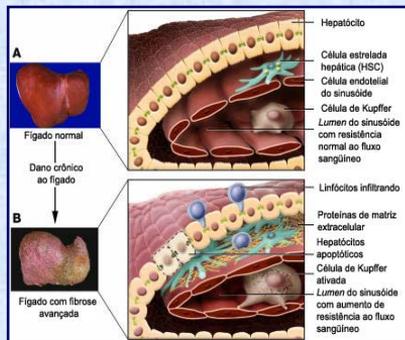


Figura 1: Mudança da arquitetura hepática (A), associadas ao avanço da fibrose hepática (B) [2].

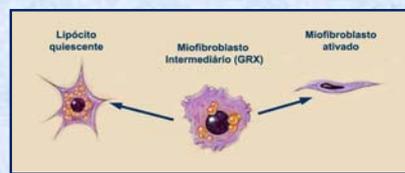


Figura 2: Ativação e modulação fenotípica das células GRX [7].

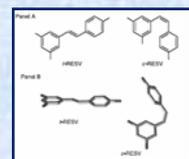


Figura 3: Estruturas moleculares químicas (A) e tridimensionais (B) isoméricas do Resveratrol [10].

## Resultados

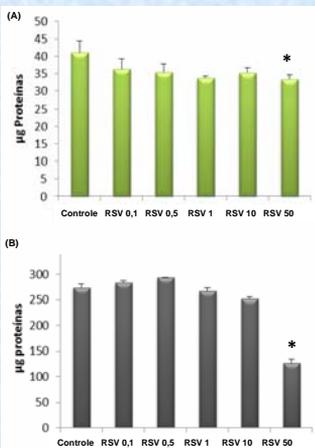


Figura 4: Análise proteômica. Conteúdo celular diminuído em 24 horas (A) e 120 horas (B). (Média ± E.P., P< 0,05)

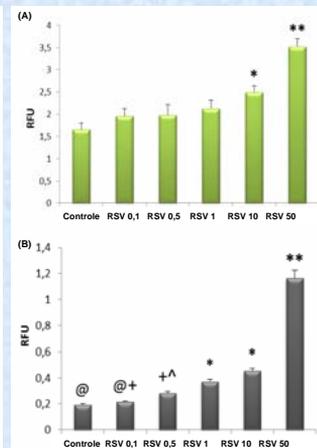


Figura 5: Análise da biogênese de mitocôndria com Mitotracker Green. Aumento de fluorescência observada no tratamento com 10 e 50 µM de RSV em 24 horas (A), e em todos os tratamentos em 120 horas (B). (Média ± E.P., P< 0,05)

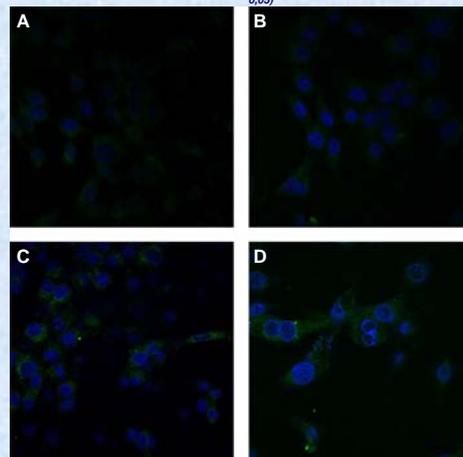


Figura 6: Imagens de microscopia confocal. Análise da biogênese de mitocôndria em 24 horas com Mitotracker Green. (A) Controle, (B) RSV 0,1 µM, (C) RSV 10 µM, (D) RSV 50 µM.

## Conclusões

Houve aumento de massa mitocondrial atestado por marcação fluorescente nas células que receberam 10 e 50 µM de RSV em 24 horas

O mesmo aumento foi observado em 120 horas para todas as concentrações de tratamento com RSV

Esses resultados poderiam corroborar os dados obtidos no trabalho anterior quanto a indução pró-oxidativa e modulação positiva de atividade da SOD nas células tratadas com RSV.

Mais estudos são necessários para uma compreensão mais precisa dos efeitos do RSV sobre biogênese de mitocôndrias.

## Perspectivas

Imunoblotting para proteínas reguladoras de biogênese mitocondrial (mtTFA, NRF-1, PGC1-α)

Avaliação morfológica e quantitativa das mitocôndrias em células tratadas ou não com RSV através de microscopia eletrônica.

Mensurar atividade de SOD mitocondrial

Investigar efeitos do RSV sobre atividade Mitocondrial

## Referências

- Loersztajn S., Julien B., Teixeira-Clerc F., et al. 2005. Hepatic Fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. Annual review of pharmacology and toxicology 45, 605-28.
- Battaller R., Brenner D. A. 2005. Liver Fibrosis. The Journal of clinical Investigation 115, 209-218.
- Tsukada S., Parsons P. J. & Rippe R. A. 2006. Mechanism of Liver Fibrosis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 364, 33-60.
- Friedman S.L. 2008. Mechanism of hepatic fibrogenesis. Gastroenterology 134, 1655-1668.
- Monteiro A.N.A., Borojevic R. 1987. Interaction of human liver connective tissue cells, skin fibroblast and smooth muscle cells with collagen gels. Hepatology 7, 665-671.
- Da Silva F.M., Guimarães E.L.M., Grivich L et al. 2003. Hepatic stellate cell activation in vitro: cell cycle arrest at G2/M and modification of cell mobility. Journal of Cellular Biochemistry 90, 387-396.
- Guimarães E. L. M., Franceschi M. F. S., Grivich L et al. 2007. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. Liver International 26, 477-485.
- Shishodia S., Aggarwal B.B. Resveratrol: a polyphenol for all seasons. 2006. In: Bharat Aggarwal & Shishir Shishodia (org.). Resveratrol in health and disease. CRC Press pp.1-16.
- De la Lastra C.A., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanism and clinical implications. Biochemical Society Transactions 35, 1156-1161.
- Orallo F. 2006. Biological effects of cis-versus trans-resveratrol. In: Bharat Aggarwal & Shishir Shishodia (org.). Resveratrol in health and disease. CRC Press. pp. 577-602.
- Peterson G L. 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry. Analytical biochemistry 100, 201-220.