

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PPGMCS

EFEITOS ANTIFIBRÓTICOS DE ÁCIDO GÁLICO EM CÉLULAS  
ESTRELADAS HEPÁTICAS ATIVADAS

ALINE DANIELE SCHUSTER

PORTO ALEGRE, 2013.

ALINE DANIELE SCHUSTER

EFEITOS ANTIFIBRÓTICOS DE ÁCIDO GÁLICO EM CÉLULAS  
ESTRELADAS HEPÁTICAS ATIVADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, 2013.

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO

S395e Schuster, Aline Daniele

Efeitos antifibróticos de ácido gálico em células estreladas hepáticas ativadas / Aline Daniele Schuster. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

74 f.: il. Inclui artigo científico encaminhado para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. ÁCIDO GÁLICO. 2. FIBROSE HEPÁTICA. 3. CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS. 4. PROLIFERAÇÃO. 5. INFLAMAÇÃO. 6. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CULTURA CELULAR. I. Oliveira, Jarbas Rodrigues de. II. Título.

**CDD** 574.87

**CDU** 616.36-004(043.3)

**NLM** WI 725

*“Descobri como é bom chegar  
quando se tem paciência,  
e para se chegar onde quer que seja,  
aprendi que não é preciso dominar a força,  
mas a razão.  
É preciso, antes de mais nada, querer.*

*Um dia é preciso parar de sonhar,  
Tirar os planos das gavetas e,  
De algum modo, partir...”*

(Almir Klink)

## AGRADECIMENTOS

À DEUS por todos os dias da minha vida.

Aos meus pais, por tudo! Principalmente pelo amor incondicional, por me darem a oportunidade de estudar, de realizar meus sonhos e sempre acreditarem na minha capacidade de ir cada vez mais longe. Pai, mãe, muito obrigada!

Ao meu querido amigo, orientador e mestre Professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, por ter sido a primeira pessoa a acreditar no meu potencial, ter me acolhido com toda a sua generosidade, humildade e sabedoria. Serei eternamente grata pela ajuda, orientação, amizade e pelos diversos ensinamentos. Obrigada!

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

Ao Dr. Eduardo Cassel por fornecer o ácido gálico para a pesquisa

À todos os meus amigos que compartilharam minhas tristezas e sorrisos sempre dispostos a ajudar.

Ao Matheus por incentivar a ir mais longe e acreditar na minha capacidade, me dando forças para sempre continuar.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização de mais esta etapa. Muito obrigada a todos!

## RESUMO

A fibrose é uma doença crônica do fígado que representa uma das maiores causas de mortalidade humana e é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular em resposta à lesão hepática crônica. Importantes causas de lesões hepáticas crônicas são: hepatites virais, doenças metabólicas, doenças autoimunes e exposição a substâncias químicas, como álcool ou drogas. As células GRX são uma linhagem representativa das células estreladas hepáticas (HSC), que está associada ao desenvolvimento da fibrose que, em último estágio, é a cirrose. No fígado saudável, estas células apresentam um fenótipo quiescente ou lipocítico, caracterizado pela sua capacidade de armazenar gotículas lipídicas. O ácido gálico está envolvido em vários processos biológicos, tais como a inibição do crescimento celular e apoptose, além de possuir uma variedade de ações farmacológicas, incluindo as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana e antitumoral. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos *in vitro* do ácido gálico sobre o fenótipo das HSC. Os resultados obtidos mostraram que o ácido gálico é capaz de reduzir a proliferação celular, induzir o fenótipo quiescente nas HSCs pelo aumento de gotículas lipídicas, provavelmente pela ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama, bloqueio da sinalização de fator de transformação do crescimento beta 1 e diminuição da expressão do colágeno tipo I. Estes resultados demonstram que o ácido gálico pode ser um novo agente terapêutico para o tratamento de fibrose hepática.

Palavras-chave: ácido gálico, fibrose hepática, células estreladas hepáticas, proliferação, inflamação.

## ABSTRACT

Fibrosis is a chronic liver disease that is a major cause of human mortality and is characterized by the accumulation of extracellular matrix in response to chronic liver injury. Important causes of chronic liver injury are: viral hepatitis, metabolic diseases, autoimmune diseases and exposure to chemicals, such as alcohol or drugs. The GRX cells are a representative line of hepatic stellate cells (HSC), which is associated with development of fibrosis, in the last stage is the cirrhosis. In healthy liver, these cells exhibit a phenotype or quiescent lipocyte characterized by its ability to store lipid droplets. Gallic acid is involved in several biological processes such as cell growth inhibition and apoptosis also has a variety of pharmacological actions, including antioxidant activity, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor. The aim of this study was to investigate the in vitro effects of gallic acid on the phenotype of HSC. The results showed that gallic acid is able to reduce cell proliferation, induce quiescent phenotype in HSCs by increasing lipid droplets, probably by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma, decrease of transforming growth factor 1 signaling and decreased expression of collagen type I. These results demonstrate that the gallic acid may be a novel therapeutic agent for treating hepatic fibrosis.

Keywords: gallic acid, hepatic fibrosis, hepatic stellate cells, proliferation, inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	–	Ácido Gálico
DMEM	–	Meio Dulbecco modificado
GRX	–	Linhagem murina de células hepáticas estreladas
GSH	-	Glutathiona
HBV	–	Vírus da Hepatite B
HCV	–	Vírus da hepatite C
HSC	–	Célula estrelada hepática
LDH	–	Lactato desidrogenase
MEC	–	Matriz extracelular
MMP-2	–	Metaloproteinase de matriz 2
mRNA	-	RNA mensageiro
MTT	-	(brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)
NASH	–	Esteato hepatite não-alcoólica
PPAR $\gamma$	–	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama
SFB	–	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	–	Fator de transformação do crescimento beta



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1: Morfologia das células estreladas hepáticas em fígado normal. \_\_\_\_\_ 12
- FIGURA 2: Ativação da célula estrelada hepática. \_\_\_\_\_ 14
- FIGURA 3: Estrutura química do ácido gálico. \_\_\_\_\_ 16

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1- Efeito do AG sobre a viabilidade das células GRX em 24 horas e 6 dias. Viabilidade celular avaliada por um ensaio MTT. \_\_\_\_\_ 33
- FIGURA 2: Efeito do AG sobre a viabilidade das células GRX em 24 horas e 6 dias. Viabilidade celular avaliada pela contagem de células direta. \_\_\_\_\_ 34
- FIGURA 3: Porcentagem de sobrevivência pela liberação de lactato desidrogenase (LDH). \_\_\_\_\_ 35
- FIGURA 4: Coloração de Oil Red-O (ORO) em células GRX tratadas após 6 dias. \_\_\_\_\_ 36
- FIGURA 5: Dosagem de lipídios expressos espectrofotometricamente através da razão entre o valor de absorbância obtida por ORO e o número de células. \_\_\_\_\_ 37
- FIGURA 6: Expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  em células GRX tratadas durante 24 horas. \_\_\_\_\_ 38
- FIGURA 7: Ensaio de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de células tratadas de 24 horas e 6 dias. \_\_\_\_\_ 39
- FIGURA 8: Expressão do mRNA de colágeno do tipo I em células GRX tratados durante 24 horas. \_\_\_\_\_ 40

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 FIBROSE HEPÁTICA	11
1.2 CÉLULAS HEPÁTICAS ESTRELADAS	11
1.3 REVERSÃO E TRATAMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA	15
1.4 LINHAGEM CELULAR GRX	15
1.5 ÁCIDO GÁLICO	16
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO 2	19
<b>ARTIGO SUBMETIDO LIVER INTERNATIONAL - ÁCIDO GÁLICO INDUZ REVERSÃO FENOTÍPICA EM CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS ATIVADAS.</b>	<b>20</b>
CAPÍTULO 3	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXO	48
ARTIGO EM INGLÊS	49
COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	73

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fibrose Hepática

A fibrose hepática, após dano hepático, é caracterizada pela resposta cicatricial do fígado, através da produção e deposição excessiva da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno tipo I (1). As principais causas de fibrose hepática nos países industrializados incluem infecções crônicas virais como hepatite C (HCV) e hepatite B (HBV), abuso de álcool e esteato hepatite não alcoólica (NASH) (2). Ao sofrer lesões crônicas, há substituição progressiva do parênquima hepático por tecido cicatricial (3) ocorrendo a deposição de proteínas da MEC, formando uma cicatriz fibrosa por induzir uma distorção na arquitetura hepática, e conseqüentemente ao desenvolvimento de nódulos de hepatócitos em regeneração que se define como cirrose. A partir disto, há uma disfunção hepatocelular e aumento da resistência intra-hepática ao fluxo sanguíneo, o que resulta na insuficiência hepática e hipertensão portal, respectivamente (4).

O fígado possui uma capacidade regenerativa notável, sendo que as lesões progridem lentamente ao longo de décadas, pois tem a capacidade de restaurar qualquer perda de massa e ajustar as suas dimensões, enquanto ao mesmo tempo fornecer suporte completo para a homeostasia do corpo durante o processo regenerativo inteiro, onde o ritmo é influenciado por fatores genéticos e ambientais (5).

### 1.2 Células Estreladas Hepáticas

As Células Estreladas Hepáticas (HSC, do inglês, *Hepatic Stellate Cells*) foram descobertas por Kuppfer, em 1876 e caracterizadas quase um século depois por Ito e Nemoto, sendo também chamadas de lipócitos, células armazenadoras de vitamina A, células intersticiais ou células de Ito (6-8). Estão localizadas no espaço perisinusoidal de Disse. Classicamente este espaço define-se como uma zona limitada pelos hepatócitos e pela parede sinusoidal formada pelas células endoteliais sinusoidais (7-9). O espaço perisinusoidal de

Disse contém fibras nervosas e componentes da MEC como fibras de colágeno dos tipos I e III e componentes da membrana basal (10).

As HSC constituem 5-8% do número total de células hepáticas considerando as parenquimatosas (hepatócitos), endoteliais (sinusoidais e vasculares), células de Kupffer (macrófagos hepáticos) e as células epiteliais da via biliar. As HSC manifestam dois fenótipos distintos: miofibroblástico (quando estão ativadas) e lipocítico (quando estão quiescentes), como demonstrado na Figura 1. Quando expressam o fenótipo miofibroblástico estão essencialmente envolvidas com a produção da MEC e controle da homeostasia do tecido conectivo hepático. O aumento do número e ativação dos miofibroblastos hepáticos está associado a fibrose e cirrose (10).

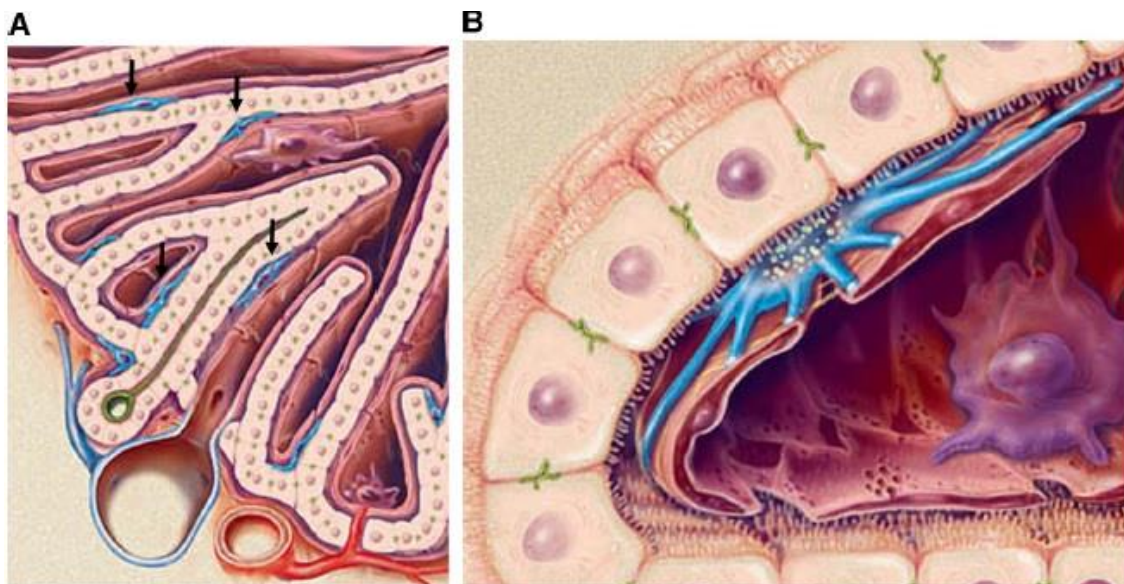


FIGURA 1: Morfologia das células estreladas hepáticas em fígado normal. A: diagrama da sinusóide hepática demonstrando a orientação relativa de células estreladas (em azul, indicado por setas) no sinusoidal arquitetura. B: desenho de alta resolução das células estreladas situado no espaço subendotelial. Adaptado de Friedman, S (11).

As mudanças no espaço perisinusoidal de Disse durante o desenvolvimento da fibrose em resposta a alguma lesão no fígado incluem alterações tanto no comportamento celular quanto na composição da MEC. A ativação das HSC leva a deposição de matriz fibrótica e perda das

microvilosidades dos hepatócitos precedendo a falência hepática. A ativação das células de Kuppfer tem ação parácrina sobre as HSC (12).

Expressando o fenótipo lipocítico, seu citoplasma se caracteriza por conter gotículas de gordura onde está a vitamina A (retinol) (6, 7, 9). Mais de 90% da vitamina A hepática, aproximadamente 80% do total do organismo é captada, armazenada e metabolizada nas HSC, que podem ser identificadas pela autofluorescência desta vitamina (8, 9).

O desenvolvimento de fibrose hepática é baseado na ativação das HSC que sofrem mudanças fenotípicas características. Essa ativação é um processo patológico que se caracteriza pela perda das gotículas de vitamina A, aumento de tamanho e do número de células além da diferenciação das HSC em células proliferativas, fibrogênicas, contráteis muito similares aos miofibroblastos (6, 9, 13).

A ativação das HSC consiste em duas subfases: iniciação e perpetuação, seguidas pela fase final chamada resolução (9). A iniciação, também conhecida como estágio pré-inflamatório, é resultante de alguns fatores como: estimulação parácrina por células vizinhas incluindo o endotélio sinusoidal, hepatócitos e plaquetas, ativação das metaloproteinases de matriz (MMP) que liberam fatores de crescimento estimulando o crescimento celular e fibrogênese (14). A perpetuação das HSC envolve mudanças no comportamento das mesmas como: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz extracelular e perda de retinóides (9).

Um grande número de citocinas e mediadores solúveis intercelulares estão relacionados a alterações no comportamento e fenótipo das HSC, que ao sofrerem estas mudanças levam ao desenvolvimento da fibrose, onde desenvolvem um fenótipo contrátil e fibrogênico (6, 12, 14).

Na resolução, as HSC podem sofrer apoptose ou voltarem a exibir um fenótipo quiescente, o que seria benéfico para o tecido hepático (8). A Figura 2 resume o processo fibrótico.

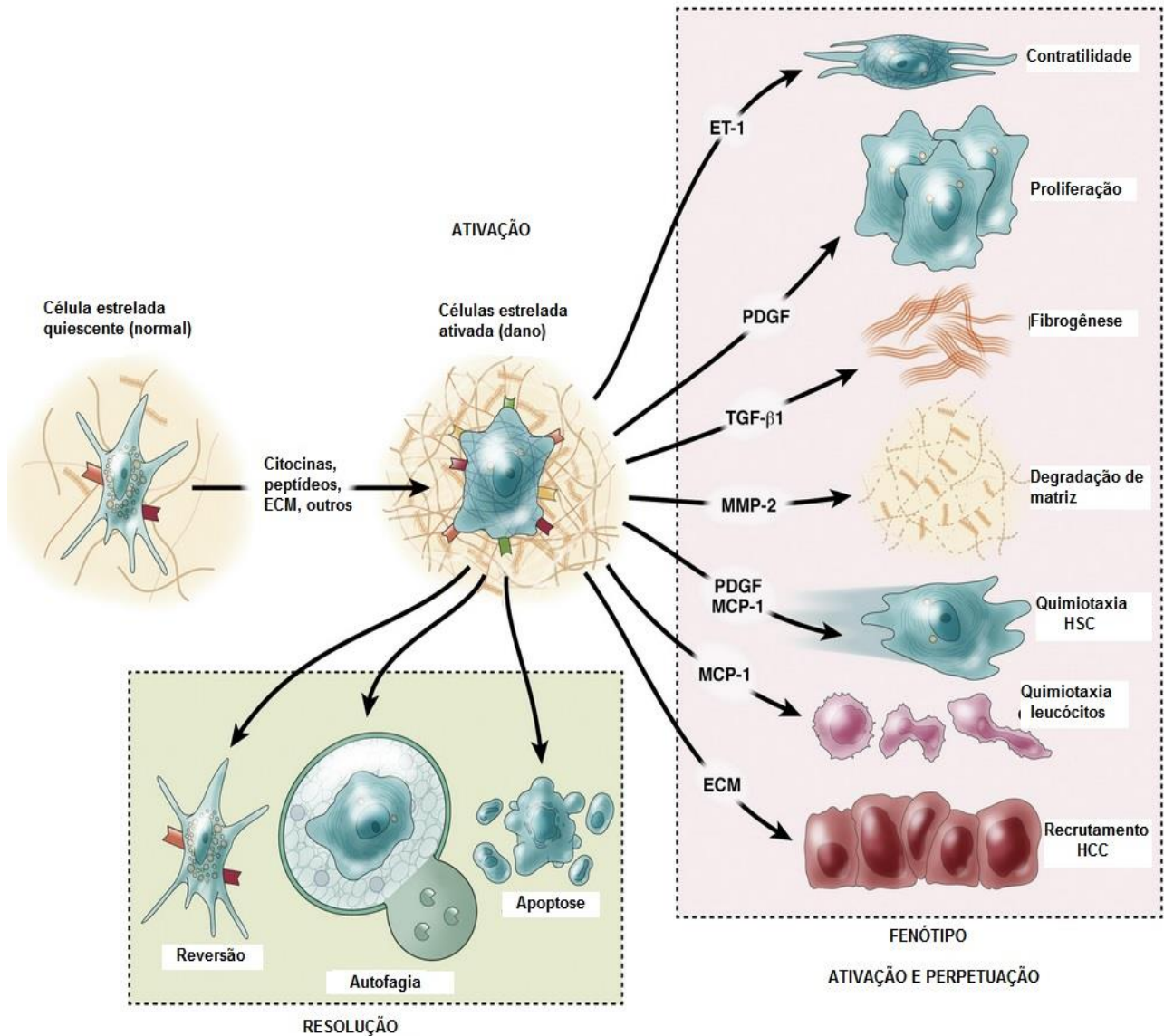


FIGURA 2: Ativação da célula estrelada hepática. Uma característica fundamental da patogênese da fibrose e cirrose hepática é a ativação das células esteladas hepáticas. Sendo que, este processo de ativação é complexo, tanto em termos dos eventos que induzem a ativação e os efeitos de ativação. São responsáveis pela indução múltiplos estímulos incluindo, mas não se limitando a citocinas, peptídeos e a própria matriz extracelular (15).

### **1.3 Reversão e tratamento da fibrose hepática**

Atualmente não há um tratamento padrão para a fibrose hepática (16). Sendo considerado um processo irreversível, a terapia mais efetiva continua sendo a remoção do agente causador da injúria hepática (2). Novas estratégias de tratamento têm sido criadas sobre uma base de evidências crescentes que documenta a reversibilidade da fibrose hepática e a compreensão detalhada da biologia das HSCs ativadas (17).

Os avanços na compreensão das bases fisiopatológicas da fibrogênese agora estão levando a novas abordagens terapêuticas, sendo a estratégia mais eficaz para reversão da fibrose com uso de substâncias antifibróticas, inibindo a deposição de matriz, síntese de colágeno, a modulação da ativação de células estreladas, reforçando a degradação da matriz, ou a estimulação da morte celular ou apoptose das células estreladas hepáticas (17).

### **1.4 Linhagem Celular GRX**

A linhagem celular GRX (18) é representativa de HSC obtida através de uma reação fibrogranulomatosa hepática de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (10, 19). Em condição padrão de cultivo, essas células expressam fenótipo de miofibroblastos e estão no estado transicional entre o lipócito quiescente e o estado ativado, chamado de miofibroblasto ativado (19, 20). Elas podem expressar o fenótipo de miofibroblastos ativados em resposta ao tratamento *in vitro* com citocinas prófibrogênicas ou expressar o fenótipo lipocítico quiescente se forem tratadas com retinol, ácido retinóico ou fármacos que modifiquem o metabolismo lipídico como a indometacina (20, 21). Além disso, já foi demonstrado que esta linhagem se comporta de maneira muito similar as HSC no que diz respeito à captação, armazenamento e liberação de retinóides (10). Sendo assim, a linhagem celular GRX é considerada um modelo *in vitro* das HSC (22).

### **1.5 Ácido Gálico**

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), é um composto natural fenólico (Figura 3), componente dos taninos e amplamente distribuído no chá verde, vinho tinto e frutas como: uva, morango, abacaxi, banana, limão e casca

de maçã (23). Numerosos estudos pré-clínicos têm mostrado que o ácido gálico possui uma variedade de ações farmacológicas, incluindo as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana, antiviral e antitumoral (24, 25). Em modelos animais, ácido gálico reduz o estresse oxidativo e melhoram os níveis de glutathione (GSH), peroxidase de GSH, GSH redutase e GSH-S-transferase em tecido hepático, bem como catalase no soro (26). O ácido gálico é conhecido por induzir a morte celular ou parada do ciclo celular em varias linhagens de células tumorais (27).

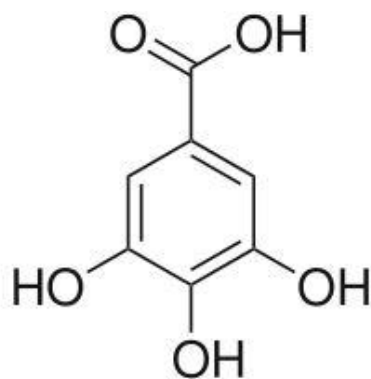


FIGURA 3: Estrutura química do ácido gálico



## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios relataram as propriedades terapêuticas antioxidantes e anti-inflamatórias do ácido gálico em modelos *in vitro* (27) e *in vivo* (26). Sabendo que o processo de fibrose hepática envolve mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, é importante considerar que o ácido gálico possa ser útil na tentativa de reversão da fibrose. E como a linhagem celular GRX constitui um modelo para estudos de fibrose hepática *in vitro*, este estudo tem como finalidade avaliar a ação antifibrótica do ácido gálico nesta linhagem.

## **OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do ácido gálico sobre a proliferação e reversão fenotípica das células GRX.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a ação do AG sobre a proliferação das células GRX.
- Avaliar alterações no fenótipo das células GRX tratadas com ácido gálico.
- Determinar a concentração de lipídios, TGF- $\beta$ 1 (Fator de transformação do crescimento beta 1) das células GRX tratadas com ácido gálico.
- Avaliar a expressão do mRNA de PPAR $\gamma$  (Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama) e colágeno tipo I nas células tratadas com ácido gálico.

## CAPÍTULO 2

Os resultados do presente trabalho foram submetidos ao periódico *Liver International*.

Fator de Impacto: 3.87

## **ÁCIDO GÁLICO INDUZ REVERSÃO FENOTÍPICA EM CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS ATIVADAS**

Aline Daniele Schuster<sup>1</sup>, Fernanda Cristina Mesquita<sup>1</sup>, Shanna Bitencourt<sup>1</sup>, Kelly Goulart Lima<sup>1</sup>, Gabriele Catyana Krause<sup>1</sup>, Leonardo Pedrazza<sup>1</sup>, Eduardo Caberlon<sup>1</sup>, Gabriela Viegas da Silva<sup>1</sup>, Bruno Souza Basso<sup>1</sup>, Anderson Catarina Velasquez<sup>1</sup>, Julia Schmid<sup>1</sup>, Bianca Andrade Martha<sup>1</sup>, Gabriela Acevedo Ferreira<sup>1</sup>, Eduardo Cassel<sup>2</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira\*

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

<sup>2</sup> Laboratório de Operações Unitárias, Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

\* Para correspondência, utilize o seguinte endereço: Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: jarbas@pucrs.br

## RESUMO

*Introdução:* A fibrose é consequência de uma lesão hepática crônica que pode progredir a cirrose, sendo caracterizada pela ativação das células estreladas hepáticas (HSC) que provocam o acúmulo de matriz extracelular que compõem o tecido cicatricial. As células GRX pertencem a uma linhagem celular imortal murina, considerada um modelo *in vitro* das HSC. O ácido gálico (AG; ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é amplamente distribuído em uma variedade de plantas, frutos e alimentos, onde está presente tanto na forma livre ou, mais comumente, como um elemento de taninos. Foi demonstrado que o ácido gálico possui uma variedade de ações farmacológicas, incluindo as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana e antitumoral. *Objetivo:* Investigar os efeitos *in vitro* de AG na diferenciação de HSC, além de estudar os possíveis mecanismos envolvidos. *Métodos:* A partir de um estudo experimental com uma linhagem celular GRX, sendo esta tratada com AG, nas concentrações de 30, 60 e 90µM, onde as análises foram realizadas em 24 horas e 6 dias após o tratamento. *Resultados:* AG é capaz de induzir o fenótipo quiescente HSC via ativação de PPAR $\gamma$ , diminuir os níveis de TGF- $\beta$ 1, reduzir a expressão de colágeno tipo I e reduzir a proliferação celular das HSC. Mais estudos sobre as propriedades antifibróticas do AG podem ser importantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Palavras chave: ácido gálico, células estreladas hepáticas, fibrose, receptor ativado por proliferador de peroxissomo, fator de crescimento transformador beta.

## INTRODUÇÃO

A fibrose hepática normalmente resulta de inflamações crônicas, provocando uma resposta imune que persiste por um longo período de tempo, sendo que a remodelação de tecidos e a reparação são processos que ocorrem simultaneamente. A maior parte das doenças fibróticas crônicas possuem um constante agente estressor que estimula a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, que estimulam a deposição de elementos do tecido conjuntivo que, progressivamente, remodela a arquitetura tecidual (1, 2). A iniciação e a progressão da fibrose do fígado estão relacionadas com a proliferação das células hepáticas, tais como hepatócitos e células estreladas hepáticas (HSC). Como consequência da lesão hepática crônica ocorre apoptose dos hepatócitos. Os hepatócitos remanescentes deixam o seu estado de repouso e voltam a entrar no ciclo celular, a fim de restaurar o tecido hepático original e sua função, estimulando a proliferação e ativação das HSC resultando em diferenciação e produção de matriz extracelular (MEC) (3).

O armazenamento hepático de retinóides e doenças hepáticas possuem relação direta com as HSC (4). As HSC são as principais células envolvidas na fibrogênese hepática, caracterizadas em seu estado de repouso por possuir gotículas lipídicas contendo predominantemente ésteres de retinil, triglicerídeos, fosfolípidios, colesterol e ácidos graxos (5), representando 70 a 90% de todos os retinóides presentes no fígado. Estas células estão envolvidas no processo de desenvolvimento da doença hepática de forma importante. Quando HSC são ativadas após uma lesão hepática, estas contribuem significativamente para a síntese de MEC e, conseqüentemente, a fibrose hepática. Além disso, quando HSC são ativadas, elas perdem suas reservas de retinóides e modificam seu fenótipo (6, 7).

A linhagem celular GRX foi obtida através de uma reação fibrogranulomatosa hepática de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (8). Estas células expressam o fenótipo de miofibroblastos ativado e secretam colágeno tipo I e III em condição padrões de cultivo, mas em resposta ao tratamento *in vitro* com retinol, ácido retinóico e outras drogas podem

expressar o fenótipo lipocítico através de uma reversão fenotípica (9-13). Assim, a linhagem celular GRX é considerada um modelo *in vitro* das HSC (12).

Ácido Gálico (AG) ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, é um composto natural fenólico, componente dos taninos e amplamente encontrado no chá verde, vinho tinto e frutas como: uva, morango, abacaxi, banana, limão e casca de maçã (14). Numerosos estudos pré-clínicos têm mostrado que o ácido gálico possui uma variedade de ações farmacológicas, incluindo as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais e antitumorais (15-17). Em modelos animais o AG reduz o estresse oxidativo e melhoram os níveis de glutatona (GSH), peroxidase de GSH, GSH redutase e GSH-S-transferase em tecido hepático, bem como catalase no soro (18).

Consciente de que o processo de fibrose hepática envolve mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, é importante investigar se o AG pode ser útil para reverter a fibrose. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de AG nas células GRX.

## METODOLOGIA

### CULTURA CELULAR

A linhagem murina de HSC, GRX (8) foi proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil). Estas foram mantidas em meio Dulbecco modificado (DMEM), suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, USA), 2 g/L de tampão HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico), 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub> e 1% penicilina e estreptomicina (Invitrogen), sob atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C.

### TRATAMENTO COM ÁCIDO GÁLICO

Ácido Gálico (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvido em DMEM nas concentrações de 30, 60 e 90 µM, escolhidas após a realização de uma curva de concentrações de acordo com estudos já realizados (dados não mostrados) (19, 20). As análises foram realizadas nos tempos de 24 horas e 6 dias após o tratamento, sendo estas já estabelecidas em estudos realizados no laboratório (9). Todos os experimentos foram realizados três vezes e em triplicatas, onde o controle é identificado como zero, ou seja, este grupo não possui tratamento com AG.

### VIABILIDADE CELULAR

As células viáveis foram determinadas pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Invitrogen, EUA), este mede a função respiratória mitocondrial (21, 22). As células GRX foram dispensadas em placas de 24 poços em uma densidade celular de  $5 \times 10^4$  para tratamentos de 24 horas e  $1 \times 10^3$  para tratamentos de 6 dias com AG. As células foram incubadas em meio contendo 10% de MTT durante 3 horas e dissolvido com dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Inc.). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 540 nm com referência em 650 nm. O número de células foi determinado através da utilização de um hemocitômetro (23). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do corante Azul Trypan onde estas foram dispensadas em placas de 24 poços em uma densidade celular de  $5 \times 10^4$  para



tratamentos de 24 horas e  $1 \times 10^3$  para tratamentos de 6 dias com AG. Os resultados foram apresentados como número de células viáveis.

#### QUANTIFICAÇÃO LACTATO DESIDROGENASE

A fim de avaliar a citotoxicidade do AG em células GRX foi quantificado o LDH no sobrenadante das culturas tratadas por 24 horas e 6 dias. A atividade da LDH foi medida por ensaio colorimétrico, kit Labtest (24). Para o controle de lise celular foi usado Tween a 5%.

#### DETECÇÃO DE GOTÍCULAS DE LIPÍDIOS ATRAVÉS DE COLORAÇÃO DE *OIL RED O*

Para visualizar a morfologia celular e o acúmulo de lipídios, no sexto dia, as células foram coradas com Oil Red O (ORO) (Sigma Chemical Co., USA)(9, 10). Depois de fixar as células com 10% de formaldeído o ORO foi adicionado por 15 minutos. A visualização e as fotografias foram obtidas através de observação em microscópio de luz invertida e captura da imagem por câmera digital (Bel Photonics, Italy).

#### QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS NAS CÉLULAS GRX

O procedimento é baseado na coloração de ORO nos lipídios intracelulares das células tratadas com AG por 24 horas e 6 dias. Para a quantificação de lipídios, as células foram fixadas com ácido perclórico e incubadas com ORO dissolvido em propilenoglicol (2 mg/mL) por 2 horas. O ORO dentro das gotículas lipídicas foi extraído utilizando isopropanol e a absorbância foi lida em 492 nm usando um leitor de ELISA.

#### QUANTIFICAÇÃO DE TGF- $\beta$ 1

As concentrações de TGF- $\beta$ 1 foram quantificadas em 24 horas e no sexto dia, em sobrenadante das células utilizando um kit de ELISA (R&D Systems, USA). A absorbância foi medida utilizando um leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm com referência em 570 nm. Resultados foram expressos em picogramas por mililitro.

## EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR

RNA total foi isolado das células tratadas por 24 horas com AG, utilizando TRIzol (Invitrogen, EUA). Após a extração, o cDNA foi realizado utilizando o kit Superscript III First-Strand (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram amplificados utilizando PCR (Reação em cadeia da polimerase). Foram realizadas três PCRs para cada amostra ( $\beta$ -actina, PPAR $\gamma$  e Colágeno tipo I), com os seguintes primers:  $\beta$ -actina: direto 5'- TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG – 3' e reverso 5'- TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT – 3'; PPAR $\gamma$ : direto 5'- TGGAATTAGA TGACAGTGA CTGG – 3' e reverso 5'- CTCTGTGACGATCTGCCTGAG – 3'; colágeno tipo I: direto 5'- AGAACATCACCTATCACTGCAAGA - 3' e reverso 5'- GTGGTTTTGTATTTCGATGACTGTCT – 3' (25, 26). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese utilizando gel de agarose 1,5% com 5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio. O gel foi visualizado usando luz ultravioleta e fotografado. A intensidade das bandas foi quantificada por densidade óptica usando o software ImageJ (NIH, USA). Todos os resultados correspondem à intensidade relativa das bandas usando  $\beta$ -actina como controle interno.

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados em estatísticas descritivas simples (média e desvio-padrão). Para a comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o Pós Teste de Dunnett para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$  com intervalo de confiança de 95% e os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, versão 21.0. (SPSS Inc. Ohio, USA).

## RESULTADOS

O presente estudo avaliou o efeito do ácido gálico sobre a linhagem celular GRX nas concentrações de 30, 60 e 90  $\mu\text{M}$ . Para iniciar o estudo, avaliou-se diferentes doses e tempos de tratamentos com AG sobre a viabilidade celular. Todas as doses de AG reduziram significativamente a viabilidade celular após 6 dias de tratamento, quando avaliadas por MTT (Figura 1). Entretanto a contagem de células pelo Azul Trypan mostrou redução do número de células viáveis já em 24 horas de tratamento na dose mais elevada (90  $\mu\text{M}$ ) e demonstrou uma redução significativa em todas as doses, após 6 dias de tratamento (Figura 2). Para avaliar se a redução do número de células tratadas por AG não foi decorrente de toxicidade, foi quantificada a liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura. Não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 3), indicando efeitos antiproliferativos do AG e não citotóxicos.

As células GRX expressam o fenótipo miofibroblástico quando em condições padrões de cultivo. Como houve uma diminuição do crescimento celular, avaliamos a possibilidade de uma mudança de fenótipo, pois quando as células GRX diminuem a proliferação, pode indicar uma reversão fenotípica. O ácido gálico não alterou visualmente o fenótipo miofibroblástico em nenhuma das concentrações testadas no período de incubação de 24 horas (dados não mostrados), entretanto aumentou consideravelmente as gotículas em torno do núcleo após 6 dias, onde a maioria das células exibiram o fenótipo de armazenamento de gordura, detectado em microscópio invertido após a coloração com ORO, demonstrando que o tratamento com AG induziu a reversão do fenótipo para lipocítico. Em contraste, as células de controle, que não recebem tratamento, preservaram seu fenótipo miofibroblástico (Figura 4). Estes resultados foram confirmados pela quantificação colorimétrica da concentração intracelular de lipídios (Figura 5). Conforme a figura 5, apesar de não haverem alterações visuais ao utilizar a coloração de ORO em 24 horas de tratamento, obtivemos um aumento significativo nas concentrações intracelulares de lipídios quando tratadas durante 24 horas com 90  $\mu\text{M}$  de AG. Enquanto que após 6 dias de tratamento, a quantidade de lipídios intracelulares

detectada foi de até 3,6 vezes mais elevada na concentração de 90  $\mu$ M do que nas células controle.

O fator de transcrição PPAR $\gamma$  foi identificado como um regulador na ativação e na alteração fenotípica das HSC (27), para confirmar a alteração do fenótipo celular, a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  foi realizada após 24 horas de tratamento. A expressão de PPAR $\gamma$  nas células tratadas aumentou significativamente em comparação com o grupo de controle (Figura 6), comprovando o que obtivemos na figura 5.

A quantidade de TGF- $\beta$ 1 secretado no meio de cultura de células GRX foi quantificado por ELISA, a fim de mensurar os efeitos antifibróticos do AG. Em 24 horas não foi detectada nenhuma diferença, porém ocorreu uma diminuição significativa dos níveis de TGF- $\beta$ 1 do grupo tratado com AG após 6 dias (Figura 7).

Células estreladas hepáticas ativadas sintetizam e secretam uma grande quantidade de componentes da MEC tais como colágeno. O mais potente indutor da expressão de colágeno tipo I e outros constituintes da MEC por HSC é o TGF- $\beta$ 1, então foi realizada a expressão de mRNA de colágeno tipo I em 24 horas. Na dose de 90  $\mu$ M de AG houve diminuição significativa da expressão de colágeno tipo I (Figura 8).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se a atividade do AG em células GRX. Demonstramos que o AG é capaz de induzir a modificação do fenótipo de miofibroblastos para lipocítico e diminuir a proliferação destas células. Este dado reforça uma característica de reversão fenotípica, pois a baixa taxa de proliferação ocorre quando as células estão no fenótipo lipocítico. Várias substâncias com propriedades antifibróticas como o resveratrol, quercetina, catequina, capsaicina e frutose-1,6-bisfosfato demonstraram que o efeito antiproliferativo e a reversão fenotípica estão relacionados com a resolução da fibrose, estas substâncias podem atuar inibindo alterações na progressão do ciclo celular e/ou ativação da morte celular através de apoptose e/ou necrose (9, 10, 13, 28, 29).

Um dos primeiros eventos que ocorrem durante esta reversão fenotípica é o aumento das gotículas lipídicas e a diminuição do número de células, o que foi demonstrado nos testes de viabilidade. Na linhagem celular GRX, o tratamento com AG resultou em um aumento do acúmulo de lipídios, tal como evidenciado por coloração com ORO e confirmado por quantificação de lipídios. Portanto, AG atua como um potente indutor de fenótipo quiescente.

Os receptores ativados proliferadores de peroxissomo (PPAR $\gamma$ ) pertencem à superfamília dos receptores de hormonais nucleares e são expressos em diversos tecidos e tipos de células, principalmente no tecido adiposo, onde regula a diferenciação de adipócitos e homeostase da glicose (30, 31). A ativação de PPAR $\gamma$  está relacionada aos efeitos antiproliferativos, indução da apoptose, regulação da transcrição de genes envolvidos no processo de cicatrização de feridas de vários órgãos, e consequentemente diminuição de inflamação, estresse oxidativo, e remodelação da MEC do tecido lesionado (30, 32). A fim de acessar um possível mecanismo de ação do AG, avaliamos a expressão do mRNA PPAR $\gamma$  em células GRX tratadas com AG durante 24 horas. Nossos resultados mostram um aumento da regulação da expressão do mRNA PPAR $\gamma$  e acreditamos que esta elevação é responsável pela indução do fenótipo lipocítico em células GRX tratadas com AG. Estes

resultados sugerem que PPAR $\gamma$  participa como um fator de transcrição de adipogênese durante a modificação no fenótipo das células GRX induzidas pelo ácido gálico já em 24 horas, portanto o PPAR $\gamma$  parece ser o gatilho para a diferenciação celular.

TGF-  $\beta$ 1 é um potente mediador de ativação das HSC e desempenha um papel central na fibrose hepática (33, 34). Após a lesão hepática, a sinalização de TGF- $\beta$ 1 promove a ativação e proliferação de células estreladas hepáticas, induzindo assim, a deposição de MEC. Os níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 são frequentemente encontrados na fibrose hepática, e há uma correlação entre os níveis de TGF- $\beta$ 1 e a atividade fibrogênica (35). Como o TGF- $\beta$  é uma citocina central na regulação da fibrose tecidual, analisamos as concentrações de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de células GRX. Houve uma diminuição significativa nos níveis de TGF- $\beta$ 1 detectada após 6 dias de tratamento, indicando um possível efeito antifibrótico do AG em HSC. Evidências indicam que a ativação do PPAR $\gamma$  interrompe a via de sinalização TGF- $\beta$ 1 e inibe seu efeito pró-fibrótico (30). Pesquisas anteriores demonstraram que uma diminuição na síntese de TGF- $\beta$ 1 provoca diminuição da expressão e produção de colágeno, diminuindo notavelmente a fibrose (36). A partir dos resultados da diminuição dos níveis de TGF- $\beta$ 1, verificou-se a expressão do mRNA do colágeno tipo I em 24 horas de incubação com AG, onde houve diminuição significativa da expressão. Este resultado é, provavelmente, uma consequência da ativação do PPAR $\gamma$  já em 24 horas.

## CONCLUSÃO

Com base neste estudo, concluímos que o AG tem ação antifibrótica. É capaz de diminuir a proliferação das células GRX, sendo esta uma característica da reversão fenotípica, confirmada pelo aumento dos lipídios e diminuição da expressão de colágeno tipo I. Os mecanismos envolvidos estão relacionados à expressão aumentada de mRNA de PPAR $\gamma$ , o qual pode levar a uma redução do mediador pró-fibrogênico TGF- $\beta$ 1 e provocar diminuição da síntese de colágeno tipo I. Aumentar o conhecimento das propriedades antifibróticas de AG em linhagens celulares e *in vivo*, são necessários para aumentar o conhecimento sobre as propriedades antifibróticas de AG.

## LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1- Efeito do AG sobre a viabilidade das células GRX em 24 horas e 6 dias. Viabilidade celular avaliada por um ensaio MTT. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 3). Os resultados foram expressos como a leitura de absorbância. \* P <0,05, \*\*\* P <0,001 comparado com o controle.

Figura 2- Efeito do AG sobre a viabilidade das células GRX em 24 horas e 6 dias. Viabilidade celular avaliada pela contagem de células direta. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 3). Os resultados foram expressos como o número de células. \* P <0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P <0,001 comparado com o controle.

Figura 3 - Porcentagem de sobrevivência pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) por células GRX tratadas com ácido gálico em concentrações 30, 60 e 90  $\mu$ M e tempos de incubação de 24 horas e 6 dias. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 3). \* P <0,05: comparado com o controle.

Figura 4 - Coloração de *Oil Red-O* (ORO) em células GRX tratadas após 6 dias. (A) Células controle; (B), (C), (D) Células tratadas com ácido gálico com 30, 60 e 90  $\mu$ M, respectivamente. Setas brancas indicam o acúmulo de lipídios.

Figura 5 - Dosagem de lipídios expressos espectrofotometricamente através da razão entre o valor de absorbância obtida por ORO e o número de células. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 3). \*P < 0.05, comparado com o controle.

Figura 6 - Efeitos do ácido gálico (AG) sobre a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  em células GRX tratadas durante 24 h.  $\beta$ -actina foi um controle interno. Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3). Os resultados são apresentados como relativa densidade óptica de PPAR $\gamma$ / $\beta$ -actina. \*\*\* P <0,001 em comparação com o controle.

Figura 7 - Ensaio de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de células tratadas de 24 horas e 6 dias. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 3). Os níveis de TGF- $\beta$ 1 foram expressos em picogramas por mililitro. \*\*\* P <0,001 comparada com o controle.

Figura 8 - Efeitos do ácido gálico (AG) sobre a expressão do mRNA de colágeno do tipo I em células GRX tratados durante 24 horas. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 3).  $\beta$ -actina foi um controle interno. Os resultados são apresentados como relativa densidade óptica de colágeno tipo I / actina. \* P <0,05, \*\* P<0,01 em comparação com o controle.



FIGURA 1

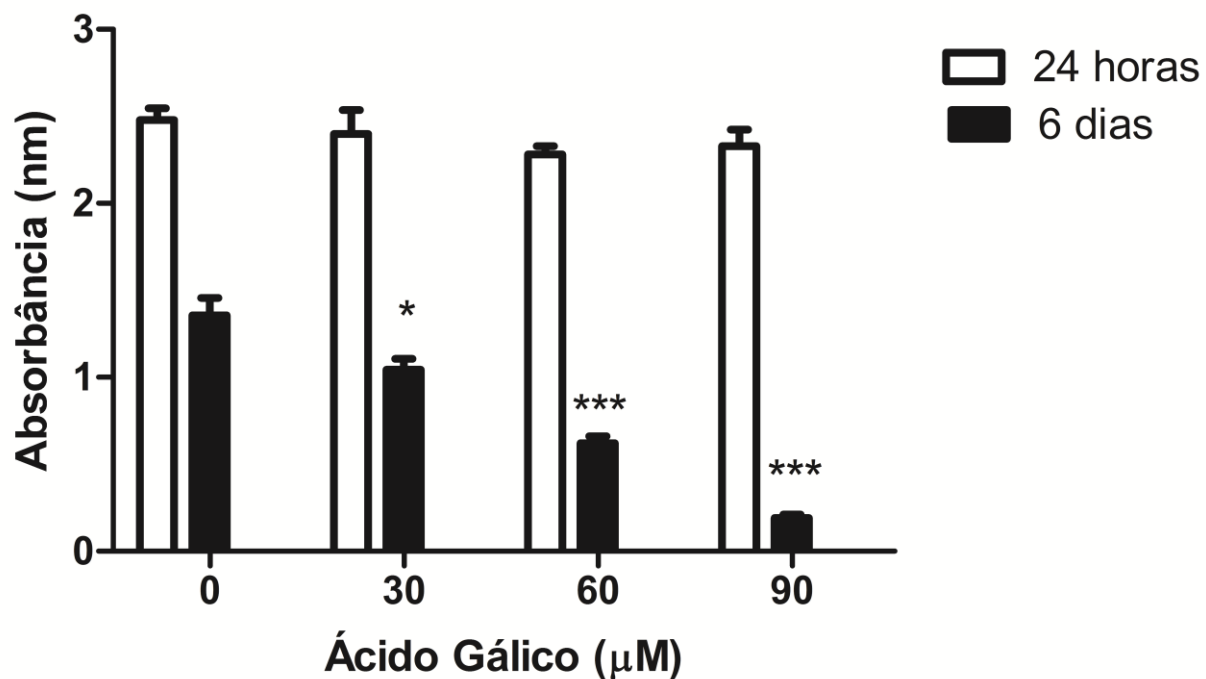


Figura 1- Efeito do AG sobre a viabilidade das células GRX em 24 horas e 6 dias. Viabilidade celular avaliada por um ensaio MTT. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 3). Os resultados foram expressos como a leitura de absorbância. \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,001 comparado com o controle.

FIGURA 2

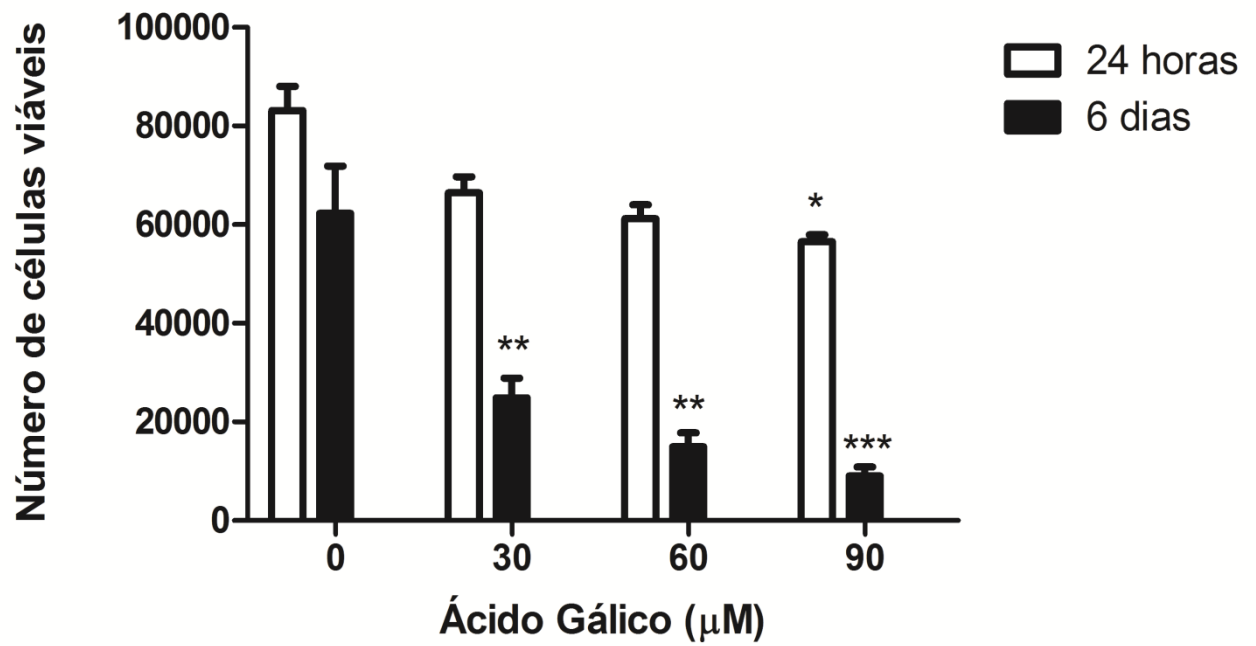


Figura 2- Efeito do AG sobre a viabilidade das células GRX em 24 horas e 6 dias. Viabilidade celular avaliada pela contagem de células direta. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ). Os resultados foram expressos como o número de células. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  comparado com o controle.

FIGURA 3

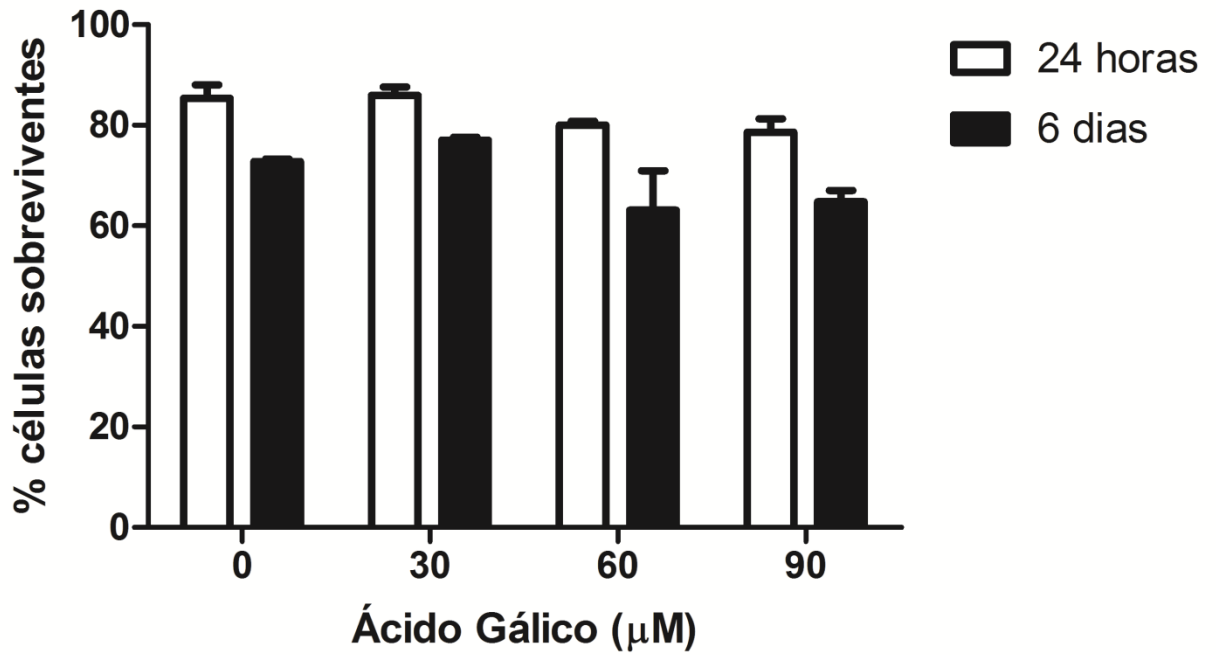


Figura 3 - Porcentagem de sobrevivência pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) por células GRX tratadas com ácido gálico em concentrações 30, 60 e 90 μm e tempos de incubação de 24 horas e 6 dias. Os resultados são expressos como média ± DP (n = 3). \* P <0,05: comparado com o controle.

FIGURA 4

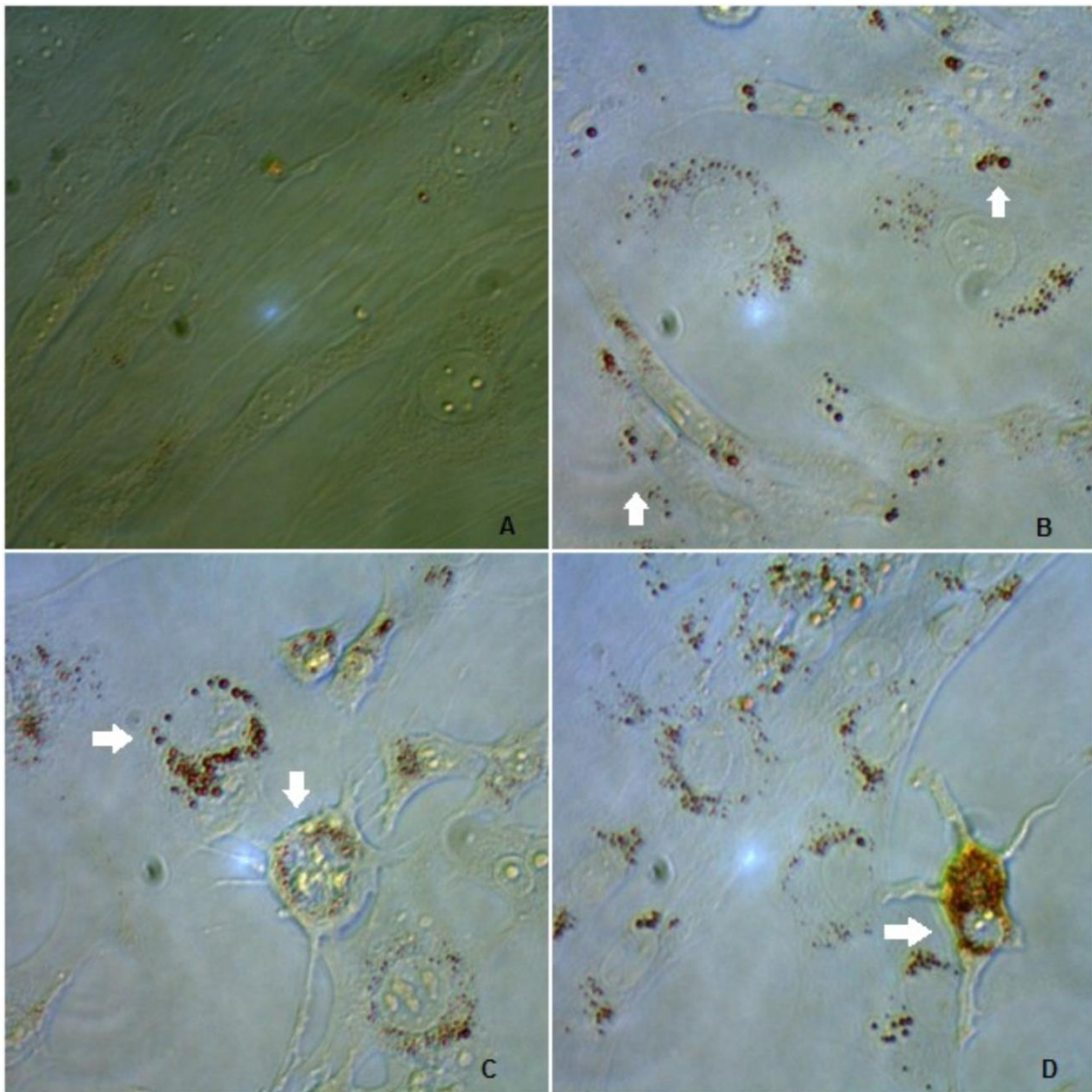


Figura 4 - Coloração de *Oil Red-O* (ORO) em células GRX tratadas após 6 dias. (A) Células controle; (B), (C), (D) Células tratadas com ácido gálico com 30, 60 e 90  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Setas brancas indicam o acúmulo de lipídios.

FIGURA 5

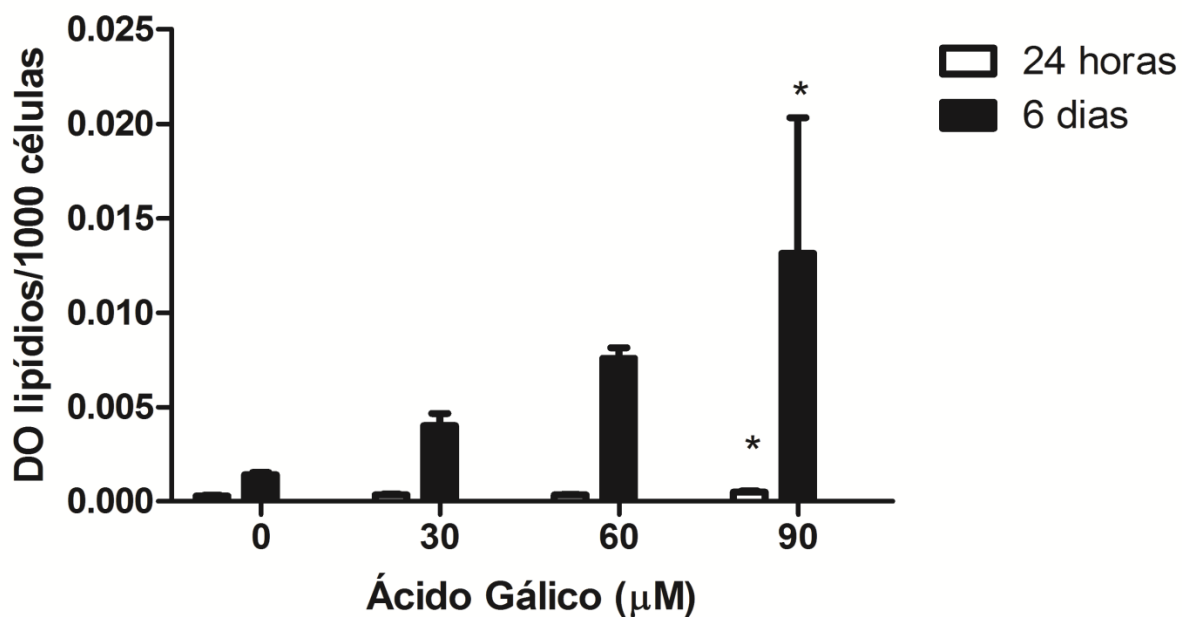


Figura 5 - Dosagem de lipídios expressos espectrofotometricamente através da razão entre o valor de absorvância obtida por ORO e o número de células. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , comparado com o controle.

FIGURA 6

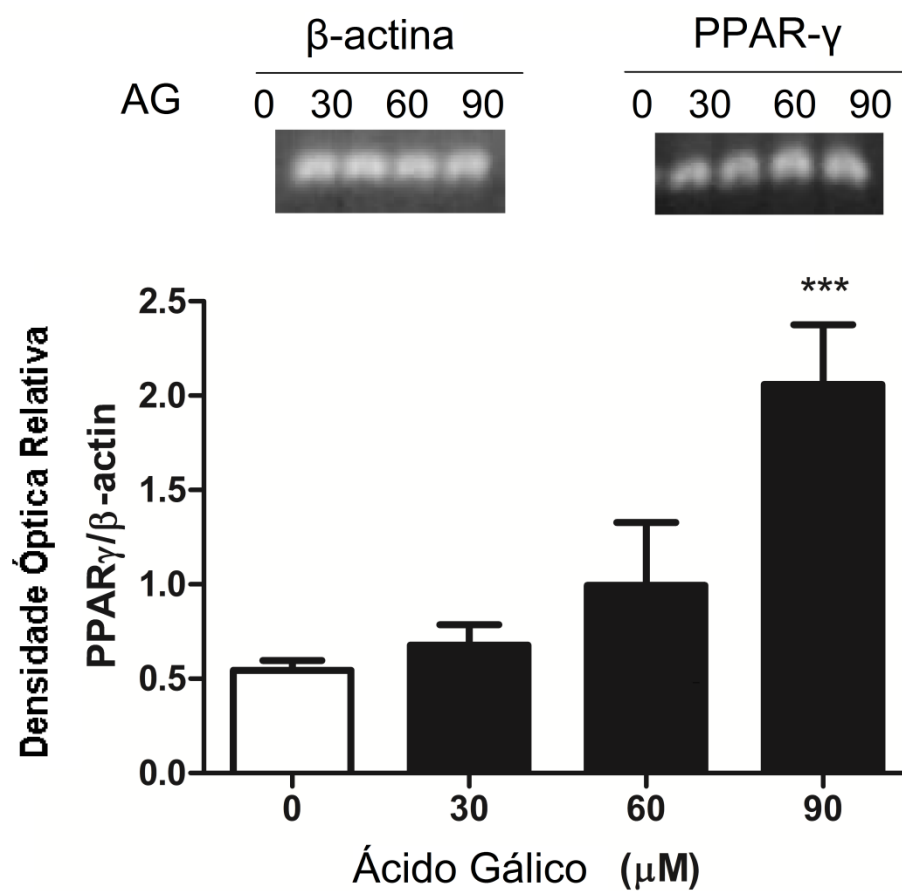


Figura 6 - Efeitos do ácido gálico (AG) sobre a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  em células GRX tratadas durante 24 h.  $\beta$ -actina foi um controle interno. Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3). Os resultados são apresentados como relativa densidade óptica de PPAR $\gamma$ / $\beta$ -actina. \*\*\* P < 0,001 em comparação com o controle.

FIGURA 7

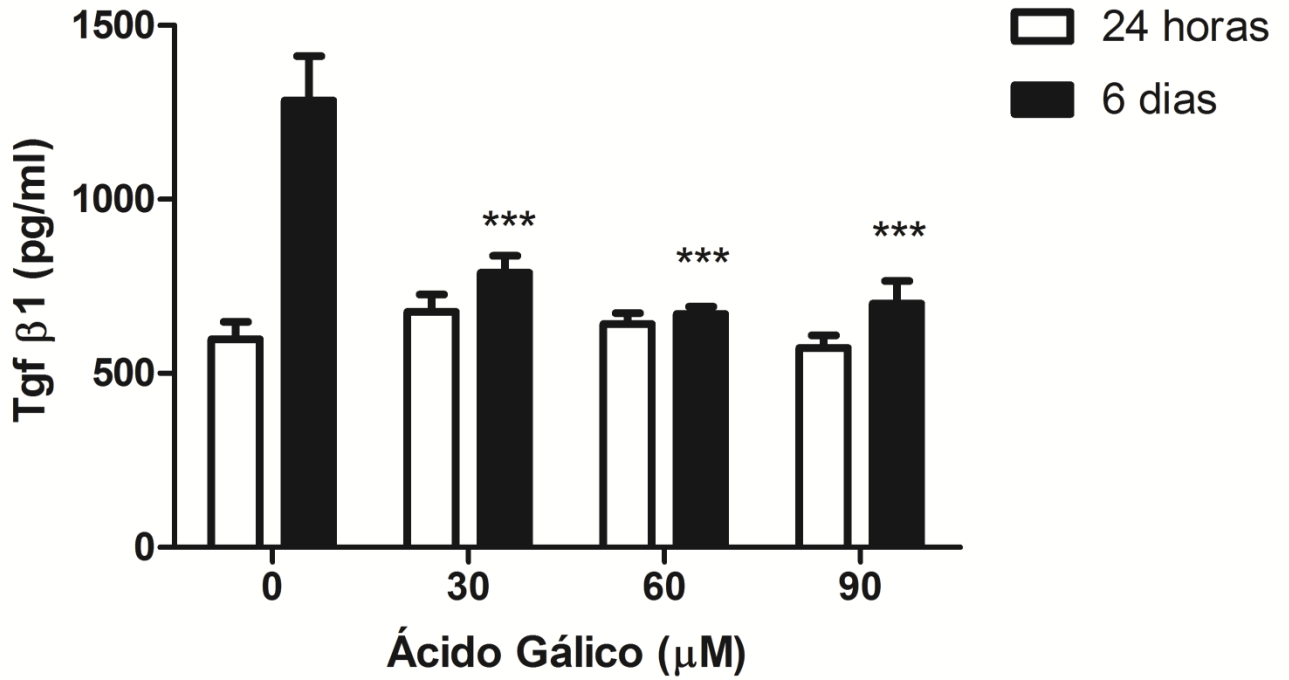


Figura 7 - Ensaio de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de células tratadas de 24 horas e 6 dias. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ). Os níveis de TGF- $\beta$ 1 foram expressos em picogramas por mililitro. \*\*\*  $P < 0,001$  comparada com o controle.

FIGURA 8

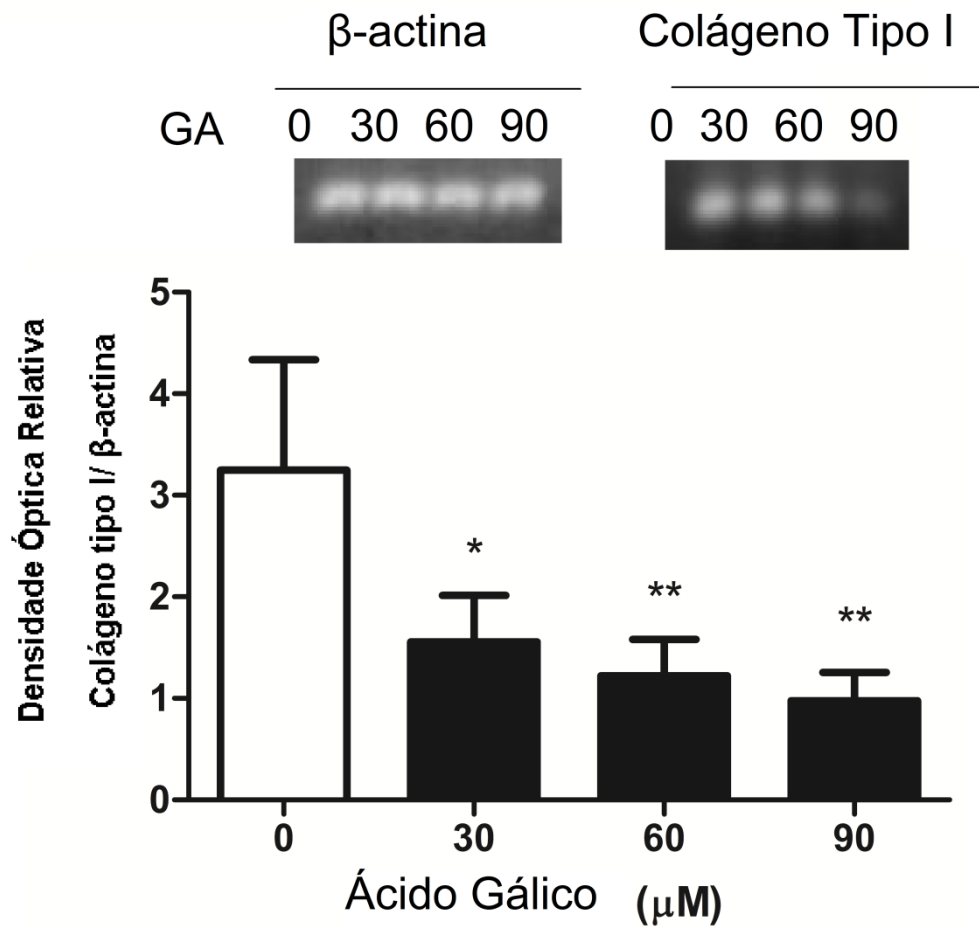


Figura 8 - Efeitos do ácido gálico (AG) sobre a expressão do mRNA de colágeno do tipo I em células GRX tratados durante 24 horas. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 3).  $\beta$ -actina foi um controle interno. Os resultados são apresentados como relativa densidade óptica de colágeno tipo I/actina. \* P <0,05, \*\* P<0,01 em comparação com o controle.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(3):524-9.
2. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004;1(2):98-105.
3. Nevzorova YA, Hu W, Cubero FJ, Haas U, Freimuth J, Tacke F, et al. Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013.
4. Shirakami Y, Lee S-A, Clugston RD, Blaner WS. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012;1821(1):124-36.
5. Chen A, Tang Y, Davis V, Hsu FF, Kennedy SM, Song H, et al. Liver fatty acid binding protein (L-Fabp) modulates murine stellate cell activation and diet induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013.
6. Geerts A, editor. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease*; 2001: Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
7. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008;88(1):125-72.
8. Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourão PA, Emonard H, et al. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1985;21(7):382-90.
9. Bragança de Moraes CM, Melo DA, Santos RC, Bitencourt S, Mesquita FC, Santos de Oliveira FD, et al. Antiproliferative effect of catechin in GRX cells. *Biochem Cell Biol*. 2012;90(4):575-84.
10. Bitencourt S, de Mesquita FC, Caberlon E, da Silva GV, Basso BS, Ferreira GA, et al. Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell. *Biochemistry and Cell Biology*. 2012;90(5).
11. Bitencourt S, Mesquita F, Basso B, Schmid J, Ferreira G, Rizzo L, et al. Capsaicin Modulates Proliferation, Migration, and Activation of Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 1-10.
12. Vicente CP, Fortuna VA, Margis R, Trugo L, Borojevic R. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;187(1-2):11-21.
13. de Mesquita FC, Bitencourt S, Caberlon E, da Silva GV, Basso BS, Schmid J, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell. *European Journal of Pharmacology*. 2013.
14. Niemetz R, Gross GG. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*. 2005;66(17):2001-11.
15. Kim Y-J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(6):1052-5.

16. Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, et al. Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-biological interactions*. 2007;165(1):1-13.
17. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*. 2011;49(4):396-402.
18. Hsu C-L, Yen G-C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*. 2007;98(4):727-35.
19. Labieniec M, Gabryelak T. Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006;82(1):72-8.
20. Liang C-z, Zhang X, Li H, Tao Y-q, Tao L-j, Yang Z-r, et al. Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of Mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2012;27(10):701-10.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol methods*. 1983;65(1-2):55-63.
22. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*. 1989;119(2):203-10.
23. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001:A. 3B. 1-A. 3B. 2.
24. Spiller F, Alves MK, Vieira SM, Carvalho TA, Leite CE, Lunardelli A, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;60(4):473-8.
25. Guimaraes EL, Franceschi MF, Andrade C, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, et al. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver International*. 2007;27(9):1255-64.
26. Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palù G, Martines D. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(3):G571-G8.
27. Hazra S, Miyahara T, Rippe RA, Tsukamoto H. PPAR gamma and hepatic stellate cells. *Comp Hepatol*. 2004;3(Suppl 1):S7.
28. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupffer cells. *Hepatology*. 1998;27(5):1265-74.
29. Bitencourt S, Mesquita F, Basso B, Schmid J, Ferreira G, Rizzo L, et al. Capsaicin Modulates Proliferation, Migration, and Activation of Hepatic Stellate Cells. *Cell biochemistry and biophysics*. 2013:1-10.
30. Zhang F, Lu Y, Zheng S. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis. *Cellular Signalling*. 2012;24(3):596-605.

31. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(5):1887-901.
32. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(3):598-606.
33. Qian J, Niu M, Zhai X, Zhou Q, Zhou Y.  $\beta$ -Catenin pathway is required for TGF- $\beta$ 1 inhibition of PPAR $\gamma$  expression in cultured hepatic stellate cells. *Pharmacological Research*. 2012;66(3):219-25.
34. Deng Y-L, Xiong X-Z, Cheng N-S. Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor- $\beta$  signaling via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2012;11(5):467-78.
35. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor  $\beta$  and the liver. *Hepatology*. 2001;34(5):859-67.
36. Ye Y, Dan Z. All-trans retinoic acid diminishes collagen production in a hepatic stellate cell line via suppression of active protein-1 and c-Jun N-terminal kinase signal. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2010;30:726-33.

## CAPÍTULO 3

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O difícil diagnóstico e a falta de tratamento realmente eficaz tem acelerado o interesse em descobrir novos agentes capazes de reduzir a progressão da fibrose hepática (28). Substâncias anti-inflamatórias que inibam a ativação e proliferação das HSC têm sido muito estudadas como estratégias terapêuticas, já que estas células são consideradas a chave da fisiopatologia da fibrogênese e o estado inflamatório das mesmas é um fator determinante para o início e manutenção da fibrose (29).

Células estreladas hepáticas são conhecidas por desempenhar um papel importante no processo de fibrose no fígado. No estado de repouso, estas células mantêm um fenótipo quiescente caracterizada pela presença e armazenamento de gotículas de vitamina A no citoplasma. A sua ativação está associada aos danos contínuos para o fígado, devido a infecções distúrbios metabólicos e abuso de álcool (30).

Conforme as ações descritas do AG, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos desta molécula sobre a linhagem GRX, visando estudar seus efeitos antifibróticos, através da reversão fenotípica das células GRX e proliferação. De acordo com os resultados encontrados neste presente estudo, o AG foi capaz diminuir a proliferação celular, demonstrada a partir de ensaios de viabilidade nas células GRX após 24 horas e 6 dias de tratamento com AG, através de MTT e contagem de células direta com Azul Trypan. Determinamos também a liberação de lactato desidrogenase (LDH) para avaliar se a redução do número de células tratadas por AG não foi decorrente de toxicidade. Não houve diferença estatística entre os grupos indicando assim efeitos antiproliferativos do AG e não citotóxicos.

O tratamento com AG foi capaz de reverter o fenótipo miofibroblástico das células GRX para o fenótipo lipocítico, revertendo assim o estado fibrogênico destas células. A reversão pôde ser evidenciada através da visualização ao

microscópio invertido e confirmada pela quantificação de lipídios onde foi possível perceber que a concentração de lipídios era 3.6 vezes maior nas células que foram tratadas com AG em seis dias comparadas ao grupo que não recebeu nenhum tratamento.

Além disso, a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  apresentou um aumento considerável nas células tratadas, mostrando que a rota lipogênica é ativada pelo AG. Pois o PPAR $\gamma$  possui um papel crucial na fibrogênese do fígado. A sua disfunção da transcrição e interação com uma série de sinalizações estão envolvidos na patogênese da fibrose hepática (31).

O efeito antifibrótico do AG pode ser evidenciado também pela inibição de TGF- $\beta$ 1 e a consequente diminuição da expressão do colágeno tipo I. O TGF- $\beta$ 1 não só ativa as HSC, mas estimula a síntese de MEC e regula a proliferação e diferenciação celular (2). Durante a fibrogênese, os níveis de TGF- $\beta$ 1 são elevados, desta forma, as suas concentrações estão correlacionados com a gravidade da fibrose hepática (28, 32). A expressão diminuída do colágeno tipo I sugere uma capacidade potencial em diminuir a síntese de colágeno por células HSC ativadas.

Conclui-se que o AG induz a reversão do fenótipo das células GRX por suas ações anti-inflamatórias e antifibróticas. Onde os mecanismos envolvidos são o aumento da expressão de PPAR $\gamma$ , que leva a uma indução para o decréscimo de TGF- $\beta$ 1 e consequente redução de mediadores profibrogênicos e a proliferação celular. Ainda são necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento da atividade antifibrótica do AG, porém, esta tem se mostrada não só benéfica nos casos de inflamação, mas também para as doenças crônicas do fígado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández-Gea V, Friedman SL. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. *Autophagy*. 2012;8(5):849-50.
2. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18.
3. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):195-206.
4. Ginès P, Cárdenas A, Arroyo V, Rodés J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1646-54.
5. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):286-300.
6. Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R. [Hepatic stellate cells: its role in normal and pathological conditions]. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29(2):93-101. Epub 2006/02/02. Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas.
7. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*. 2004;37(1):3-15. Epub 2004/04/02.
8. Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):68-74. Epub 2007/12/11.
9. Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology*. 2008;254(3):120-9. Epub 2008/07/30.
10. Vicente CP, Fortuna VA, Margis R, Trugo L, Borojevic R. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem*. 1998;187(1-2):11-21. Epub 1998/10/27.
11. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008;88(1):125-72.
12. Iredale J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):129-36. Epub 2008/07/26.
13. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27 Suppl 2:65-8.
14. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-69. Epub 2008/05/13.
15. Rockey DC. Translating an Understanding of the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis to Novel Therapies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013;11(3):224-31. e5.
16. Li J-T, Liao Z-X, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *Journal of gastroenterology*. 2008;43(6):419-28.
17. Ismail MH, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2009;15(1):72.
18. Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourao PA, Emonard H, et al. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal

- granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1985;21(7):382-90. Epub 1985/07/01.
19. Guimaraes EL, Franceschi MF, Grivicich I, Dal-Pizzol F, Moreira JC, Guaragna RM, et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int.* 2006;26(4):477-85. Epub 2006/04/25.
  20. Souza IC, Martins LA, Coelho BP, Grivicich I, Guaragna RM, Gottfried C, et al. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;315(1-2):1-7. Epub 2008/05/06.
  21. Guimaraes EL, Franceschi MF, Andrade CM, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, et al. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int.* 2007;27(9):1255-64. Epub 2007/10/09.
  22. Davis BH, Kresina TF. Hepatic fibrogenesis. *Clinics in laboratory medicine.* 1996;16(2):361.
  23. Niemetz R, Gross GG. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry.* 2005;66(17):2001-11.
  24. Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, et al. Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-biological interactions.* 2007;165(1):1-13.
  25. Kim Y-J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2007;30(6):1052-5.
  26. Hsu C-L, Yen G-C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition.* 2007;98(4):727-35.
  27. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespón C, Villar MaL, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1998;350(1):49-54.
  28. Friedman SL. Hepatic fibrosis—overview. *Toxicology.* 2008;254(3):120-9.
  29. Chakraborty JB, Oakley F, Walsh MJ. Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis. *Int J Hepatol.* 2012;2012:648915.
  30. Martins LAM, Coelho BP, Behr G, Pettenuzzo LF, Souza IC, Moreira JCF, et al. Resveratrol Induces Pro-oxidant Effects and Time-Dependent Resistance to Cytotoxicity in Activated Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics.* 2013:1-11.
  31. Zhang F, Lu Y, Zheng S. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis. *Cellular Signalling.* 2012;24(3):596-605.
  32. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5):1031-51.

## ANEXO

Artigo em Inglês submetido à *Liver International*.



## **Gallic acid induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell**

### **Running head: Action of Gallic Acid in HSC**

Aline Daniele Schuster<sup>1</sup>, Fernanda Cristina Mesquita<sup>1</sup>, Shanna Bitencourt<sup>1</sup>, Kelly Goulart Lima<sup>1</sup>, Gabriele Catyana Krause<sup>1</sup>, Leonardo Pedrazza<sup>1</sup>, Eduardo Caberlon<sup>1</sup>, Gabriela Viegas da Silva<sup>1</sup>, Bruno Souza Basso<sup>1</sup>, Anderson Catarina Velasquez<sup>1</sup>, Julia Schmid<sup>1</sup>, Bianca Andrade Martha<sup>1</sup>, Gabriela Acevedo Ferreira<sup>1</sup>, Eduardo Cassel<sup>2</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira\*

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

<sup>2</sup> Laboratório de Operações Unitárias, Department of Chemical Engineering, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Abstract: 200 words

Main text: 2311 words

\* To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: jarbas@pucrs.br

## ABSTRACT

*Background:* Liver fibrosis is a consequence of chronic liver injury and can further progress to cirrhosis. Fibrogenesis involves activation of hepatic stellate cells (HSC) and accumulation of extracellular matrix molecules that make up scar tissue. GRX, immortal murine HSC line, is considered an in vitro model of HSC. Gallic acid (GA; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid) is broadly distributed in a variety of plants, fruits and foods, where it is present either in free form or, more commonly, as an element of tannins. Diverse biological actions of GA have been demonstrated, including anti-bacterial, anti-viral, and anti-inflammatory.

*Aims:* Investigate the in vitro effects of GA on differentiation of HSCs, besides studying the possible mechanisms involved. *Methods:* Cell line GRX were treated with GA at the concentrations of 30, 60 and 90  $\mu$ M. Analyses were performed at 24 hours and 6 days post-treatment. *Results:* GA is capable of inducing the quiescent phenotype in HSCs via PPAR $\gamma$  activation, decrease of TGF- $\beta$  signaling and decrease of type I collagen expression, decrease HSC proliferation and viability. *Conclusions:* This frame proves beneficial for the liver tissue. Increasing knowledge of the antifibrotic properties of GA can be important for the development of new antifibrotic and anti-inflammatory agents in chronic liver diseases.

Key-words: gallic acid, hepatic stellate cell, fibrosis, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, transforming growth factor-beta.

## INTRODUCTION

Hepatic fibrosis typically results from chronic inflammation, resulting an immune response that persists for several months and in which inflammation, tissue remodelling and repair processes occur simultaneously. Most chronic fibrotic disorders have in common a persistent irritant that sustains the production of growth factors, proteolytic enzymes, angiogenic factors and fibrogenic cytokines, which stimulate the deposition of connective tissue elements that progressively remodel and destroy normal tissue architecture (1, 2). The initiation and progression of liver fibrosis is related to proliferation of hepatic cells such as hepatocytes and hepatic stellate cells (HSC). As a consequence of chronic liver injury occurs hepatocyte death. The remnant hepatocytes leave their quiescent state and re-enter the cell cycle in order to restore the original liver tissue and function. Hepatocyte death also stimulates the proliferation and activation of HSC resulting in transdifferentiation and extracellular matrix (ECM) production (3).

The key linkage between hepatic retinoid storage and hepatic disease resides in HSCs (4). HSCs are the major effectors of hepatic fibrogenesis, characterized in their quiescent state by abundant lipid droplets containing predominantly retinyl esters, triglyceride, and cholesterol ester along with cholesterol, phospholipids, and fatty acids (5), accounting for 70–90% of all retinoid present in the liver. These cells are also importantly involved in the process of hepatic disease development. When HSCs become activated upon hepatic injury, they contribute significantly to ECM synthesis and consequently hepatic fibrosis. Moreover, when HSCs undergo activation, their retinoid stores are lost (6, 7).

GRX, the oldest immortal murine HSC line, derived from inflammatory fibro-granulomatous lesions in liver, displays myofibroblast-like cell morphology and secretes collagen type I and III (8). These cells express the myofibroblast phenotype under standard culture conditions, but can be induced to convert into the lipocyte phenotype by retinol, retinoic acid or drugs (9-13). Thus, the GRX cell line is considered an in vitro model of HSC (12).

Gallic acid (GA) 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, a natural botanical phenolic compound, is a component of the tannins, widely distributed in green tea, red wine and fruits such as grape, strawberry, pineapple, banana, lemon and apple(14). Numerous preclinical studies have shown that gallic acid has a variety of pharmacological actions, including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral and antitumor (15-17). In animal models, gallic acid reduces oxidative stress and improves the levels of glutathione (GSH) peroxidase, GSH reductase, and GSH-S-transferase in liver tissue and serum catalase (18).

Aware that the process of hepatic fibrosis involves inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and reactive oxygen species, it is important to investigate if GA can be useful in reversing fibrosis. Therefore, the aim of this study was to assess the GA effect in GRX liver cells on phenotype and viability.

## METODOLOGY

### CELL CULTURE

The murine HSC cell line GRX (8) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (HUCFF, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA), 2 g/L HEPES buffer, 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub> and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### GALLIC ACID TREATMENT

Gallic Acid (Sigma Chemical Co., USA) was dissolved in DMEM at the concentrations 30, 60 and 90µM, were chosen after performing a concentration curve according to previous studies (data not shown) (19, 20). Analyses were performed at 24 hours and 6 days post-treatment, and these studies have established in the laboratory (9). All experiments were performed three times and in triplicate, where the control is identified as zero, that is, this group has no treatment with GA.

### CELL VIABILITY

Viable cells were determinate with the MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Invitrogen, USA), measuring mitochondrial respiratory function (21, 22). GRX cells were seeded into 24-well plates at a cell density of  $5 \times 10^4$  for 24 hour treatments and  $1 \times 10^3$  for 6 days treatments with GA. Cells were incubated in medium containing 10% MTT for 3 hours and dissolved with dimethylsulphoxide (DMSO, Sigma Inc.). Absorbance at 540 nm and a reference at 620 nm were measured using an ELISA reader (23). The cellular viability was performed by trypan blue dye exclusion, GRX cells were counted using a hemocytometer after 24 hours and 6 days of GA treatment. GRX cells were seeded into 24-well plates at a cell density of  $5 \times 10^4$  to treatment for 24 h and  $1 \times 10^3$  for 6 days treatment with GA. The results are presented as number of viable cells.

## MEASUREMENT OF LACTATE DEHYDROGENASE

In order to evaluate the cytotoxicity of gallic acid in GRX cells, lactate dehydrogenase (LDH) release was measured in the supernatant of cultures treated for 24 hours and 6 days. The LDH activity was measured by colorimetric assay, kit Labtest (24). For the control of cell lysis 5% Tween was used.

## DETECTION OF LIPID DROPLETS BY OIL RED O STAINING

To visualize cell morphology and lipid accumulation, on day 6, cells were stained with Oil Red-O (ORO) (Sigma Chemical Co., USA) (9, 10). After fixing cells with 10% formaldehyde, ORO was added for 15 minutes. Intracellular lipid droplets were examined using an inverted light microscope.

## QUANTIFICATION OF LIPID ACCUMULATION

The procedure is based on ORO staining of intracellular lipid of the cells treated for 24 hours and 6 days. Briefly, cells were fixed with perchloric acid and incubated with ORO dissolved in propyleneglycol (2 mg/mL) for 2 hours. The ORO within the lipid droplets was extracted using isopropanol. The absorbance was read at 492 nm using an ELISA reader.

## TGF- $\beta$ 1 QUANTITATION

TGF- $\beta$ 1 concentration was measured, at 24 hours and 6 days, in cell supernatant using commercially available ELISA kit (R&D Systems, USA). The absorbance was determined at 540nm with the correction wavelength set at 570nm in an ELISA reader. TGF- $\beta$ 1 levels were expressed as picograms per milliliter.

## RNA EXTRACTION AND RT-PCR

Total RNA was extracted from cells treated for 24 hours with GA using TRIzol reagent (Invitrogen, USA). RNA was reverse transcribed into cDNA, using Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were amplified using PCR (polymerase chain reaction). Three PCRs were performed for each sample ( $\beta$ -actin, PPAR $\gamma$  and collagen type I), and the primers sets used were:

$\beta$ -actin: forward primer 5`- TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG – 3` and reverse primer 5`- TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT – 3`; PPAR $\gamma$ : forward primer 5`- TGGAATTAGATGACAGTGA CACTTGG – 3` and reverse primer 5`- CTCTGTGACGATCTGCCTGAG – 3`; collagen type I: forward primer 5`- AGAACATCACCTATCACTGCAAGA - 3` and reverse primer 5`- GTGGTTTTGTATTCGATGACTGTCT – 3` (25, 26). PCR products were electrophoresed using 1.5% agarose gel containing ethidium bromide 5  $\mu$ g/ml. The gel was visualized using ultraviolet light and photographed. The band intensities were measured using program ImageJ (NIH, Bethesda,CA) and the signals were expressed relatively to the intensity of the  $\beta$ -actin amplicon in each coamplified sample.

### STATISTICAL ANALYSIS

The data were expressed as mean  $\pm$  S.D. Statistical analyses were performed using the software SPSS v21.0 (SPSS Inc., Ohio, USA). Data sets were compared with one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Results were considered statistically different when the *P* values were equal to or less than 0.05.

## RESULTS

The present study assessed the effects of GA at the concentrations of 30, 60 and 90  $\mu\text{M}$  on GRX cell. To initiate the study, evaluated different doses and times of the GA treatments would have any effect in cell viability. All doses of GA evaluated by MTT did affect the GRX with significant decrease in cell viability after 6 days of treatment (Figure 1). Cell counting with trypan blue showed a significant reduction in the cell density within 24 hours of treatment with the highest dose (90  $\mu\text{M}$ ). Interestingly, after 6 days all doses affected the cell number (Figure 2). To evaluate if GA-induced reduction of cell number was due to toxicity, the LDH release was checked. There was no statistical difference between the groups (Figure 3), indicating the antiproliferative effects of GA were not cytotoxic.

GRX cells express the myofibroblast phenotype under standard culture conditions. As there has been a decrease in cell growth, we evaluate the possibility of a change in phenotype, because the reduction of proliferation can indicate a phenotypic reversion. GA did not change visually myofibroblastic phenotype in any of the the tested concentrations during the incubation period of 24 hours (data not shown), but increased significantly the droplets around the nucleus after 6 days, when most cells exhibit the phenotype of storage fat detected using an inverted microscope after staining with ORO, demonstrating that treatment with GA induces reversion of the phenotype to lipocyte. In contrast, control cells that did not receive treatment, preserved their myofibroblastic phenotype (Figure 4). These results were confirmed by colorimetric quantification of intracellular lipids (Figure 5). According to Figure 5, although there are no visual changes using the ORO staining after 24 hours of treatment, obtained an significant increase in intracellular lipid when treated for 24 hours with 90  $\mu\text{M}$  of AG. While after 6 days of treatment, the amount of intracellular lipid detected was up to 3.6 fold higher concentration of 90  $\mu\text{M}$  than in control cells.

PPAR $\gamma$  has been identified to be one of the regulator of activation and phenotype alteration of HSC (27). To confirm the inactivation of the cells, mRNA



PPAR $\gamma$  expression was measured after 24 hour with GA treatment. Figure 6 shows the increased expression of PPAR $\gamma$  in treated cells.

To investigate whether GA is capable of reducing the release of profibrogenic markers, the amount of secreted TGF- $\beta$ 1 in GRX media was quantified by an ELISA assay. At 24 hours, no difference was detected, but a significant decrease of TGF- $\beta$ 1 levels was detected in the treated groups after 6 days (Figure 7). Activated HSCs synthesize and secrete a large amount of ECM components such as collagen. The most potent inducer of the expression of collagen I and other ECM constituents by HSCs is TGF- $\beta$ 1, then we decided to measure the mRNA expression of type I collagen at 24 h. The 90  $\mu$ M dose of GA had significant decrease in the expression of collagen type I (Figure 8).

## DISCUSSION

In this study, we investigated the activity of GA on GRX cells. We demonstrated that GA is capable of inducing the change of myofibroblast to lipocyte phenotype in GRX. We have demonstrated that the GA is able to induce a modification of the myofibroblast phenotype lipocyte for decrease the proliferation of these cells. This fact supports a feature of phenotypic reversion, as the low proliferation rate occurs when cells are in fat store phenotype. Several substances with antifibrotic properties such as resveratrol, quercetin, catechin, capsaicin and fructose-1,6-bisphosphate demonstrated that the antiproliferative effect and phenotypic reversion is related to the effect of these in the resolution of fibrosis, that could be related to alterations in the cell cycle progression and/or activation of cell death by apoptosis and/or necrosis (9, 10, 13, 28, 29). One of the early events that occur during HSC phenotypic reversion is the increase of hepatic retinyl ester stores, reducing the cell number. The culture of GRX in the treatment with GA resulted in an increased lipid accumulation, as evidenced by ORO staining and confirmed by lipid quantitation. Therefore, GA acts as a potent inducer of the quiescent phenotype.

Peroxisome-proliferator activated receptors (PPAR) belong to the superfamily of nuclear hormone receptors. PPAR $\gamma$  is expressed in various tissues and cell types, mainly in adipose tissue, where it regulates adipocyte differentiation and glucose homeostasis (30, 31). PPAR $\gamma$  activation is known to participate in several events, including affect cell proliferation, apoptosis, protection of hepatocytes from senescence, regulation of gene transcriptions involved in the wound-healing process of many organs, and thereby ameliorates inflammation, oxidative stress, and matrix remodeling in the injured tissue (30, 32). In order to access one possible mechanism of action of GA, we evaluated the expression of mRNA PPAR $\gamma$ . These results suggest that PPAR $\gamma$  participates as a transcriptional factor of adipogenesis during GRX de-differentiation induced by gallic acid. The experiment was conducted only in 24 hours with the aim of discovering if activation of PPAR $\gamma$  is the trigger for cell differentiation.

TGF- $\beta$ 1 is a powerful mediator of HSC activation and plays a central role in liver fibrosis (33, 34). After liver injury, TGF- $\beta$ 1 signaling promotes the activation and proliferation of HSCs, thereby inducing ECM deposition. High levels of TGF- $\beta$ 1 are often found in liver fibrosis (35). As TGF- $\beta$ 1 is the central regulator cytokine of tissue fibrosis, we analyzed TGF- $\beta$ 1 concentrations in GRX cells supernatant. A significant decrease of TGF- $\beta$ 1 levels was detected after 6 days of treatment with GA, indicating a possible antifibrotic effect of GA in HSC. Accumulating evidence indicates that activation of PPAR $\gamma$  disrupts the TGF- $\beta$  signaling pathway and inhibits its profibrotic effect (30). Prior researches have shown that an interference in TGF- $\beta$ 1 synthesis blocks the up-regulation of ECM expression and production of collagen strikingly decreasing fibrosis (36). Based on the results of the reduced levels of TGF- $\beta$ 1, there was expression of type I collagen mRNA after 24 hours of incubation with GA where there is a significant decrease in expression. This result is probably a consequence of the activation of PPAR already in 24h.

## CONCLUSION

Based on this study, we can conclude that GA has antifibrotic action. Is able to decrease the proliferation of GRX cells, this being a characteristic of phenotypic reversion as confirmed by increased lipid and decreased expression of collagen type I. One of the mechanisms involved in GA-induced inactivation of GRX cells is probably the increase of PPAR $\gamma$  mRNA expression followed by the reduction of TGF- $\beta$ 1 levels and causing decreased synthesis of type I collagen. Therefore, a down-regulation in profibrogenic markers can be seen as well as a decrease in cell proliferation. Further studies using primary cells and in vivo models are needed to increase the knowledge about the antifibrotic properties of GA.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Effect of GA on cell viability at 24 hours and 6 days of treatment. Cell viability as assessed by an MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). The results were expressed as the absorbance reading. \**P* <0.05, \*\*\* *P* <0.001 compared with control.

Figure 2 - Effect of GA on cell viability in 24 hours and 6 days. Cell viability assessed by direct cell counting. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). The results were expressed as the number of viable cells. \* *P* <0.05, \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* <0.001 compared with control.

Figure 3 - Percent of survival by the release of lactate dehydrogenase (LDH). GRX cells treated with gallic acid at concentrations 30, 60 and 90  $\mu$ M and incubation times of 24 hours and 6 days and the control group. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). \**P* < 0.05: control vs. treated cells.

Figure 4 - Oil Red-O (ORO) staining of GRX cells at day 6. (A) Control cells; (B), (C), (D) cells treated with gallic acid at 30, 60 and 90  $\mu$ M, respectively. White arrows indicate lipid droplets.

Figure 5 - Specific lipid content expressed spectrophotometrically as the ratio of absorbance value obtained for ORO per cell number. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). \**P* < 0.05, compared with control.

Figure 6 - Effects of GA on PPAR- $\gamma$  mRNA expression of GRX cells treated for 24 hours.  $\beta$ -actin was an internal control for equal loading. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Results are presented as relative optical PPAR- $\gamma$  density/ $\beta$ -actin. \*\*\* *P* < 0.001 compared with control.

Figure 7 - ELISA assay of TGF- $\beta$ 1 in cell supernatant of 24 hours and 6 days treatments. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). TGF- $\beta$ 1 levels were expressed as picograms per milliliter\*\*\* *P* < 0.001 compared with control.

Figure 8 - Effects of gallic acid (GA) on type I collagen mRNA expression of GRX cells treated for 24 hours. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3).  $\beta$ -actin was an internal control for equal loading. Results are presented as relative optical density type I collagen/ $\beta$ -actin. \* *P* < 0.05 compared with control.

FIGURE 1

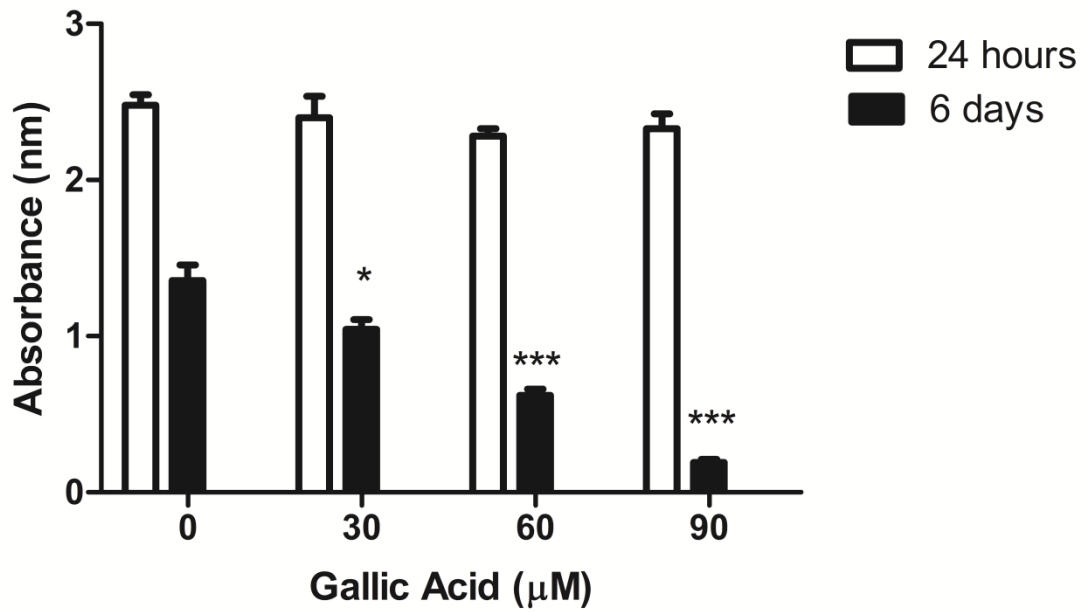


Figure 1 – Effect of GA on cell viability at 24 hours and 6 days of treatment. Cell viability as assessed by an MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). The results were expressed as the absorbance reading. \* $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with control.

FIGURE 2

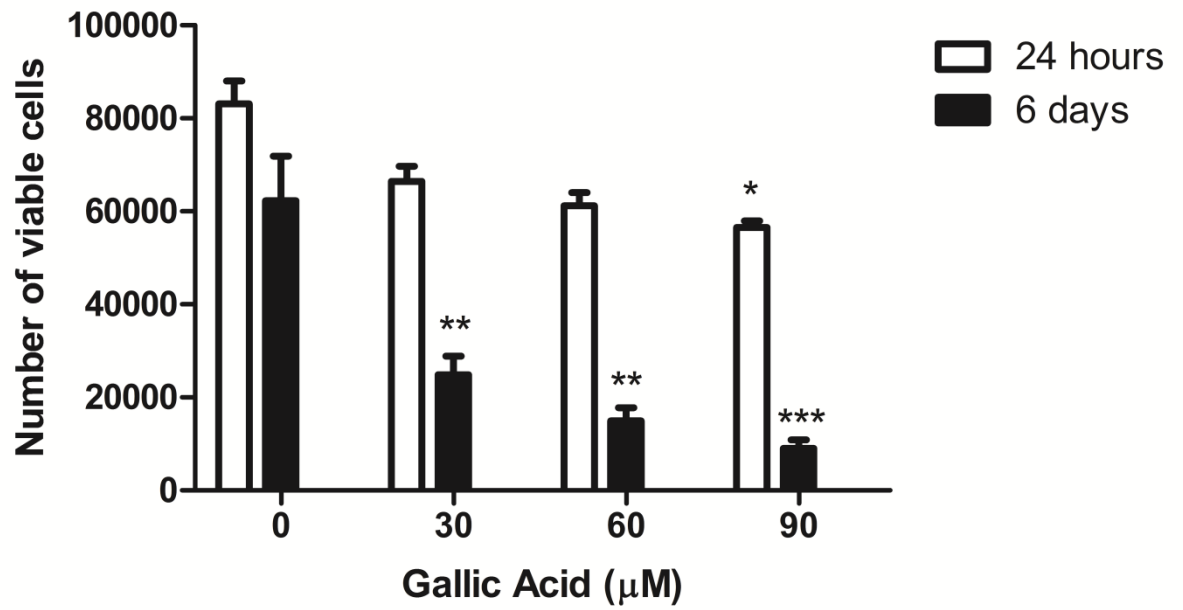


Figure 2 - Effect of GA on cell viability in 24 hours and 6 days. Cell viability assessed by direct cell counting. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). The results were expressed as the number of viable cells. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with control.

FIGURE 3

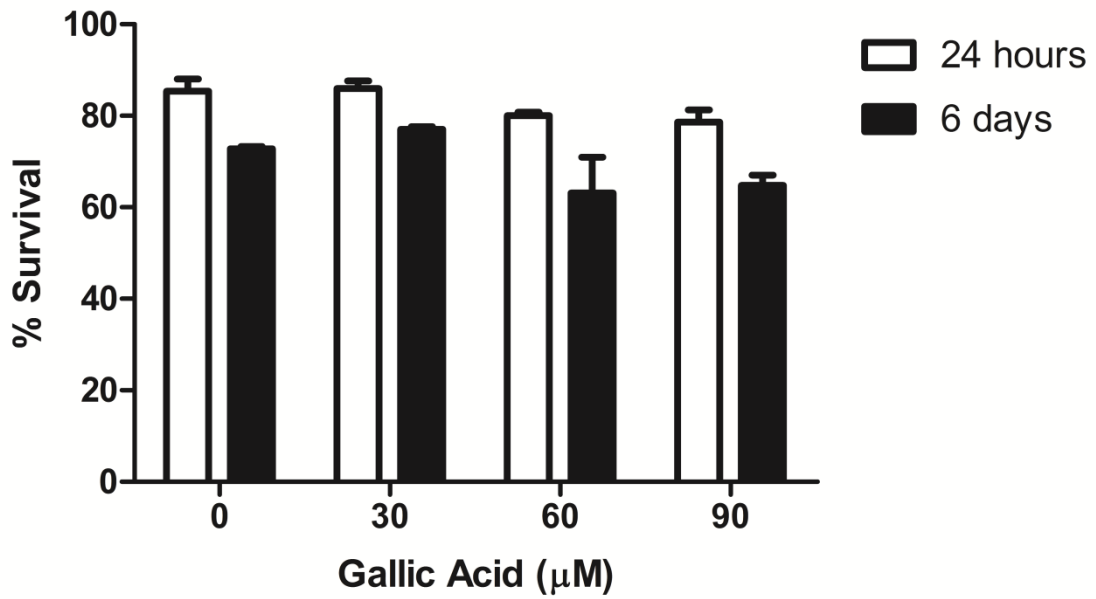


Figure 3 - Percent of survival by the release of lactate dehydrogenase (LDH). GRX cells treated with gallic acid at concentrations 30, 60 and 90 µM and incubation times of 24 hours and 6 days and the control group. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P < 0.05: control vs. treated cells.



FIGURE 4

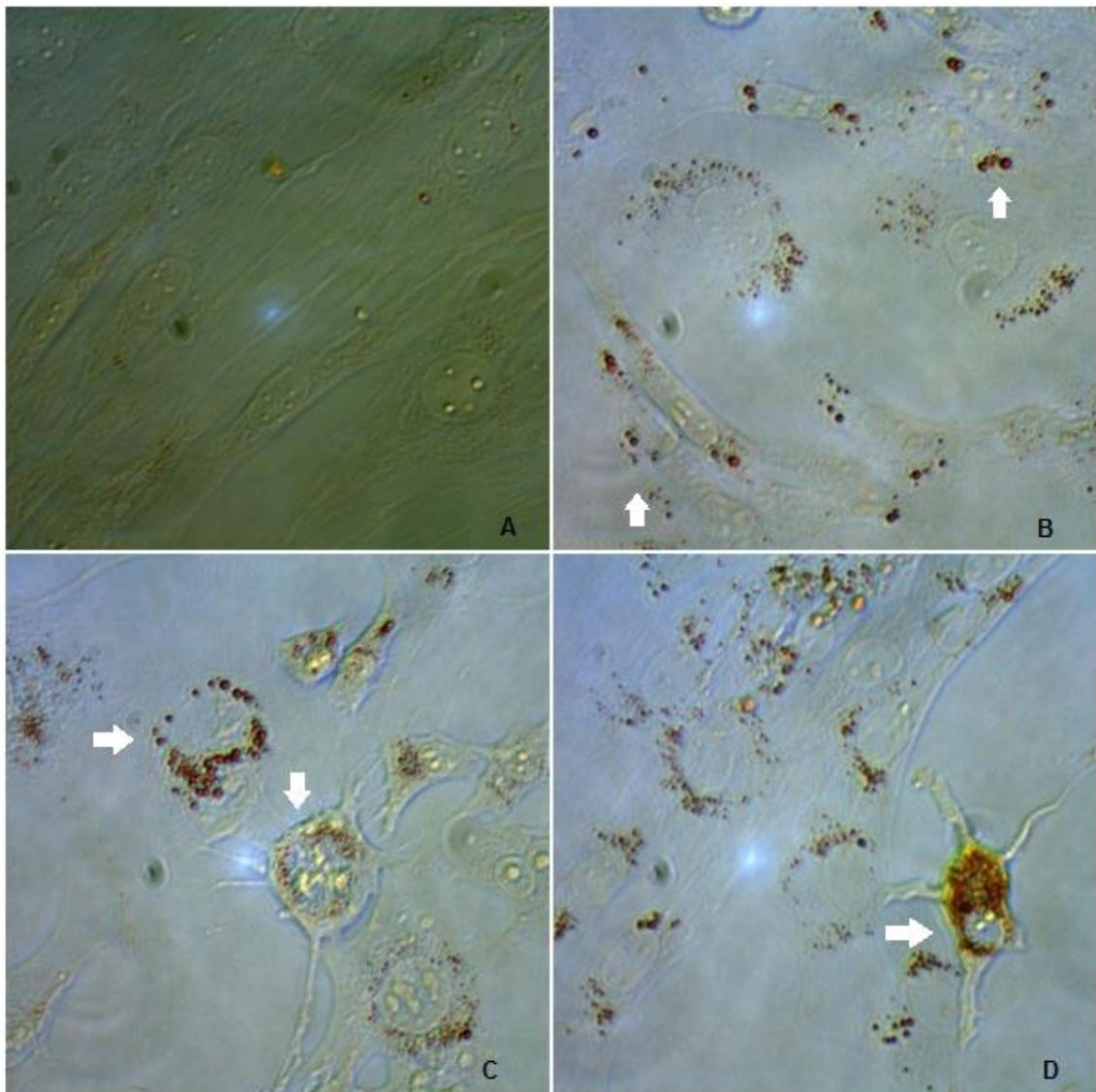


Figure 4 - Oil Red-O (ORO) staining of GRX cells at day 6. (A) Control cells; (B), (C), (D) cells treated with gallic acid at 30, 60 and 90  $\mu\text{M}$ , respectively. White arrows indicate lipid droplets.

FIGURE 5

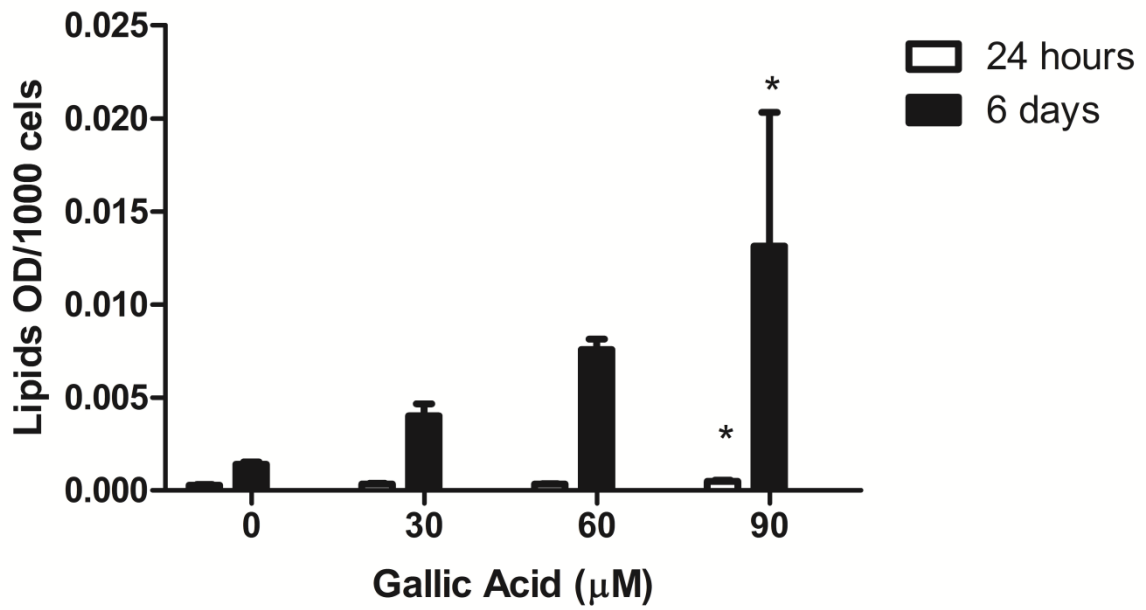


Figure 5 - Specific lipid content expressed spectrophotometrically as the ratio of absorbance value obtained for ORO per cell number. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). \* $P < 0.05$ , compared with control.

FIGURE 6

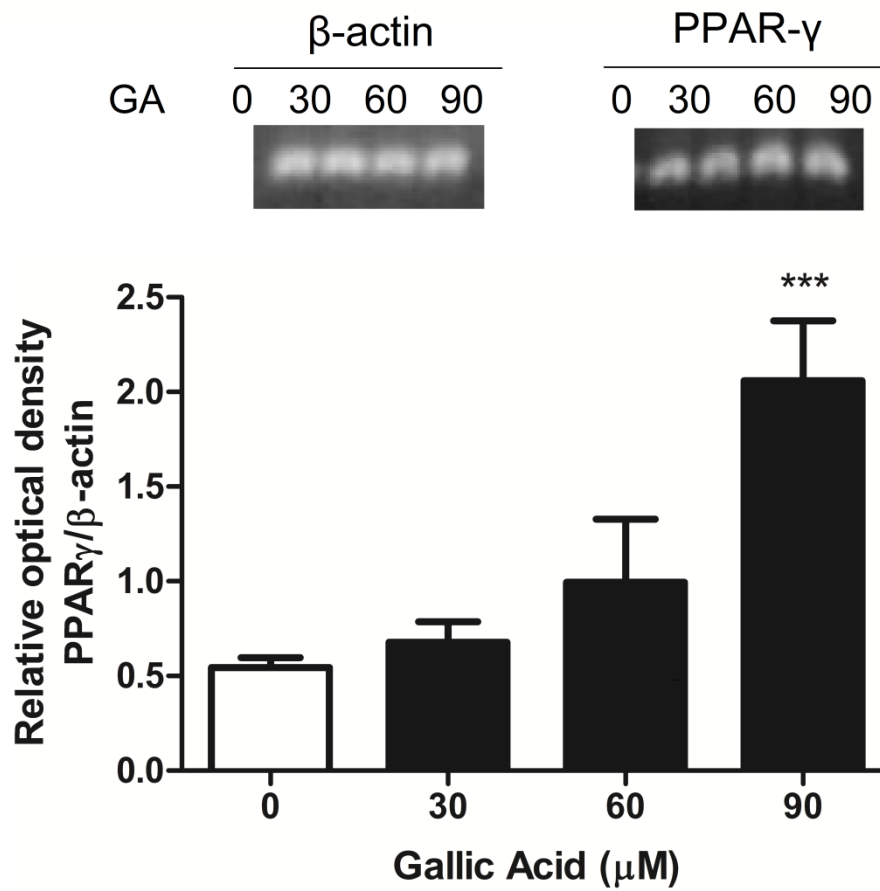


Figure 6 - Effects of GA on PPAR- $\gamma$  mRNA expression of GRX cells treated for 24 hours.  $\beta$ -actin was an internal control for equal loading. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Results are presented as relative optical PPAR- $\gamma$  density/ $\beta$ -actin. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with control.

FIGURE 7

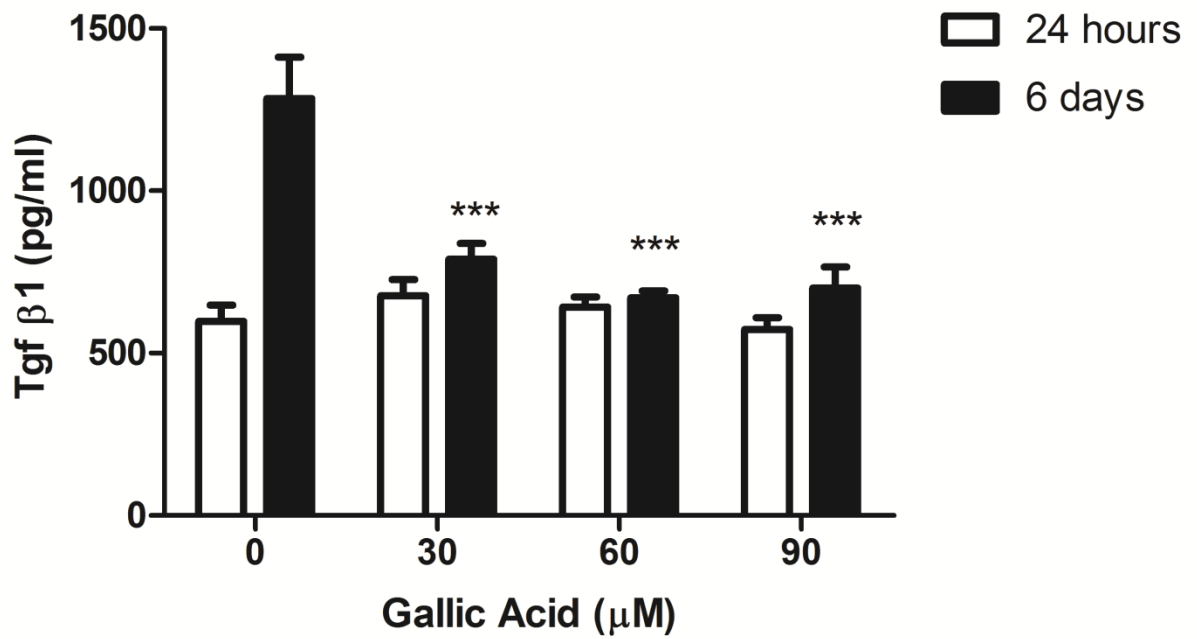


Figure 7 - ELISA assay of TGF-β1 in cell supernatant of 24 hours and 6 days treatments. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). TGF-β1 levels were expressed as picograms per milliliter\*\*\*  $P < 0.001$  compared with control.

FIGURE 8

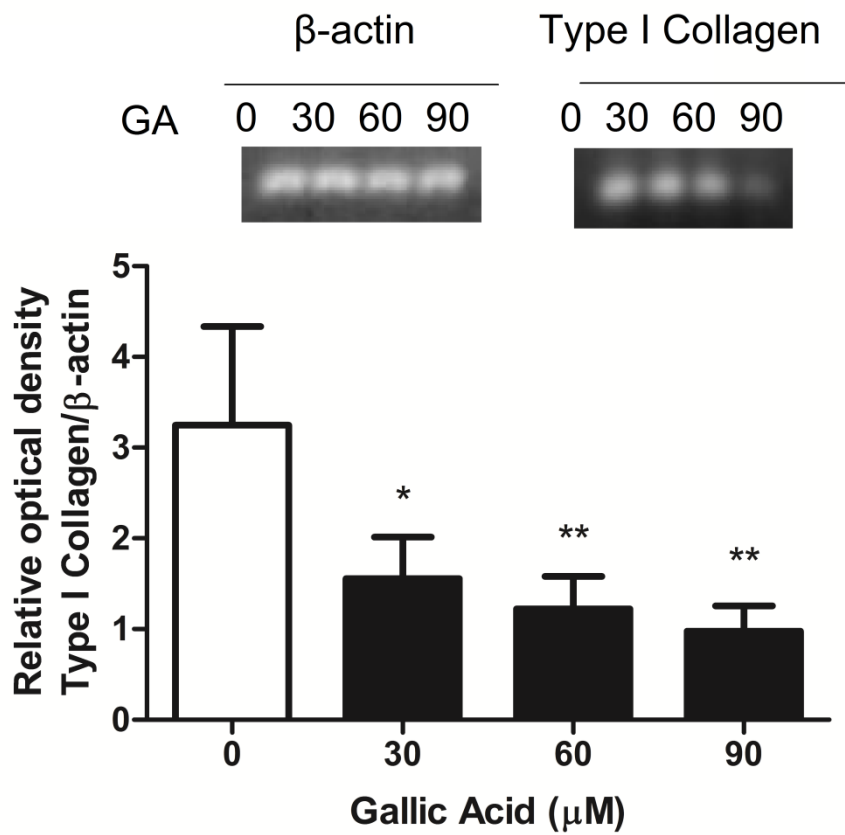


Figure 8 - Effects of gallic acid (GA) on type I collagen mRNA expression of GRX cells treated for 24 hours. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3).  $\beta$ -actin was an internal control for equal loading. Results are presented as relative optical density type I collagen/ $\beta$ -actin. \*  $P < 0.05$  compared with control.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(3):524-9.
2. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004;1(2):98-105.
3. Nevzorova YA, Hu W, Cubero FJ, Haas U, Freimuth J, Tacke F, et al. Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013.
4. Shirakami Y, Lee S-A, Clugston RD, Blaner WS. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012;1821(1):124-36.
5. Chen A, Tang Y, Davis V, Hsu FF, Kennedy SM, Song H, et al. Liver fatty acid binding protein (L-Fabp) modulates murine stellate cell activation and diet induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013.
6. Geerts A, editor. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease*; 2001: Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
7. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008;88(1):125-72.
8. Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourão PA, Emonard H, et al. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1985;21(7):382-90.
9. Bragança de Moraes CM, Melo DA, Santos RC, Bitencourt S, Mesquita FC, Santos de Oliveira FD, et al. Antiproliferative effect of catechin in GRX cells. *Biochem Cell Biol*. 2012;90(4):575-84.
10. Bitencourt S, de Mesquita FC, Caberlon E, da Silva GV, Basso BS, Ferreira GA, et al. Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell. *Biochemistry and Cell Biology*. 2012;90(5).
11. Bitencourt S, Mesquita F, Basso B, Schmid J, Ferreira G, Rizzo L, et al. Capsaicin Modulates Proliferation, Migration, and Activation of Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*.1-10.
12. Vicente CP, Fortuna VA, Margis R, Trugo L, Borojevic R. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;187(1-2):11-21.
13. de Mesquita FC, Bitencourt S, Caberlon E, da Silva GV, Basso BS, Schmid J, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell. *European Journal of Pharmacology*. 2013.
14. Niemetz R, Gross GG. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*. 2005;66(17):2001-11.
15. Kim Y-J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(6):1052-5.
16. Abdelwahed A, Bouhleb I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, et al. Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4,

- 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-biological interactions*. 2007;165(1):1-13.
17. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*. 2011;49(4):396-402.
18. Hsu C-L, Yen G-C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*. 2007;98(4):727-35.
19. Labieniec M, Gabryelak T. Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006;82(1):72-8.
20. Liang C-z, Zhang X, Li H, Tao Y-q, Tao L-j, Yang Z-r, et al. Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of Mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2012;27(10):701-10.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol methods*. 1983;65(1-2):55-63.
22. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*. 1989;119(2):203-10.
23. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001:A. 3B. 1-A. 3B. 2.
24. Spiller F, Alves MK, Vieira SM, Carvalho TA, Leite CE, Lunardelli A, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;60(4):473-8.
25. Guimaraes EL, Franceschi MF, Andrade C, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, et al. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver International*. 2007;27(9):1255-64.
26. Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palù G, Martines D. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(3):G571-G8.
27. Hazra S, Miyahara T, Rippe RA, Tsukamoto H. PPAR gamma and hepatic stellate cells. *Comp Hepatol*. 2004;3(Suppl 1):S7.
28. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupffer cells. *Hepatology*. 1998;27(5):1265-74.
29. Bitencourt S, Mesquita F, Basso B, Schmid J, Ferreira G, Rizzo L, et al. Capsaicin Modulates Proliferation, Migration, and Activation of Hepatic Stellate Cells. *Cell biochemistry and biophysics*. 2013:1-10.
30. Zhang F, Lu Y, Zheng S. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis. *Cellular Signalling*. 2012;24(3):596-605.
31. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(5):1887-901.

32. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(3):598-606.
33. Qian J, Niu M, Zhai X, Zhou Q, Zhou Y.  $\beta$ -Catenin pathway is required for TGF- $\beta$ 1 inhibition of PPAR $\gamma$  expression in cultured hepatic stellate cells. *Pharmacological Research*. 2012;66(3):219-25.
34. Deng Y-L, Xiong X-Z, Cheng N-S. Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor- $\beta$  signaling via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2012;11(5):467-78.
35. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor  $\beta$  and the liver. *Hepatology*. 2001;34(5):859-67.
36. Ye Y, Dan Z. All-trans retinoic acid diminishes collagen production in a hepatic stellate cell line via suppression of active protein-1 and c-Jun N-terminal kinase signal. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2010;30:726-33.



## Dashboard

- To submit a new manuscript, click on the "Submit a Manuscript" link below.
- Clicking on the various manuscript status links under "My Manuscripts" will display a list of all the manuscripts in that status at the bottom of the screen.
- To continue a submission already in progress, click the "Continue Submission" link in the "Unsubmitted Manuscripts" list.

We work together with Wiley's Open Access Journal, *Clinical Case Reports*, to enable rapid publication of high quality case reports that we are unable to accept for publication in our journal. Authors will be offered the option of having their case report, along with any related peer review comments, automatically transferred for consideration by the *Clinical Case Reports* editorial team.

My Manuscripts	Author Resources
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 <a href="#">Unsubmitted Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Revised Manuscripts in Draft</a></li> <li>1 <a href="#">Submitted Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts with Decisions</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts I Have Co-Authored</a></li> <li>0 <a href="#">Withdrawn Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Invited Manuscripts</a></li> </ul>	<p><b>★ Click here to submit a new manuscript</b></p> <p>This section lists the subjects of the five most recent e-mails that have been sent to you regarding your submission(s). To view an e-mail, click on the link. To delete an e-mail from this list, click the delete link.</p> <p style="text-align: right;"><a href="#">Manuscript submitted - LTVint-13-01028</a> <a href="#">Delete (11-Nov-2013)</a></p>

## Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
LTVint-13-01028	Galic acid induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell [ <a href="#">View Submission</a> ]	06-Nov-2013	11-Nov-2013	JA: Ekin, Philippa • Under review

[top](#)

ScholarOne Manuscripts™, v4.13 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.  
 ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

LIVint-13-01028

11-Nov-2013

Gallic acid induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell

Dear Miss Schuster,

The editorial office of Liver International has received your recently submitted manuscript, entitled "Gallic acid induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell" .

You will be informed of the decision as soon as possible. Your manuscript should not be submitted to another journal while under review at Liver International.

Please take note of the assigned number above for the purpose of all future correspondence pertaining to this manuscript.

please add conflict of interest and fund source in between acknowledgments and references when you revise the manuscript.

Thank you for your interest in Liver International.

Yours Sincerely

Philippa Ekin  
Editorial Assistant Liver International