

BÁRBARA DE SOUZA SCHERER

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIFIBRÓTICOS DO SUCO TOTAL E FRAÇÕES
DA PIMENTA *Capsicum baccatum* NA LINHAGEM CELULAR GRX**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, 2010.

Agradecimentos

A PUCRS pela bolsa concedida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pela ideia original do trabalho e pelas nossas infindáveis discussões.

Aos professores e colegas do Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação que proporcionaram um ambiente de trabalho extremamente agradável e me ajudaram sempre que preciso. Um agradecimento especial a toda a equipe da Cultura de Células que teve a missão de implantar essa nova cultura na rotina do laboratório e de enfrentar as adversidades que vieram junto com a técnica.

Ao Laboratório de Cultura Celular e Centro de Terapia Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela doação das células e pelo apoio técnico.

À minha família. Aos meus pais maravilhosos que muitas vezes abdicaram dos sonhos deles para que eu pudesse realizar os meus e a minha irmã Verônica pelo apoio, por entender a minha ausência e muitas vezes o meu estresse.

Agradeço a todas as minhas amigas, que me acompanham há muito tempo, comemorando comigo todas as minhas vitórias. Em especial, agradeço a amiga Daniela Rodriguez, colega do PPGBCM, que por acompanhar diariamente minhas pesquisas sabe quase tanto do meu trabalho quanto eu.

Resumo

Neste estudo foram avaliados os efeitos antifibróticos e antiproliferativos do suco total da pimenta vermelha Dedo-de-Moça, *Capsicum baccatum* (CB) e de frações da semente e do fruto de CB extraídas com os solventes de diferentes polaridades: água, metanol/água, butanol e diclorometano. O estudo foi realizado *in vitro*, em cultura de células GRX, uma linhagem murina de células hepáticas estreladas, que estão no estágio de miofibroblastos, mimetizando um modelo de fibrose hepática humana.

O suco de pimenta e suas frações inibiram a proliferação celular da linhagem GRX. Este efeito foi comparado com a indometacina, utilizado como controle positivo da reversão fenotípica e conhecido por exercer efeito antiproliferativo e anti-inflamatório. Para justificar se o suco total e frações de CB provocaram inibição do crescimento das células GRX através de um mecanismo celular ou por morte celular, foi dosada a liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) após o tratamento. Os grupos foram comparados com o controle de morte celular total – Tween 5%, que obteve valores significativamente maiores de LDH, demonstrando que o efeito antiproliferativo do suco e frações de CB não foi através de morte celular. Além disso, na tentativa de verificar se havia aumento do estresse oxidativo, foram dosadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nenhum dos grupos tratados diferiu significativamente do controle. Após tratamento com suco total e frações de CB durante 5 dias, as culturas celulares foram coradas com Oil Red O, corante que evidencia a presença de gordura no citoplasma celular. Tanto as culturas tratadas com o suco total, quanto às culturas tratadas com as frações de CB, apresentaram formação de gotículas de gordura e mudança fenotípica evidente maiores que o controle e que o controle positivo de reversão do fenótipo, a indometacina (aumento de 400x). Além disso, a quantificação do TGF- β , que é um mediador pró-fibrogênico, no sobrenadante das culturas tratadas com suco e frações de CB foi menor do quando comparada ao controle. Esses resultados demonstraram os efeitos antifibróticos da pimenta vermelha *Capsicum baccatum* e evidenciam seu importante potencial terapêutico como agente antifibrótico.

Palavras chave: *Capsicum baccatum*, fibrose, GRX, inflamação.

Abstract

This study evaluated the antiproliferative and antifibrotic effects of the total juice red pepper “Dedo-de-Moça”, *Capsicum baccatum* (CB) and fractions of CB seed and fruit extracted with solvents of different polarity: water, methanol/water, butanol and dichloromethane. The study was realized *in vitro*, in cell culture GRX, a strain of murine hepatic stellate cells, which are at the stage of myofibroblasts, mimicking a model of human liver fibrosis.

The pepper juice and its fractions inhibited the proliferation in cell culture line GRX. The effect of CB juice and fractions was compared with indomethacin, used as a positive control of phenotype reversion, known to exert antiproliferative and anti-inflammatory action. To justify if the CB juice and fractions caused inhibition of cell growth GRX through a cellular mechanism or cell death was measured release of Lactate Dehydrogenase enzyme after the treatment. The groups were compared with the control of cell death - Tween 5%, which has significantly higher values of LDH, showing that the antiproliferative effect of the CB juice and fractions was not by cell death. Furthermore, in an attempt to see if there was increased oxidative stress we measured the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). None of the treated groups differed from control. After treatment with CB juice and fractions for 5 days, cell cultures were stained with Oil Red O stain showing the presence of fat in the cell cytoplasm. Both cultures treated with juice, as the cultures treated with CB fractions showed the formation of fat droplets and phenotypic changes more evident than the control and positive control of phenotype reversion, indomethacin (increased 400x). Furthermore, the quantification of TGF- β , a profibrogenic mediator, in the supernatant of cultures treated with juice and fractions of CB was lower when compared to control. These results show the antifibrotic effects of red pepper *Capsicum baccatum* and demonstrate its important therapeutic potential as an antifibrotic agent.

Keywords: *Capsicum baccatum*, fibrosis, GRX, inflammation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	6
1.1 INTRODUÇÃO	6
1.1.1 <i>Alimentos Funcionais</i>	6
1.1.1.1 <i>A família Solanaceae</i>	6
1.1.1.2 <i>Gênero Capsicum e espécies</i>	7
1.1.1.3 <i>Capsicum baccatum (CB)</i>	7
1.1.1.4 <i>Potencial Terapêutico das Pimentas</i>	8
1.1.2 <i>Fibrose Hepática</i>	11
1.1.2.1 <i>Papel do TGF-β na Fibrose Hepática</i>	18
1.1.2.2 <i>Radicais Livres e Estresse Oxidativo</i>	19
1.1.2.3 <i>A Linhagem Celular GRX</i>	20
1.2 JUSTIFICATIVA	22
1.3 OBJETIVOS	23
1.3.1 <i>Objetivo Geral</i>	23
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	23
1.4 ASPECTOS ÉTICOS	24
CAPÍTULO 2	25
2.1 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	25
CAPÍTULO 3	50
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
CAPÍTULO 4	51
4.1 REFERÊNCIAS	51
ANEXO A	54
DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO	54

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os alimentos funcionais são definidos como aqueles que proporcionam benefícios a saúde ou tem um papel na prevenção de doenças. Esses podem prevenir, retardar ou auxiliar no tratamento de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, entre outras. Os componentes benéficos nos alimentos funcionais recebem diversos nomes, entre os quais a forma mais conhecida refere-se a eles como componentes bioativos. Os componentes bioativos exercem seus efeitos de diversas formas, agindo como antioxidantes, ativando a detoxificação de enzimas no fígado, bloqueando a atividade de toxinas virais ou bacterianas, inibindo a absorção do colesterol, diminuindo a agregação plaquetária ou destruindo bactérias gastrointestinais prejudiciais (Pennington et al., 2002).

Existem aproximadamente 120 alimentos naturais nos quais foram identificados componentes bioativos e portanto podem ser chamados de “funcionais”. Além disso, existem inúmeros produtos industrializados e suplementos nutricionais que também podem ser chamados de “funcionais” por adicionarem componentes bioativos em suas formulações. Os componentes bioativos incluem uma variada gama de compostos químicos com estruturas variadas como os carotenóides, flavonóides, esteróis de plantas, ácidos graxos ômega-3, compostos fenólicos, entre outros (Pennington et al., 2002). Dentre esses alimentos, inclui-se a pimenta vermelha que é usada há muito tempo na medicina empírica na Índia, África, América do Sul e China por suas propriedades terapêuticas (Spiller et al., 2007.)

1.1.1.2 A FAMÍLIA SOLANACEAE

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae; divisão: Spermatophyta; filo: Angiospermae; classe: Dicotiledônea; ramo: Malvales-Tubiflorae; ordem: Solanales (Pennington et al., 2002).

São plantas herbáceas, arbustivas ou arbóreas, com desenvolvimento de floema intraxilemático no caule, de folhas alternas, inteiras ou partidas, sem estípulas. As flores em geral são pequenas, pentâmeras, diclamídeas, hermafroditas, de simetria radial ou fracamente zigomorfa. O androceu é formado por cinco estames, alternos com lobos da corola, às vezes se abrindo por poros (*Solanum*). O ovário é bicarpelar, bilocular, súpero, com septo inclinado em relação ao eixo da flor. Os lóculos do ovário às vezes são numerosos por divisão da placenta. Possuem óvulos numerosos e o fruto é seco, capsular, loculicida ou baciforme (Wagner et al., 2003).

1.1.1.3 GÊNERO *CAPSICUM* E ESPÉCIES

O gênero *Capsicum* é representado pelas pimentas e pimentões, as espécies mais conhecidas são *C.annuum*, *C.frutescens*, *C.baccatum*, *C.pubscens* e *C.chinese* (Ogorzaly et al., 1995).

A pungência (o ardor, picância, típico das pimentas) das pimentas do gênero *Capsicum* deve-se aos capsaicinóides. Estes são encontrados quase exclusivamente na placenta e nas sementes e, em menor grau no pericarpo (Goodwin et al., 2003).

Há uma escala que mede a ardência das pimentas, denominada escala de temperatura, criada por Julie Cohn. Nessa, as pimentas são classificadas de 1 a 10. Os graus 8, 9 e 10 são reservados às espécies muito picantes; 4, 5, 6 para as de média ardência e 1, 2 e 3 para as variedades mais suaves (Joly et al., 1998).

O teor de capsaicinóides é avaliado pela escala de Unidade de Calor Scoville (*Scoville Heat Unit* – SHU), cujos valores variam de 0 a 300 mil SHU. Cultivares com até 30 mil SHU são considerados de baixa pungência; com valores entre 30 mil e 75 mil SHU, média pungência; entre 75 mil a 120 mil, alta pungência; e acima de 120 mil, pungência muito alta (Reifschneider FJB, 2000).

1.1.1.4 *CAPSICUM BACCATUM* (CB)

As características morfológicas principais da *Capsicum baccatum* variedade Pendulum são: apresentam de uma a duas flores, na antese, pedicelos geralmente

eretos, corola branca sempre apresentando um par de manchas amareladas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas. Os cálices dos frutos maduros são dentados. Os frutos são de várias cores e formas, geralmente pendentes, persistentes, com polpa firme e as sementes são cor de palha (EMBRAPA Hortaliças, 2009; Joly et al., 1998).

São exemplos de frutos de CB: Cambuci, Cumari verdadeira, Dedo-de-Moça, Peito-de-Moça, pimenta fina e pitanga. Originários da América do Sul, cultivados principalmente na Argentina, Colômbia, Equador e Brasil (Joly et al., 1998; Linguanotto et al., 2004), sendo que seus frutos medem entre 6,8 e 8,0 cm e têm de 1,0 a 1,5 cm de largura. Sua pungência é baixa: na escala Scoville oscila de 5 mil a 15 mil SHU e de 5 a 6 na escala de temperatura (Joly et al., 1998).

1.1.1.5 POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS PIMENTAS

A pimenta vermelha CB é conhecida popularmente no Brasil como pimenta Dedo-de-Moça. Os tipos mais comuns e cultivados da espécie CB no Brasil são as pimentas Dedo-de-Moça, Chifre-de-Veado e Cambuci (também conhecida como Chapéu-de-Frade). Neste grupo, a pungência dos frutos não é muito forte, havendo inclusive cultivares da pimenta Cambuci que são doces. A pimenta Dedo-de-Moça é cultivada principalmente nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Spiller et al., 2007; EMBRAPA Hortaliças, 2009). No Brasil são produzidas inúmeras variedades de pimenta movimentando em torno de 80 milhões de reais por ano. Apenas a comercialização de sementes é responsável por um mercado de mais de 3 milhões de reais (Reifschneider et al., 2000).

Os frutos de *Capsicum* são consumidos *in natura* ou processados como condimentos, conservas e corantes. A principal característica dos frutos da pimenta é a pungência, provocada pelos capsaicinóides (Wagner et al., 2003). Os capsaicinóides são alcalóides presentes nas pimentas do gênero *Capsicum*, sendo os mais abundantes a capsaicina (*trans*-8-metil-N-vanilil-6-nonamida) e a dihidrocapsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonamida), cujas estruturas químicas são ilustradas na figura 1, compreendendo aproximadamente 80% do conteúdo total de capsaicinóides desses frutos. Outros capsaicinóides já foram identificados, em quantidades muito menores, incluindo nordiidrocapsaicina, homocapsaicina,

homodihidrocapsaicina, capsaicinol - análogo não pungente da capsaicina que é isolado de frutos de *Capsicum frutescence* L- e nonivamida, observada em níveis baixos em fontes naturais, mas usualmente obtida sinteticamente. Os capsaicinóides estão presentes nos frutos de pimenta do gênero *Capsicum* em níveis que variam de 0,1 a 1% (Goodwin et al., 2003; Surh et al., 1998).

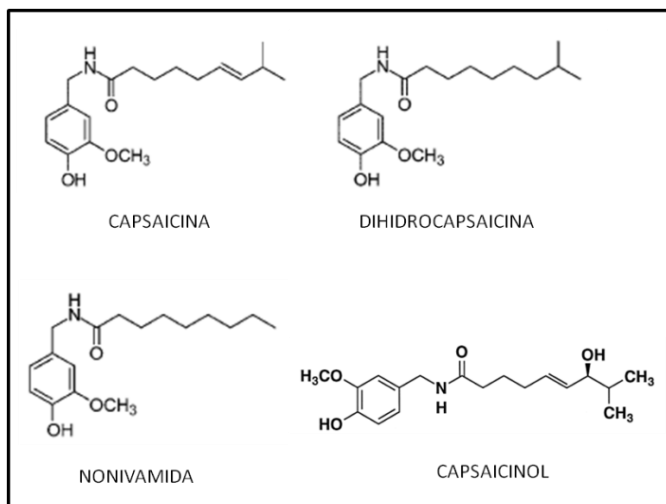


Figura 1: Estruturas químicas da capsaicina, dihidrocapsaicina, nonivamida e capsaicinol. Adaptado de Surh, Y. J; Lee, E. e Lee, J. M; 1998.

A pungência e os efeitos nociceptivos dos capsaicinóides resultam da ligação a um receptor expresso por neurônios aferentes nociceptivos, o receptor vanilóide de potencial transitório (TRPV1). Após ligarem-se, os capsaicinóides provocam influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} causando a despolarização e o início de potenciais de ação. Isso é seguido por um período refratário onde ocorre resistência neuronal não só à exposição a mais capsaicinóides como também a outros estímulos dolorosos. Esse é o princípio do uso extensivo de agentes tópicos, como pomadas e óleos, a base de capsaicina, para o tratamento de dor aguda ou crônica. O receptor TRPV1 é um canal iônico não seletivo que responde não só aos capsaicinóides, mas também ao aumento de temperatura (45°C é o limiar para dor) e a concentrações de hidrogênio na faixa micromolar ($\text{pH} < 5,5$), que também causam dor (Goodwin et al., 2003; Rang et al., 2008).

Estudos relatam que as propriedades terapêuticas da pimenta estão relacionadas aos capsaicinóides. A capsaicina demonstrou ser gastroprotetora (Surh et al., 1998), anti-inflamatória (Spiller, et al., 2007, Surh et al., 1998, Surh et al., 1999), antifúngica contra dermatófitos e antiagregante plaquetária (Surh et al., 1998

e Surh et al.,1999). Além disso, o capsaicinol, análogo não pungente isolado da pimenta, também demonstrou ter atividade antioxidante (Surh et al., 1998).

O papel da capsaicina no câncer é controverso. Enquanto alguns autores sugerem que ela é carcinogênica, co-carcinogênica ou promotora de tumores, outros relatam que a mesma tem efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos. Contudo, a propriedade antiproliferativa da capsaicina tem sido creditada a sua capacidade de induzir apoptose em células tumorais. (Surh et al., 2002; Jung et al., 2000, Wu et al., 2006).

Estudos relatam que o extrato bruto e aquecido de algumas espécies do gênero *Capsicum* tem efeito inibitório sobre o crescimento de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* e *Streptococcus piogenes*. Autores sugerem que a ingestão de pimenta vermelha possa afetar a microflora intestinal diretamente através da ação bacteriana e indiretamente através de outras ações fisiológicas (Takashi et al., 2004).

Naidu e Thippeswamy comprovaram a capacidade antioxidante da capsaicina em inibir a oxidação da LDL em grau semelhante a antioxidantes controle como ácido ascórbico (vitamina C) e butil hidroxianisol (BHA) (Naidu et al., 2002). Outro estudo evidenciou diminuição dos níveis de lipídeos plasmáticos em camundongos após dieta rica em gorduras e suplementada com pimenta *Capsicum annum* var. *conoides* desidratada. Os animais do grupo tratado tiveram diminuição significativa nos níveis de triglicerídeos plasmáticos e de gordura epididimal quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas dieta hipercalórica (Takashi et al., 2004). A ação hipercolesterolêmica dos compostos extraídos da pimenta também foi demonstrada em estudo com ratos, no qual os animais com hipercolesterolemia foram tratados com a incorporação as suas dietas de 0,2% de curcumin, 0,015% de capsaicina e 2,0% de alho. Os animais teste apresentaram redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos (Kempaiah et al., 2002). Um terceiro estudo nesta mesma linha evidenciou diminuição das concentrações de LDL, VLDL, triglicerídeos, ação diminuída da HMG-CoA redutase (enzima que controla a síntese de colesterol) e proteína de transferência de colesteril-ésteres (CETP) em coelhos que receberam por 12 semanas dieta contendo 1 % de pimenta (*Capsicum annum*) em pó (Kwon et al., 2003).

A ação anti-inflamatória da pimenta CB foi avaliada recentemente em um estudo que utilizou o suco total do fruto de CB, obtido por prensagem para tratamento de pleurisia induzida por carragenina em ratos Wistar. O pré-tratamento que os animais receberam com o suco, 30 minutos antes da indução da pleurisia diminuiu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório, diminuiu o volume de exsudato, a concentração das proteínas totais e LDH no exsudato de animais do grupo tratado quando comparados ao grupo controle. Além disso, o grupo tratado também teve menores níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β no fluido peritoneal do que o grupo controle. Essas evidências sugerem que o suco total do fruto de CB exiba propriedades anti-inflamatórias (Spiller et al., 2007).

1.1.2 FIBROSE HEPÁTICA

A fibrose é uma resposta cicatricial que ocorre em quase todos os pacientes com lesão hepática crônica (Friedman et al., 2008-a). Embora a lesão aguda ative mecanismos de fibrogênese, os sinais associados com lesões crônicas causadas por infecções, drogas, desordens metabólicas, abuso de álcool, hepatite não alcoólica ou ataque imune são necessários para a fibrose se acumular (Krizhanovsky et al., 2008; Friedman et al., 2008-a). O prolongamento natural dessa resposta, em contraste com a progressão mais rápida da fibrose nos rins ou pulmões, é creditado à capacidade excepcional do fígado de regeneração, pois se sabe que 80 a 90% da capacidade funcional do fígado deve estar comprometida para que ocorra falência hepática, tamanha a reserva funcional desse órgão (Friedman et al., 2008-a; Lida et al., 2005).

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

A esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado) ainda não possui mecanismo totalmente definido e apesar de estar associada a patologias como obesidade, abuso de álcool, *diabetes mellitus* do tipo 2, síndrome metabólica e hipertensão, também pode afetar pessoas sem essas doenças associadas que tem maior predisposição genética para desenvolvê-la (Farrell et al., 2006). Isso representa outra importante causa de fibrose e cirrose com aumento crescente no mundo. A esteatose hepática pode ser associada ou não ao consumo excessivo de álcool. A WHO estima que a esteatose hepática não alcoólica afete 50% da população obesa mundial (Kerdilès et al., 2008).

A cirrose hepática é considerada um estágio avançado de fibrose e um dos maiores problemas de saúde mundial (Friedman et al., 2008-a/b). Compreende todas as complicações da doença hepática no estágio final, que inclui hipertensão portal, ascite, encefalopatia e alterações no metabolismo, principalmente de lipídeos e glicose (Friedman et al., 2008-b). O maior determinante da cirrose hepática é a dificuldade em degradar a matriz fibrótica, o que provoca destruição da arquitetura hepática, interrupção das funções hepáticas com disfunção do órgão (Friedman et al., 2008-a; Iredale et al., 2008; Sarem et al., 2006).

As Células Hepáticas Estreladas (HSC, *Hepatic Stellate Cells*) são também chamadas de lipócitos, células armazenadoras de gordura, células armazenadoras de vitamina A, células intersticiais ou células de Ito (Sarem et al., 2006; Senoo et al., 2004). Foram descobertas por Kuppfer em 1876 e caracterizadas quase um século depois por Ito e Nemoto como células armazenadoras de gordura (Winau et al., 2008).

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

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

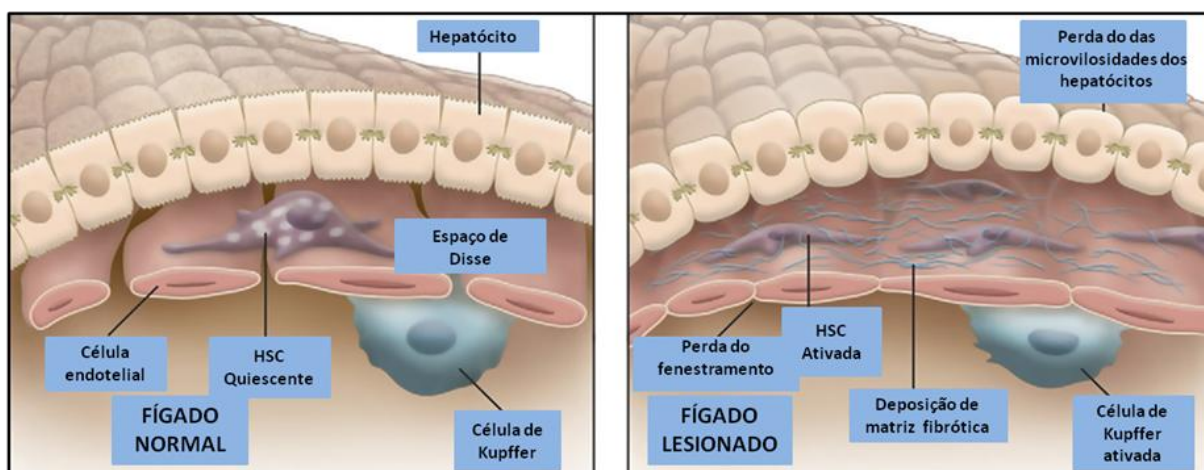


Figura 2: Papel das células residentes do fígado na lesão hepática. As mudanças no espaço perisinusoidal de Disse durante o desenvolvimento da fibrose em resposta a alguma lesão no fígado incluem alterações tanto no comportamento celular quanto na composição da ECM. A ativação das HSC leva a deposição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

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

Em condições normais as HSC cumprem várias funções no fígado, entre elas as mais importantes são: armazenamento da vitamina A, controle da comunicação intercelular através da liberação de mediadores e remodelamento da ECM. Com relação ao remodelamento da ECM este pode ser feito por meio de:

- a) produção de componentes colágenos e não colágenos da ECM;

b) síntese das metaloproteinases (MMP), grupo de enzimas encarregadas de degradar os componentes da ECM. Inclui: colagenases, gelatinases e estromalinas (Sarem et al., 2006).

c) síntese dos inibidores tissulares das MMP (TIMP), que controlam a atividade catalítica das MMP a fim de manter o equilíbrio entre a síntese e a degradação dos componentes da ECM (Sarem et al., 2006) e regulação do fluxo sanguíneo hepático (Winau et al., 2008).

Além disso, alguns estudos relatam que as HSC têm um papel crucial no sistema imune hepático. Elas expressam receptores para os lipopolissacarídeos bacterianos, os TRL, moléculas co-estimulatórias e citocinas necessárias para a modulação da resposta imune, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos APC (Winau et al., 2008).

O desenvolvimento de fibrose hepática é baseado na ativação das HSC que sofrem mudanças fenotípicas características. Essa ativação é um processo patológico que se caracteriza pela perda das gotículas de gordura onde a vitamina A é armazenada, pelo aumento do número e tamanho celulares e pela diferenciação das HSC em células proliferativas, fibrogênicas, contráteis muito similares aos miofibroblastos (Friedman et al., 2008-a/b; Sarem et al., 2006).

A ativação das HSC consiste em duas subfases: iniciação e perpetuação, seguidas pela fase final chamada resolução. 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 MMPs que liberam fatores de crescimento, lesões ao fígado e mudanças na composição da ECM, pois, os hepatócitos são uma grande fonte de espécies reativas de oxigênio, como superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, produtos da síntese final do aldeído geradas durante lesão a membrana e peroxidação lipídica (Friedman et al., 2008-a). Inúmeros substratos podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo etanol, ácidos graxos poliinsaturados e ferro. A iniciação compreende mudanças transcricionais nas células HSC e indução de novo genes (Friedman et al., 2000).

A perpetuação das HSC envolve mudanças no comportamento das mesmas como: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz extracelular e perda de retinóides (Friedman et al., 2008-a). Um grande número de citocinas e mediadores solúveis intercelulares estão relacionados a alterações no comportamento e fenótipo das HSC (desenvolvem um fenótipo contrátil e fibrogênico) que ao sofrerem estas mudanças levam ao desenvolvimento da fibrose (Friedman et al., 2008-a/b; Iredale et al., 2008; Sarem et al., 2006; Friedman et al., 2000). É possível classificar as citocinas e mediadores intercelulares de maior importância através de seus efeitos sobre as HSC:

a) Proliferação e Quimiotaxia: O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Friedman et al., 2008-a/b), trombina e seu receptor (Friedman et al., 2008; Winau et al., 2008), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento insulinóide (IGF-1) (Krizhanovsky et al., 2008; Winau et al., 2008). A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) age sobre as HSC e também é secretada por elas após a ativação promovendo o extravasamento de monócitos e granulócitos ao tecido hepático e contribuindo para a formação do foco inflamatório (Winau et al., 2008).

b) Fibrogênese: fator de crescimento do tipo beta (TGF β -1) e interleucina 6 (IL-6) (Krizhanovsky et al., 2008; Winau et al., 2008).

c) Contratilidade: PDGF, endotelina-1 (ET-1), trombina, angiotensina II e vasopressina (ou hormônio antidiurético, ADH) (Winau et al., 2008). A ET-1 é sintetizada majoritariamente no fígado pelas HSC e atua em vários tipos celulares hepáticos, incluindo as próprias HSC ativadas, produzindo um aumento transitório da concentração de Ca²⁺ intracelular e conseqüente contração da célula. A contratilidade das HSC induzida por ET-1 aumenta progressivamente com o avanço da lesão hepática e é diretamente proporcional ao grau de ativação dessas células, sendo mais proeminente na cirrose (Rang et al., 2008; Sarem et al., 2006; Winau et al., 2008).

A angiotensina II (Ang II) é um potente vasoconstritor pertencente ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (Rang et al., 2008). Em células HSC ativadas existe uma expressão aumentada dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, tais como renina ativada, enzima conversora de angiotensina (ECA) e a

própria Ang II (Sarem et al., 2006; Winau et al., 2008). Além disso, sabe-se que pacientes com cirrose e ratos com fibrose hepática ativa, exibem Ang II sistêmica aumentada, bem como expressão aumentada do receptor de Ang II (AT₁R) no fígado (Wei et al., 2009). A conversão da Ang II em angiotensina I (Ang I) provoca inúmeras ações fisiopatológicas, dentre as quais o aumento de Ca²⁺ intracelular, com consequente aumento da pressão no sistema porta-hepático podendo provocar hipertensão portal (Sarem et al., 2006).

O ADH é um potente antidiurético produzido pelo hipotálamo, armazenado e liberado pela neurohipófise. Existem 3 classes de receptores de ADH: V₁, V₂ e V₃ (Rang et al., 2008). No fígado, o ADH produz diversos efeitos se ligando aos receptores do tipo V₁, recentemente identificados nas HSC. Esses efeitos são similares aos observados sobre as células do músculo liso vascular, tais como aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular, provocando vasoconstrição (Sarem et al., 2006).

d) Degradação da ECM: As HSC são a principal fonte de MMP dos tipos 2, 9 e 13 (MMP-13 é equivalente a MMP-1 em roedores). A MMP-1 é a principal protease que degrada o colágeno do tipo I, presente em grande quantidade no fígado com fibrose (Friedman et al., 2008-a). Estudos sugerem que o aumento dos TIMP em conjunto com a diminuição da atividade destas enzimas seria uma condição essencial para o desenvolvimento da fibrose (Kerdilès et al., 2008). Em pacientes com enfermidades hepáticas crônicas como colangite esclerosante, cirrose biliar primária, hepatite crônica autoimune e atresia biliar existe um aumento importante das concentrações tissulares dos TIMP dos tipos 1, 2 (expressos unicamente nas HSC), sendo que esse aumento pode ser cinco vezes maior do que no fígado normal, o que indicaria que a expressão dos TIMP pelas HSC favorece ainda mais o depósito do tecido fibrótico (Sarem et al., 2006).

Na resolução, as HSC podem sofrer apoptose ou voltarem a exibir um fenótipo quiescente, o que seria benéfico para o tecido hepático. Um estímulo que poderia controlar essa resposta é a interleucina 10 (IL-10). A IL-10 é antiinflamatória e aumenta a atividade das collagenases intersticiais. Esta citocina é induzida durante a ativação das HSC e pode estar relacionada a tentativa de interrupção do processo

fibrótico, agindo através do feedback negativo (Friedman et al., 2000). A figura 3 resume o processo fibrótico.

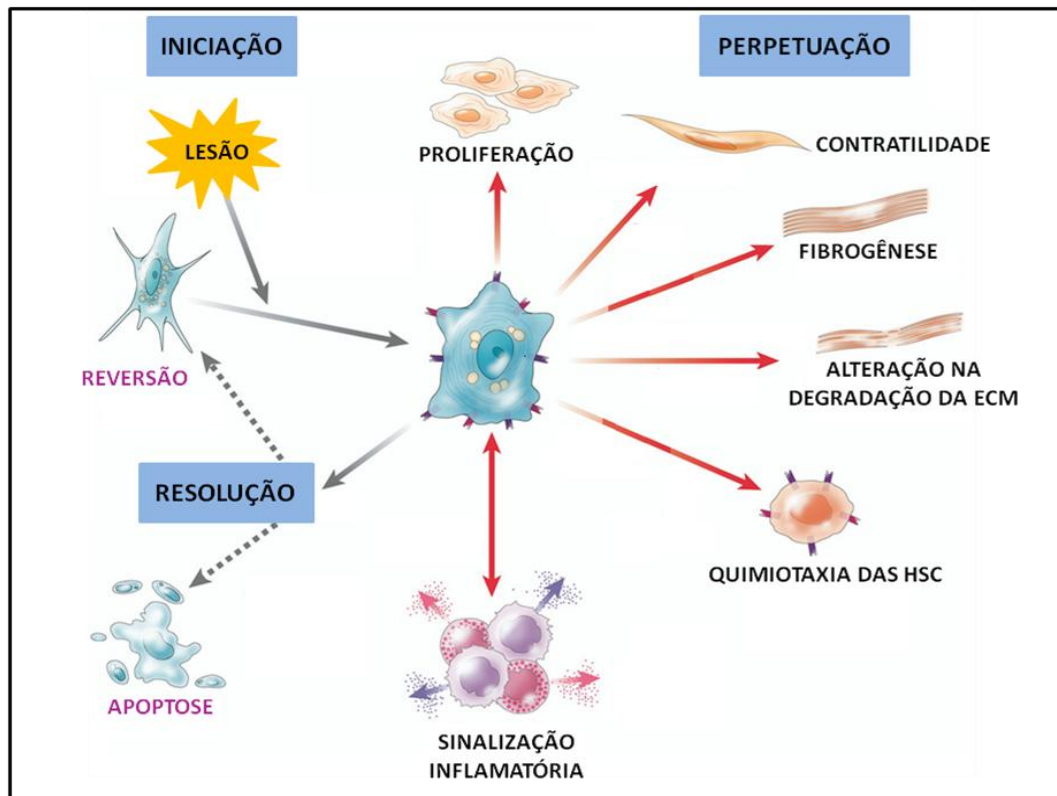


Figura 3: Vias de ativação das HSC. Características da ativação das HSC podem ser distinguidas entre aquelas que estimulam a iniciação e as que contribuem para a perpetuação. A iniciação é provocada por estímulos solúveis que incluem: estresse oxidativo (intermediários reativos de oxigênio), corpos apoptóticos,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

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

1.1.2.1 PAPEL DO TGF- β NA FIBROSE HEPÁTICA

O TGF- β (Transforming Growth Factor) exerce muitas ações, dentre as quais efeitos pró-fibrogênicos, anti-inflamatórios e imunossupressivos. O balanço destas ações é necessário para a manutenção da homeostasia dos tecidos e a expressão aumentada de TGF- β está relacionada a várias doenças hepáticas (Gressner et al., 2002). O TGF- β e mais de 30 proteínas relacionadas são membros da superfamília do TGF- β , que em mamíferos inclui 3 isoformas: TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3 (Gressner et al., 2002; Sarem et al., 2006). Todas elas estão presentes no fígado, mas não são expressas uniformemente. (Bissell, 2001).

As funções do TGF- β são distintas, pois ele inibe o crescimento de muitos tipos celulares enquanto estimula o crescimento de outros. A especificidade do TGF- β resulta de vários eventos distintos de sinalização, muitos ainda não completamente elucidados, envolvendo diferentes componentes regulatórios. Isto possibilita a esta citocina uma enorme plasticidade funcional, ela é anti-proliferativa para linfócitos, visto que camundongos sem TGF- β_1 exibiram inflamação com infiltração de células mononucleares nos tecidos, em contraste com seu efeito pró-fibrogênico no fígado e outros tecidos (Gressner et al., 2002; Bissell, 2001). O TGF- β exerce suas funções após ligar-se a receptores de membrana, e a isoforma TGF- β_1 é a mais importante a nível hepático (Sarem et al., 2006). O TGF- β desempenha um papel estimulador na ativação e proliferação das HSC após a lesão inicial. É também anti-apoptótico nesse contexto (Elsharkawy et al., 2005). Esta citocina também é produzida pelas HSC, de onde exerce de forma autócrina seus efeitos fibrogênicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o TGF- β_1 provoca nas células HSC ativadas aumento da síntese das fibras colágenas que se depositam progressivamente no espaço intercelular e no espaço perisinusoidal de Disse, alterando a função e homeostasia do parênquima hepático (Sarem et al., 2006; Winau et al., 2008). Além disso, durante a fibrogênese, os níveis de TGF- β no sangue e tecidos aumentam e a super-expressão de TGF- β_1 em camundongos transgênicos pode induzir fibrose (Gressner et al., 2002).

1.1.2.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio molecular (O_2) é essencial para a sobrevivência celular dos organismos aeróbicos. Durante a fosforilação mitocondrial oxidativa ocorre a produção de metabólitos do oxigênio que incluem: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Esses metabólitos são chamados de espécies reativa de oxigênio (ROS). O desequilíbrio entre os compostos pró-oxidantes e os antioxidantes leva ao dano celular e/ou tecidual que recebe o nome de “estresse oxidativo” (Sies, 1997). A dieta humana contém inúmeros compostos pró-oxidantes e outros antioxidantes. Um componente que pode ser inserido na dieta e considerado antioxidante é a pimenta.

Os componentes pró-oxidantes são gerados como resultado do metabolismo normal intracelular e influenciam em numerosos processos celulares que estão ligados ao envelhecimento e doenças do envelhecimento e também a atividade física extenuante, apoptose, câncer, *diabetes mellitus*, aterosclerose e fibrose hepática. Além disso, substâncias pró-oxidantes também podem ser gerados de forma exógena através do consumo excessivo de álcool, fumo, drogas, exposição aos raios ultravioleta, estilo de vida, uso de quimioterápicos, citocinas pró-inflamatórias, toxinas ambientais, entre outros (Finkel et al., 2000). O excesso de oxidação pode levar a peroxidação lipídica, que é o ataque dessas espécies aos lipídeos da membrana celular gerando inúmeros danos celulares e teciduais (Parola et al., 2008; Sies, 1997; Finkel et al., 2000).

A meia vida das espécies reativas de oxigênio varia bastante, o que explica a necessidade de diferentes mecanismos de defesa antioxidante. As enzimas antioxidantes incluem: catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), e superóxido dismutase (SOD). A catalase e a glutathiona peroxidase são responsáveis por remover o H_2O_2 , bem como outros hidroperóxidos orgânicos. Já a superóxido dismutase age transformando o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . As moléculas pequenas que previnem contra ROS e outros pró-oxidantes incluem ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH) e ácido úrico. O ácido ascórbico é um importante cofator para várias enzimas e também age como um doador de elétrons e como agente redutor. A glutathiona reduzida age como substrato para enzimas removedoras de H_2O_2 . (Parola et al., 2008).

1.1.2.3 A LINHAGEM CELULAR GRX

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

Elas podem expressar o fenótipo de miofibroblastos ativados em resposta ao tratamento *in vitro* com citocinas pró-fibrogênicas ou expressar o fenótipo lipocítico quiescente se forem tratadas com retinol, ácido retinóico ou drogas que modifiquem o metabolismo lipídico como a indometacina (anti-inflamatório não esteroidal não seletivo) (Rang et al., 2008; Souza et al., 2008). No estado quiescente, ocorrem mudanças fenotípicas evidentes, a reorganização do citoesqueleto de actina provoca diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos, também ocorre acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma, além de mudanças como diminuição da atividade secretora de colágeno (Guimarães et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que esta linhagem se comporta muito similarmente as HSC no que diz respeito à captação, armazenamento e liberação de retinóides. Sendo assim, a linhagem celular GRX é considerada um modelo *in vitro* das HSC. A figura 4 exemplifica os estágios de desenvolvimento das células da linhagem GRX, sendo que a linhagem GRX está na fase de miofibroblasto transicional (Guimarães et al., 2006).



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

1.2 JUSTIFICATIVA

Estudos prévios relataram as propriedades terapêuticas antioxidantes, antilipídêmicas e anti-inflamatórias da pimenta. Sabendo que todo o processo de fibrose hepática envolve mediadores como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, constituindo um processo inflamatório, é importante considerar que a pimenta possa ser útil na tentativa de reversão da fibrose.

Além disso, o crescente desenvolvimento de tecnologias para produção de alimentos funcionais e o alto consumo da pimenta CB em nosso meio aumenta o interesse na pesquisa de prováveis agentes terapêuticos para o tratamento de estados de inflamação crônica. A linhagem celular GRX constitui o melhor modelo para estudos de fibrose hepática *in vitro*. Portanto, é importante avaliar a ação antifibrótica do suco total de CB e de suas frações nesta linhagem como possível agente terapêutico.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos antifibróticos do suco total e frações de CB na linhagem celular GRX.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular após tratamento de 5 dias com o suco total de CB em diversas concentrações.
- Avaliar através de microscopia óptica, a alteração fenotípica e presença gordura na linhagem celular GRX após tratamento de 5 dias com o suco total e frações de CB.
- Avaliar a viabilidade celular após tratamento de 5 dias com as seguintes frações de CB: o extrato metanólico da semente e do fruto (EMS e EMF, respectivamente), a fração da semente de CB extraída com diclorometano (ESD), a fração do fruto de CB extraída com diclorometano (EFD), a fração da semente de CB extraída com n-butanol (ESBU), a fração do fruto de CB extraída com n-butanol (EFBU), a fração aquosa da semente de CB (ESAQ) e a fração aquosa do fruto de CB (EFAQ).
- Avaliar a morte nas culturas celulares que tiveram menor crescimento através da liberação de LDH.
- Avaliar a variação no estresse oxidativo nas culturas celulares, através da liberação de TBARS.
- Avaliar a concentração de TGF- β , um marcador fibrogênico, no sobrenadante das culturas celulares.

1.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê Científico da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, protocolado sob o nº 020/09.

CAPÍTULO 2

2.1 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Antifibrotic effects of total juice and fractions of red pepper (*Capsicum baccatum*) in cell line GRX

Submetido ao periódico: Journal of Gastroenterology and Hepatology

Antifibrotic effects of total juice and fractions of red pepper (*Capsicum baccatum*) in cell line GRX

Bárbara de Souza Scherer^{1,2}, Aline Rigon Zimmer³, Vinícius Lorini da Costa¹, Gabriela Viegas da Silva¹, Letícia Paranhos Menna de Oliveira¹, Eduardo Caberlon¹, Patrícia da Silva Scherer¹, Débora Rocha¹, Daniela Livinalli Rodriguez^{1,2}, Denizar Alberto da Silva Melo^{1,5}, Márcio Vinícius Fagundes Donadio^{1,5}, Fernanda Bordignon Nunes¹, Fernanda dos Santos de Oliveira⁴, Carolina Uribe⁴ and Jarbas Rodrigues de Oliveira^{1,2}

¹Faculdade de Biociências e Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

²Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). ³Faculdade de Farmácia e Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

⁴Laboratório de Cultura Celular e Centro de Terapia Celular (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ⁵Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Address correspondence to: Jarbas Rodrigues de Oliveira, Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681. Prédio 12c. Sala 263. Porto Alegre, RS, Brasil. 90619-900.

55 51 3320 3500 x. 4147, fax: 55 51 3320 3612

E-mail address: jarbas@pucrs.br (J.R. de Oliveira)

Abstract

Background/Aim: To evaluate the antifibrotic effects of the red pepper “Dedo-de-Moça” total juice, *Capsicum baccatum* (CB) and fractions of the CB seed and fruit in an in vitro GRX cell culture, a strain of murine hepatic stellate cells, mimicking a model of human liver fibrosis.

Methods: The cells were treated for 5 days with CB total juice and fractions. The MTT assay was done to evaluate the cell viability, the phenotype changes were analyzed with an inverted research microscope (400x) equipped with a digital camera. Furthermore, the cell culture supernatants were collected to quantify the release of lactate dehydrogenase (LDH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and transforming growth factor – β (TGF- β).

Results: No difference between groups was found in the TBARS assay. In the LDH assay, the groups were compared to the cell death control - Tween 5%, which has significantly higher values of LDH, showing that the antiproliferative effect of the CB juice and fractions wasn't mediated by cell death. After the treatment with the CB juice and fractions, cultures were stained with Oil Red O, revealing the presence of fat in the cell cytoplasm in addition to the phenotype changes. Furthermore, the quantification of TGF- β in the supernatant of cultures treated with juice and fractions of CB was decreased when compared to the control.

Conclusion: These results indicate the antifibrotic effects of the red pepper *Capsicum baccatum* and demonstrate its potential therapeutic effect as a possible antifibrotic agent.

Keywords: *Capsicum baccatum*, fibrosis, GRX, inflammation.

INTRODUCTION

Functional foods are those that provide health benefits or have a role in disease prevention. These can prevent, delay or assist in the treatment of diseases such as cancer, cardiovascular disease, osteoporosis, among others. The beneficial components in functional foods are called bioactive components. The bioactive compounds exert their effects in different ways, acting as antioxidants, activating detoxification enzymes in the liver by blocking the activity of bacterial or viral toxins, inhibiting the absorption of cholesterol, reducing platelet aggregation or destroying harmful intestinal bacteria¹. Among these foods, there are the red peppers that are used for a long time in empirical medicine in India, Africa, South America and China for its therapeutic properties².

Red pepper *Capsicum baccatum* (CB) is popularly known in Brazil as pepper “Dedo-de-Moça”. Studies suggest that the therapeutic properties of the peppers are related to capsaicinoids. Capsaicin was shown to be gastroprotective³, antiinflammatory²⁻⁴, antifungal against dermatophytes and anti platelet aggregation^{3,4}. Naidu and Thippeswamy demonstrated the antioxidant ability of capsaicin to inhibit oxidation of low density lipoprotein (LDL) in an effect similar to antioxidants like ascorbic acid (vitamin C) and butylated hydroxyanisole (BHA)⁵.

Fibrosis is a healing response that occurs in almost all patients with chronic liver injury⁶. Although the acute injury also activates mechanisms of fibrogenesis, the signs associated with chronic lesions caused by infections, drugs, metabolic disorders, alcohol abuse, nonalcoholic hepatitis or immune attack are necessary to accumulate fibrosis^{7,8}.

Considering previous studies showing the antioxidant and anti-inflammatory effects of the peppers and its common use in the Brazilian gastronomy, as well as the participation of inflammatory mediators and reactive species of oxygen as a part of the hepatic fibrotic process, the present study aimed at evaluating the antifibrotic effects of the CB total juice and fractions in the GRX cell line. This cell line was chosen based on its well known use as a model for studies of hepatic fibrosis in vitro.

METHODS

Capsicum baccatum juice preparation

The pepper CB fruits were collected in a cultivated area in the city of Turuçu in Rio Grande do Sul. Pepper fruits were macerated with a garlic press, the juice was centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes and the supernatant was filtered through a sterile Millipore filter of 0.45 mM and subsequently in a sterile Millipore filter of 0.22 mM.

CB fractions preparation

The methanolic extracts (of seed and fruit) were obtained by maceration using 70 % methanol as solvent in a 1:10 pepper-solvent proportion, for a period of 7 days at room temperature, away from light and with occasional shaking. Then, the plant material was subjected to successive extractions in a Soxhlet apparatus with increasing polarity (dichloromethane, n-butanol and water) solvents to obtain the fractions. The organic fractions were then dried by solvent evaporation. The remaining plant residue was submitted to decoction to obtain the aqueous fraction, which was lyophilized. Thus, the following were tested in cell cultures: the methanolic extract of the fruit and seed (MEF and MES, respectively), the fraction of the CB seed extracted with dichloromethane (DES), the fraction of the CB fruit extracted with dichloromethane (DEF), the fraction of the CB seed extracted with n-butanol (BES), the fraction of the CB fruit extracted with n-butanol (BEF), the aqueous fraction of the CB seed (AES) and the aqueous fraction of the CB fruit (AEF).

Cell culture

The GRX cells were routinely maintained in culture in Dulbecco medium (DMEM), pH 7.4, supplemented with 5 % fetal bovine serum and 1 % antibiotics under humidified atmosphere containing 5 % CO₂ and 37°C. In order to check the rate of the GRX cell proliferation, a growth curve after 2, 5, 6 and 7 days of initial plating was made. Culture plates of 96 wells were used with a cellular concentration of 500 cells/mL. All wells were incubated with DMEM and the wells used for the

reversion positive control were also incubated with 0.13 mM indomethacin. The culture medium supplemented or not with indomethacin was changed every 2 days.

Colorimetric MTT assay

Quantification of cells was done by testing the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT). The MTT assay assesses cell viability by measuring cellular redox environment. MTT was dissolved in DMEM and added to all wells of the plate. Subsequently the plate was incubated at 37°C in a humidified incubator with 5 % CO₂ for 4 hours. After that, the supernatant containing MTT was removed and added dimethyl sulfoxide (DMSO) to dissolve the blue crystals formed by MTT. After 5 minutes, the plates were read on a reader Hyperion MicroReader, using a wavelength of 540 nm with reference at 650 nm. All experiments were performed in triplicate.

GRX cell growth in CB juice presence

In order to determine the cytotoxicity of the CB juice, a curve of cell viability for 5 days was made. The cells were supplemented with diluted CB juice in the culture medium in the following concentrations: 1:8 (12.5 %), 1:16 (6.25 %), 1:32 (3.12 %), 1:64 (1.56 %), 1:128 (0.78 %), 1:256 (0.39 %), 1:512 (0.19 %), 1:1024 (0.098 %), 1:2048 (0.049 %), 1:4096 (0.024 %), 1:8192 (0.012 %) and 1:16384 (0.006 %). The 0.13 mM indomethacin was used as a positive control of phenotype reversion. The culture medium supplemented or not with the CB juice was changed every 2 days. At the end of the 5th day of treatment, the cell viability was determined by the MTT assay.

Oil Red O Staining

The presence of cytoplasmic fat was assessed by Oil Red O staining, following the methodology proposed by Kinkel⁹. The staining effectiveness was evaluated with an inverted research microscope (400x) equipped with a digital camera. The CB juice and all the fractions were tested.

GRXcell growth in CB fractions presence

The fractions MES, MEF, BES, BEF, AES and AEF were weighed (10.0 mg), dissolved in 1 mL of DMEM 5 %, diluted to concentrations of 1:128 (7.8 mg/mL) and

1:512 (2.0 mg/mL) in DMEM 5 % and filtered through sterile filters of 0.22 μ m before being added to cell cultures. Fractions DES and DEF were processed the same way, except that they were first diluted in ethanol. Culture plates of 96 wells were used with a cellular concentration of 500 cells/mL. In control wells, cells were incubated only with the culture medium, whilst in treated wells cells were incubated with medium and the diluted fraction. The 0.13 μ M indomethacin was used as a positive control of phenotype reversion^{10,11}. Both in control or treatment wells, the culture medium was changed every 2 days. At the end of the 5th day of treatment, MTT assay was performed to determine cell viability.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

The cytotoxicity of the CB juice and fractions was also evaluated by determining the LDH activity in the supernatant of cell cultures of the fractions BES, MES, DES and DEF (7.8 mg/mL), CB juice (0.78 %), indomethacin and control. The LDH activity was measured by a colorimetric assay². For the control of cell lysis 5 % Tween was used¹².

Measurement of lipid peroxidation (TBARS)

Lipid peroxidation resulting from lesions in the cell membrane causes the formation of malondialdehyde and other substances that reacted in the presence of thiobarbituric acid form a pink compound measured spectrophotometrically at 535 nm. TBARS were measured in the supernatant of the cell fractions BES, MES, DES and DEF (7.8 mg/mL), CB juice (0.78 %), indomethacin and control. The reagents used were thiobarbituric acid (TBA) 0.67 %, trichloroacetic acid (TCA) 10 % butyl alcohol¹³.

TGF- β assay

An ELISA kit (R&D Systems) was used to measure the concentration of TGF- β in the supernatant of cell cultures of the fractions BES, MES, DES and DEF (7.8 mg/mL), CB juice (0.78 %), indomethacin and control following the manufacturer's protocol¹⁴.

Statistical analysis

The normality of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test and the results were presented by descriptive statistics as average and standard error of the mean. Differences between means were evaluated by one way analysis of variance - ANOVA and LSD post hoc test was used. The level of significance was $P < 0.05$ and all data analysis were performed using the SPSS (Statistical Package for Social Sciences software) 17.0.

RESULTS

GRX cell growth Curve

The cells in the control group showed an increase in absorbance reading, which is related to the significant growth until the 6th day. There were no differences in the absorbance readings between days 6 and 7 in the control group. In the group treated with indomethacin, the growth rate was significantly lower ($P < 0.05$) than compared to the control group (Figure 1).

GRX cell growth in CB juice presence

Cells treated with the CB juice in the following concentrations 12.5 %, 6.25 %, 3.125 %, 1.563 %, 0.781 %, 0.391 % and indomethacin showed significantly lower proliferation than the control group. In Figure 2 we can also see that cell growth in the presence of 0.391 % concentration of the CB juice and the subsequent dilutions (0.195 %, 0.098 %, 0.049 %, 0.024 %, 0.012 %, 0.006 %) was significantly higher than the cell growth in groups treated with concentrations of 12.5 %, 6.25 %, 3.125 %, 1.563 %, 0.781 % and indomethacin.

Morphological analysis after Oil Red O Staining

After treatment for 5 days with the CB juice (0.781 % and 0.195 %) and all fractions extracted from the CB (MES, MEF, DES, DEF, BES, BEF, AES and AEF) with concentrations 7.8 mg/mL and 2.0 mg/mL, all groups showed phenotypic changes compared to the control. The cells in the control group are smaller, elongated and follow the myofibroblastic pattern. They grow forming cell clusters arranged in layers. In addition, some cells have fat droplets scattered, small and occasional. On the other hand, cells treated with the juice and the CB fractions had their fibroblasts phenotype completely reverted becoming larger cells with a reduced cytoplasm and evident fat droplets that accumulate in it. The cells treated with indomethacin (positive reversion control) showed less fat droplets and phenotypic changes when compared with cells treated with the CB juice and its fractions (Figure 3).

GRX cell growth in CB fractions presence

The group treated with indomethacin and the groups treated with fractions - MES: 7.8 mg/mL; BES: 7.8 mg/mL; DES: 7.8 mg/mL; DEF: 7.8 mg/mL - had significantly lower absorbance than the control group ($P < 0.05$) (Figure 4).

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

The groups treated with the CB juice, CB fractions and indomethacin had LDH release significantly decreased when compared to the group treated with Tween 5 % ($P < 0.05$). (Figure 5).

Lipid peroxidation (TBARS) assay

The results shown in Figure 6 demonstrate that there's no difference in the TBARS levels between the treated groups and the control group.

TGF- β assay

The results presented in Figure 7 show that the groups treated with the CB juice, CB fractions and indomethacin had a significantly lower release of TGF- β ($P < 0.05$) than the control.

DISCUSSION

This study evaluated the effects of the CB juice and fractions extracted from fruits and seeds showing a potential antifibrotic effect in the GRX cell line.

The first experiment to check the GRX cell growth demonstrated that indomethacin significantly inhibits cell growth and also that there wasn't difference in the absorbance readings between 6th and 7th days in the control group, indicating that the cells entered a growth plateau. Borojevic et al. (1990) showed that a significant difference in the GRX cells phenotype was observed after only 5 days of induction of the lipocyte phenotype¹⁵. Based on this, all cell growth experiments in the present study were performed in 5 days. A total CB juice curve (0.006 % to 12.5 %) effect in the cell growth was also evaluated showing that the highest concentrations (0.391 % to 12.5 %) had the lowest absorbance values, indicating fewer cells. This finding could be a prevention of cell proliferation or a cytotoxic action. After that, two concentrations (0.781 % and 0.195 %) with opposite effects in the cell proliferation, decreased number of cells and no alteration compared to the control, respectively, were chosen for the morphological analysis.

Treatment with both CB juice concentrations and the fractions extracted from the CB showed phenotypic changes compared to the control. The cells in the control group are smaller, elongated and follow a typical growth pattern of this line, forming cell clusters arranged in layers¹¹. We demonstrated that some of these cells have small, occasional and spread fat droplets. On the other hand, as described by Borojevic et al. (1990) when evaluating the indomethacin effects, the cells treated with the CB juice and fractions completely reverted the fibroblasts phenotype, becoming larger cells with a rounder nucleus and a reduced cytoplasm with evident fat droplets that accumulate in it. The number and size of the fat droplets increased progressively until they occupied most of the cell volume. We also showed that both the juice, as all of the CB fractions tested, induced lipocyte phenotype changes much more visible and intense than the ones caused by the indomethacin.

It's important to highlight that extraction with methanol releases high levels of capsaicinoids. Unlike water, which is a highly polar solvent that has limited capacity for extracting these compounds. This effect is accentuated when extracting less polar capsaicinoids such as the dihydrocapsaicin, homocapsaicin or

homodihydrocapsaicin, resulting in a much smaller percentage of these capsaicinoids compared to more polar ones as nordihydrocapsaicin or capsaicin. However, the addition of small amounts of water increases the methanol's power of extraction¹⁶. Interestingly, not only the methanol fraction that has a lot of capsaicinoids reversed the phenotype, but also the other fractions, suggesting that the CB has other substances that have an antifibrotic action.

As well as for the CB juice, we also performed a cell proliferation curve in the presence of the CB fractions. The groups treated with the following fractions (DEF, BES, DES and MES - 7.8 mg/mL) presented smaller number of cells compared to the control. To evaluate whether the decrease in proliferation occurred due to cell death or only by growth inhibition, we've measured the activity of LDH in the culture supernatants. LDH is a soluble cytosolic enzyme that is released into the culture medium following a loss of membrane integrity resulting from either apoptosis or necrosis. LDH activity, therefore, can be used as an indicator of cell membrane integrity and serves to assess cytotoxicity resulting from chemical compounds or environmental toxic factors¹⁷. The LDH findings confirmed that the four fractions and the CB juice induced similar effects as the indomethacin, resulting in GRX line decreased growth and proliferation, but not cell death, since no lysis were identified when compared to the Tween 5 % group. We also evaluated the supernatant TBARS levels, an index of lipid peroxidation^{16,17}, and there were no significant differences when compared to the control group. This result shows that the decrease in cell proliferation is not related to oxidative stress. After that, the TGF- β in the supernatant was measured and all groups presented significant lower release compared to the control, confirming the antifibrotic action of the CB fractions and juice.

Hepatic stellate cells (HSC), when activated, contribute to the accumulation of collagen and fibrosis during chronic liver disease. Liver regeneration is dependent on the apoptosis of these cells or their reversion to the lipocyte phenotype⁶⁻⁸. Potential antifibrotic agents include drugs that reduce inflammation, activation of HSC, TGF- β activity, agents with proapoptotic effects on these cells, agents with antioxidant properties and agents that increase the degradation of extracellular matrix (ECM)¹⁸⁻²¹. Studies suggest that the therapeutic properties of the pepper are related to capsaicinoids. Capsaicin was shown to be a potent inhibitor of platelet aggregation^{3,4}, gastroprotective³, anti-inflammatory and antifungal against dermatophytes²⁻⁴. Our

results confirm the anti-inflammatory effects of the red pepper, and also show an antifibrotic effect in the GRX cell line, through the reversion of the cell phenotype.

The enzyme cyclooxygenase (COX) has two isoforms: COX-1 and COX-2. COX-1, which has a constitutional expression and plays a physiological function in the expression of the inducible COX-2, the key enzyme that catalyzes prostaglandins (PG) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) biosynthesis, is upregulated in inflammatory diseases. The highest COX-2 expression levels are found in patients with liver cirrhosis²². Kim et al. (2003) demonstrated that capsaicin markedly inhibits PGE2 release by inhibiting the catalytic activity of the COX-2 enzyme²³. The inhibitory action of capsaicin on PGE2 release appears to mimic the action of indomethacin (used in our study as positive control of phenotype reversion), by inhibiting the COX-2 catalytic activity. Moreover, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the activator protein 1 (AP-1), which have been implicated in inflammatory diseases, were demonstrated to be inhibited by capsaicin²⁴. Indeed, recently, Abdel-Salam et al. (2006) observed the dose-dependent hepatoprotective effect of capsaicin in rats treated with carbon tetrachloride (CCl₄). The daily administration of capsaicin conferred significant protection against the hepatotoxic effect of CCl₄²⁵. Reduced PG production by COX-2 inhibitors is a well-known antifibrotic effect, considering that inflammation is a trigger of fibrosis. Controlling the degree of inflammation can minimize the release of several inflammatory mediators, such as TGF- β , known to be involved in collagen synthesis, accumulation of ECM and perpetuation of liver fibrosis²⁰. Considering our results indicating that the CB pepper has an important anti-inflammatory effect, one possible mechanism would be the inhibition of the COX enzyme, mimicking the non-steroid inflammatory drugs, as indomethacin. This effect reduces inflammation, directly affects the release of fibrogenic mediators such as TGF- β and reverts the fibrotic cell phenotype to a normal healthy one.

Taken together, these results indicate the antifibrotic effects of the CB red pepper and demonstrate its potential therapeutic effect as a possible antifibrotic agent in the treatment of chronic liver injury. Further studies should be done to evaluate and to characterize the possible mechanisms involved in the antifibrotic and anti-inflammatory effects of the CB red pepper.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Cell Therapy Center in Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the kind donation of the murine HSC cell line, GRX.

REFERENCES

- 1 Pennington, JAT. Food Composition Databases for Bioactive Food Components. *J. Food Compos. Anal.* 2002; 15: 419-434.
- 2 Spiller F, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007; 60: 473,478.
- 3 Surh YJ, Lee E, Lee JM. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutat. Res.* 1998; 402: 259-267.
- 4 Surh, YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic compounds. *Mutat. Res.* 1999; 428: 305-327.
- 5 Naidu KA, Thippeswamy NB. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from peppers. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 229: 19-23.
- 6 Friedman, SL. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology.* 2008; 254: 120-129.
- 7 Friedman, SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008; 134: 1655-1669.
- 8 Krizhanovsky, V et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell.* 2008; 134: 657-667.
- 9 Kinkel, AD et al. Oil red-O stains non adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology.* 2004; 46: 49-56.
- 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: 11-21.
- 11 Guimarães, ELM et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int.* 2006; 26: 477-485.
- 12 Standring R, Williams AF. Glycoproteins and antigens of membranes prepared from rat thymocytes after lysis by shearing or with the detergent Tween-40. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* 1978; 508: 85-96.
- 13 Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421–423.
- 14 Carranza, MPA et al. Liver fibrosis secondary to bile duct injury: correlation of Smad7 with TGF- β and extracellular matrix proteins. *BMC Gastroenterol.* 2009; 1-9.
- 15 Borojevic et al. In vitro induction of the fat storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. *In vitro Cell Dev. Biol.* 1990; 25: 361-368.
- 16 Barbero, GF. Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides – Tese (doctorado en ciencia y tecnología química). Universidad de Cádiz, Cádiz, 2007.

- 17 Bonfoco E, Krainc D, Ankarcronat M, Nicoterat P, Lipton AS. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N- methyl- D- aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 7162- 7166.
- 18 Song WY, Ku, KH, Choi, JH. Effect of ethanol extracts from red pepper seeds on antioxidative defense system and oxidative stress in rats fed high-fat high-cholesterol diet. *Nutr Res Pract.* 2010; 4: 11-15.
- 19 Kogure, K. et al. Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1573: 84– 92.
- 20 Gressner, AM et al. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front. Biosci.* 2002; 793-807.
- 21 Souza, IC et al. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2008; 315: 1-7.
- 22 Kim, SM, Park, KC, Kim, HG, Han, SJ. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on liver fibrosis in rats with ligated common bile ducts. *Hepatol. Res.* 2008; 38: 800-809.
- 23 Kim, C.S et al. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell. Signal.* 2003; 15: 299–306.
- 24 Chen, CW, Lee, ST, Wu, WT, Fu, WM, Lin, WW. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 140: 1077–1087.
- 25 Abdel-Salam OME et al. Capsaicin ameliorates hepatic injury caused by carbon tetrachloride in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol.* 2006; 1: 147–156.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. GRX PROLIFERATION CURVE. Proliferation of GRX cells in DMEM containing 5 % fetal bovine serum (diamonds) and supplemented with 0.13 mM indomethacin (triangles). Absorbance on ELISA reader with a wavelength of 540 nm with reference at 650 nm. Means and standard deviations of three independent experiments are shown. The group of cells treated with 0.13 mM indometachin were significantly different (*P < 0.05) when compared with the control.

FIGURE 2. GRX PROLIFERATION IN CB JUICE PRESENCE. Absorbance on ELISA reader with a wavelength of 540 nm with reference at 650 nm. Means and standard errors of three independent experiments are shown. The cells treated with CB juice in the concentrations (12.5 %, 6.25 %, 3.125 %, 1.563 %, 0.781 % and 0.391%) and the cells treated with indomethacin were significantly lower than the control (*P < 0.001 and **P < 0.01). The figure 3 also shows that the absorbance of the groups treated with the concentrations 0.391 %, 0.19 %, 0.098 %, 0.049 %, 0.024 %, 0.012 % and 0.006 % were significantly higher than the absorbance of the cells treated with the others CB juice concentrations and indomethacin (#P < 0.01).

FIGURE 3. GRX CELLS PICTURES AFTER STAIN WITH OIL RED O (400X). Some images are enlarged for better viewing of details. A- control. B- 0.13 mM indomethacin. C- CB juice 0.781 %. D- CB juice 0.195 %. E- AES 7.8 mg/mL. F- AES 2.0 mg/mL. G- AEF 7.8 mg/mL. H- AEF 2.0 mg/mL. I- MES 7.8 mg/mL. J- MES 2.0 mg/mL. L- MEF 7.8 mg/mL. M- MEF 2.0 mg/mL. N- BES 7.8 mg/mL. O- BES 2.0 mg/mL. P- BEF 7.8 mg/mL. Q- BEF 2.0 mg/mL. R- DES 7.8 mg/mL. S- DES 2.0 mg/mL. T- DEF 7.8 mg/mL. U- DEF 2.0 mg/mL. The lipid droplets appear orange/red.

FIGURE 4. GRX PROLIFERATION IN CB FRACTIONS PRESENCE. Absorbance on ELISA reader with a wavelength of 540 nm with reference at 650 nm. Means and standard errors of three independent experiments are shown. The groups treated with indomethacin and the fractions DEF 7.8 mg/mL, BES 7.8 mg/mL, DES 7.8 mg/mL and MES 7.8 mg/mL are significantly smaller (*P < 0.05) when compared with the control.

FIGURE 5. LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) ASSAY. To control for total cell lysis was used Tween 5 %. LDH was measured in the supernatant of the cell fractions BES, MES, DES and DEF (7.8 mg/mL), CB juice (0.781 %), indomethacin and control. All the groups had LDH release significantly less than the group treated with Tween 5 % (*P < 0.05).

FIGURE 6. LIPID PEROXIDATION (TBARS) ASSAY. TBARS were measured in the supernatant of the cell fractions BES, MES, DES and DEF (7.8 mg/mL), CB juice (0.781 %), indomethacin and control. There isn't difference between the control and the groups tested.

FIGURE 7. TGF-B ASSAY. TGF-B was measured in the supernatant of the cell fractions BES, MES, DES and DEF (7.8 mg/mL), CB juice (0.781 %), indomethacin and control. All the treated groups were significantly lower than the control (*P < 0.05).

FIGURE 1

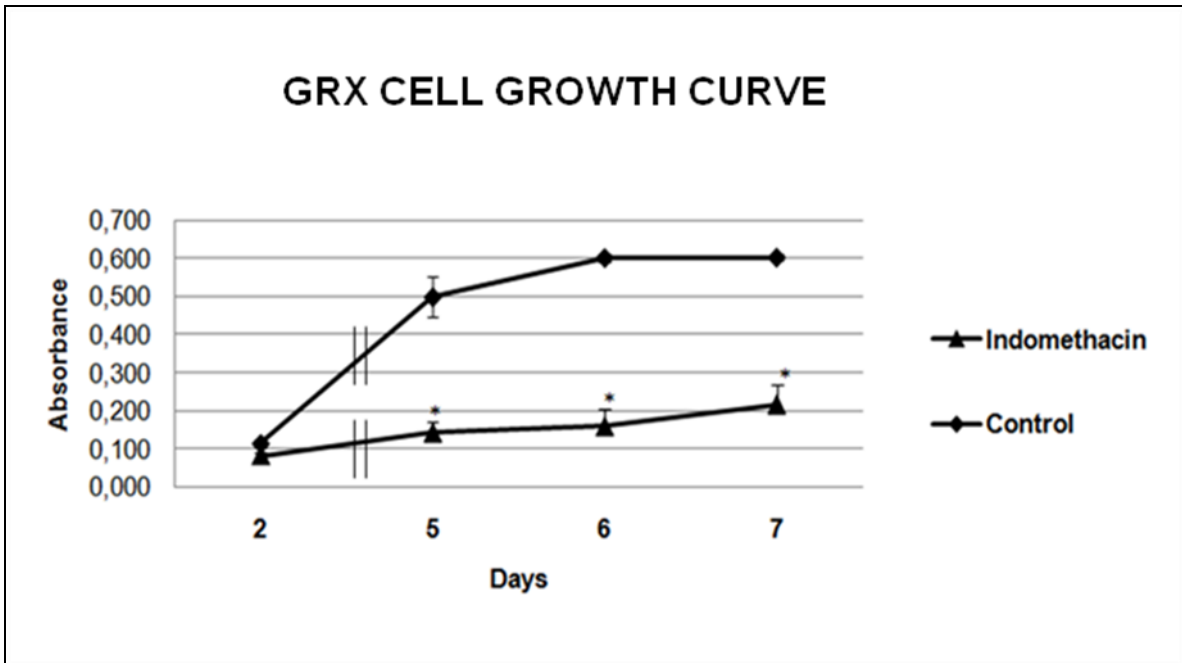


FIGURE 2

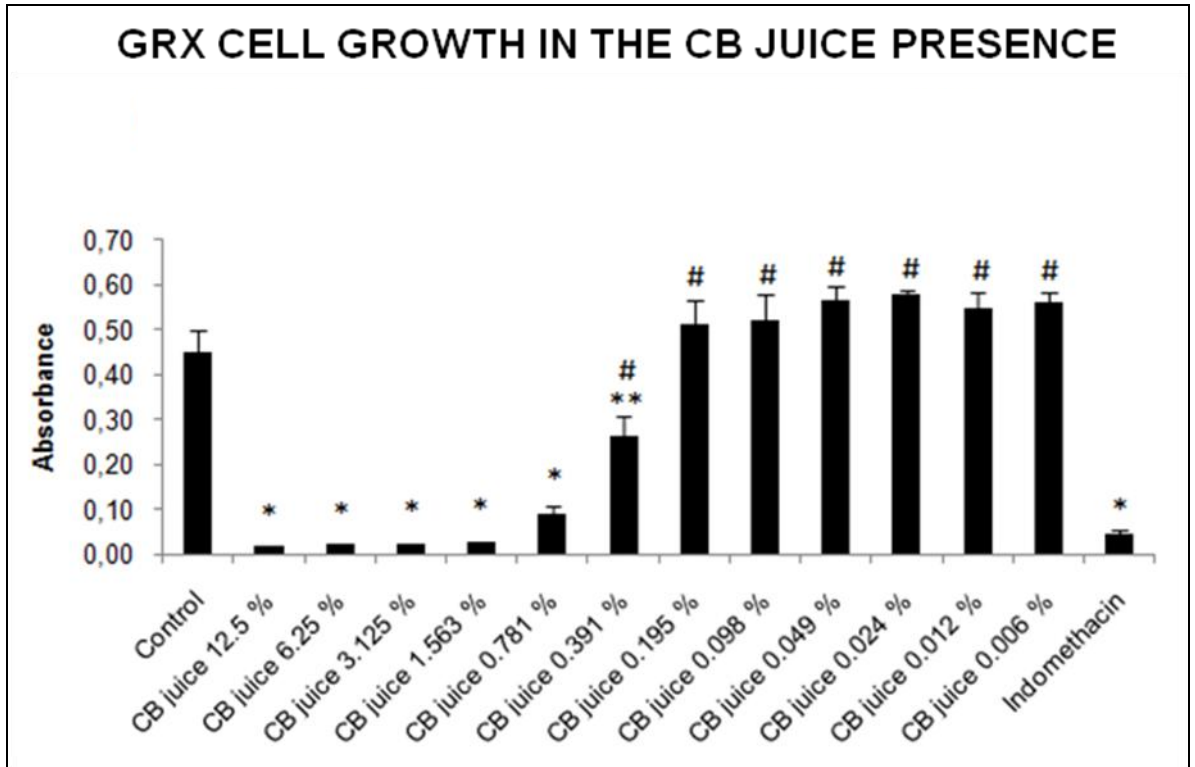


FIGURE 3

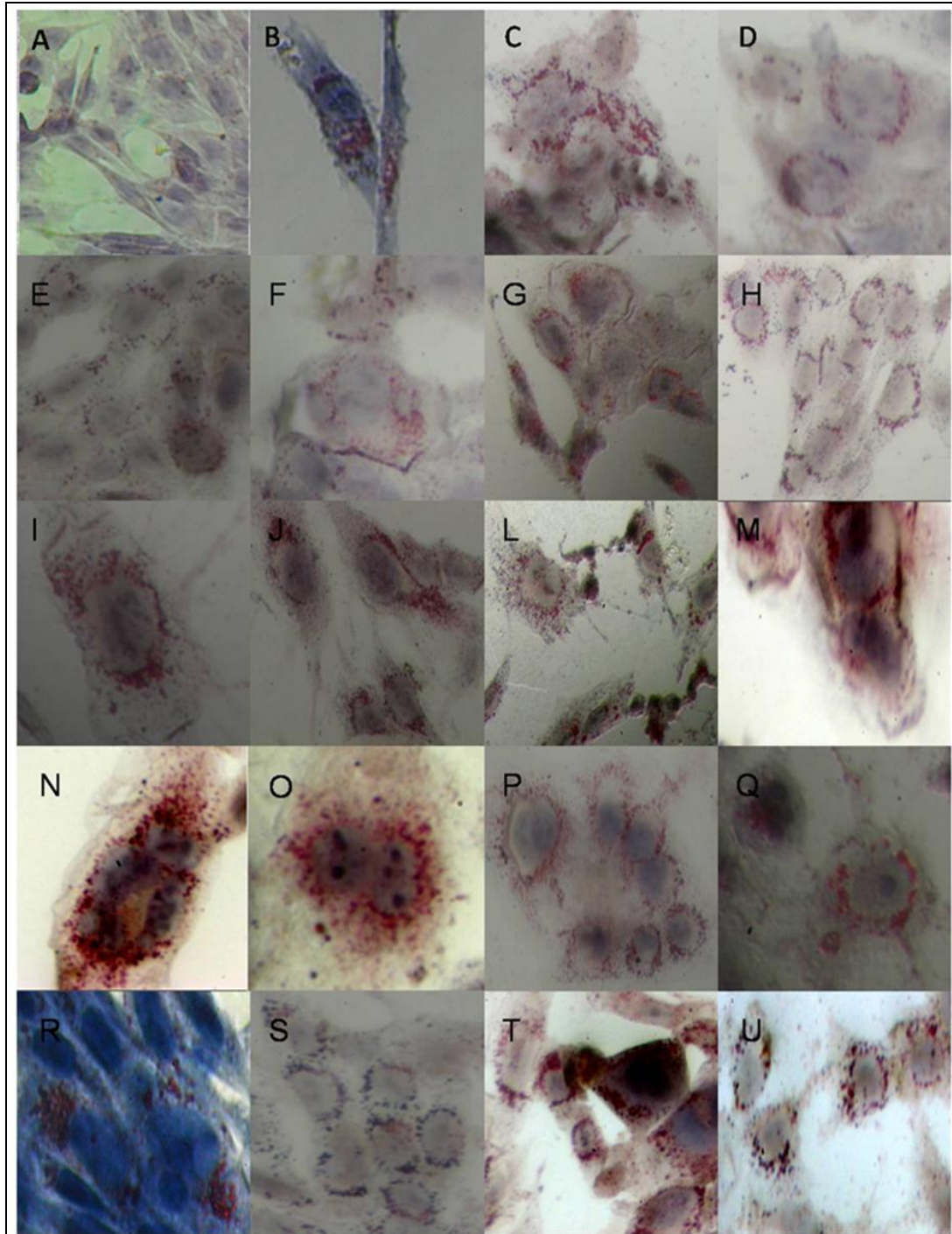


FIGURE 4

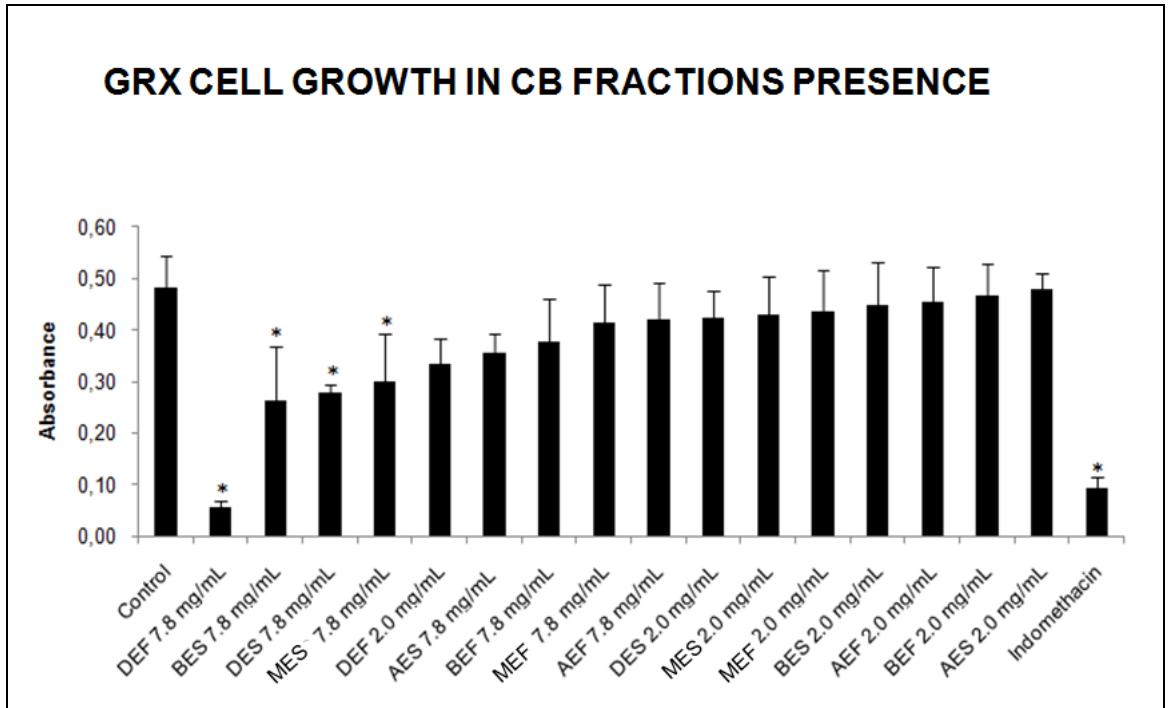


FIGURE 5

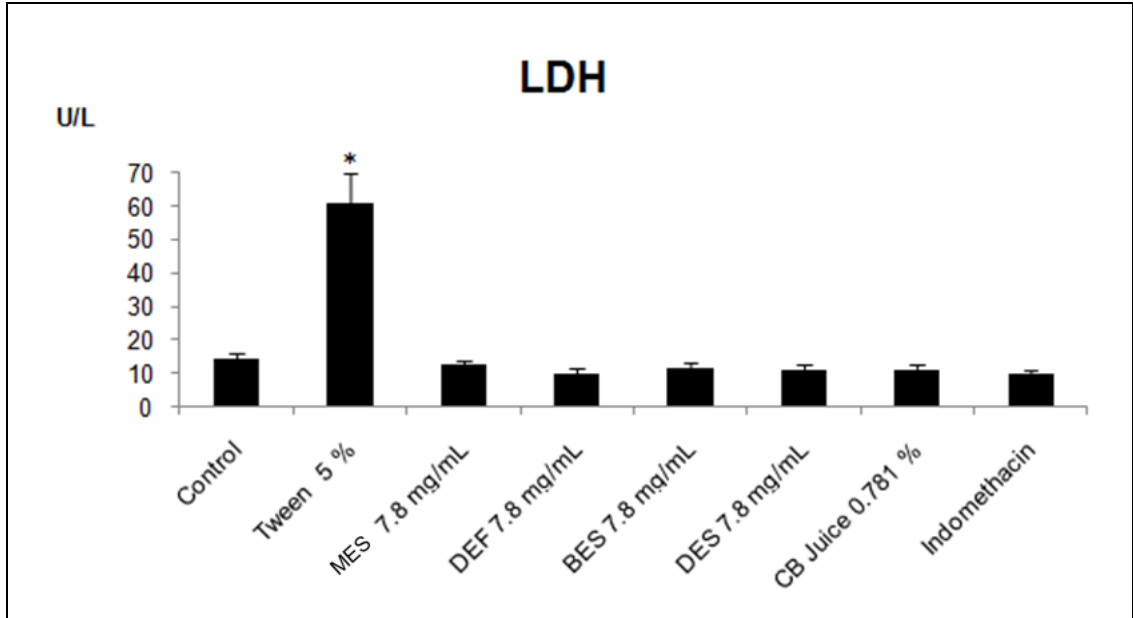


FIGURE 6

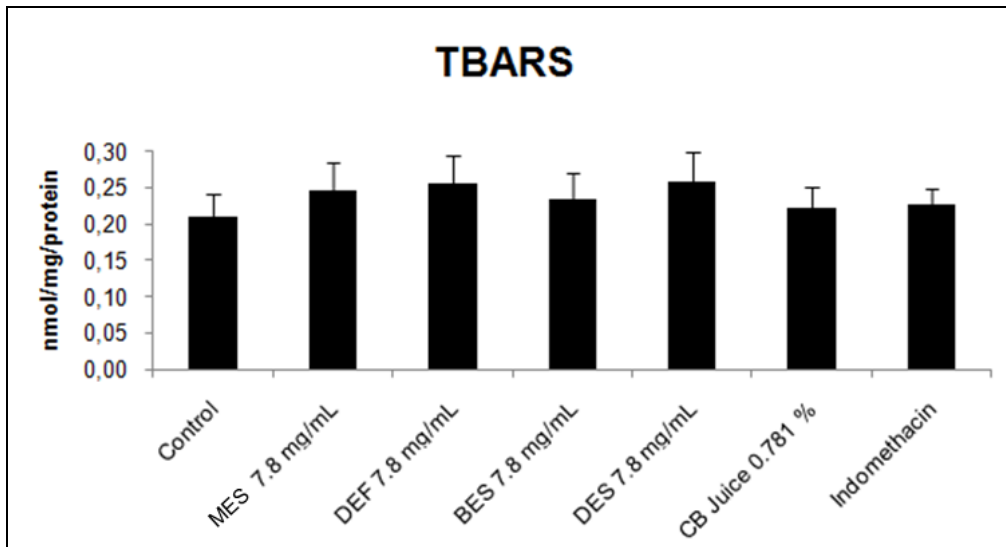
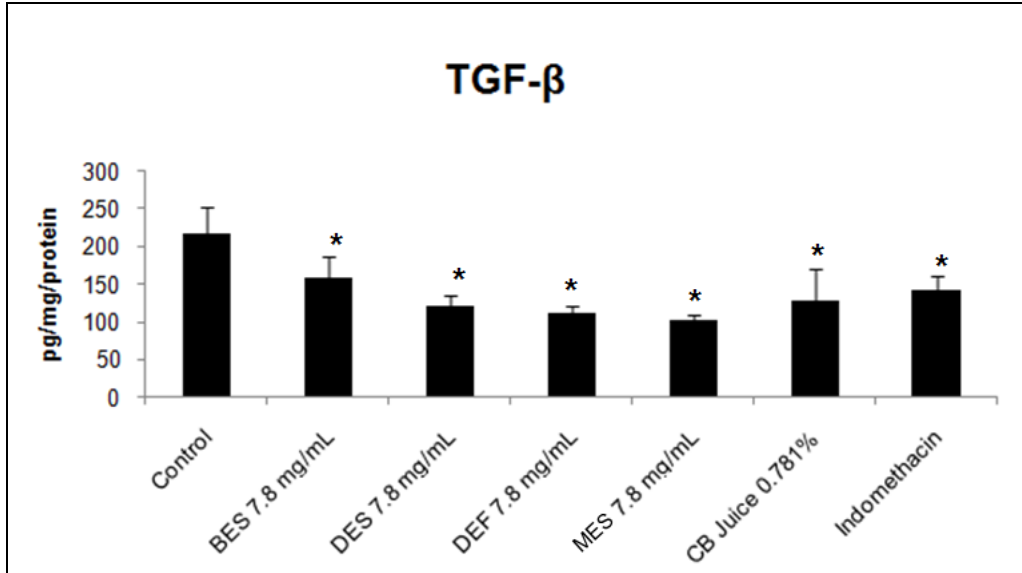


FIGURE 7



CAPÍTULO 3

3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas das drogas utilizadas atualmente foram descobertas a partir da ação conhecida de certas plantas e, posteriormente identificadas, extraídas e sintetizadas. Atualmente os compostos extraídos de plantas continuam a representar uma diversidade química única, a qual continua sendo uma importante fonte de investigação de novos agentes terapêuticos.

Os componentes bioativos incluem uma variada gama de compostos químicos com estruturas variadas como os carotenóides, flavonóides, esteróis de plantas, ácidos graxos ômega-3, compostos fenólicos, entre outros. Dentre esses alimentos, inclui-se a pimenta vermelha que é usada há muito tempo na medicina empírica na Índia, África, América do Sul e China por suas propriedades terapêuticas. O crescente interesse em alimentação saudável, aliado ao alto consumo de pimenta *Capsicum baccatum* em nossa região sustentam a importância deste trabalho.

Nosso estudo confirmou a atividade anti-inflamatória e antifibrótica das frações e do suco total de *Capsicum baccatum* em um modelo *in vitro* de fibrose hepática, mimetizando a ação dos anti-inflamatórios não esteroidais, como a indometacina. Cabe salientar que mais estudos deveriam ser feitos na tentativa de desvendar qual ou quais os componentes responsáveis por estas ações, quais as frações mais ativas e determinar de maneira mais clara o verdadeiro mecanismo de ação dos compostos ativos presentes nessa pimenta, o que permitiria uma indicação clínica correta.

CAPÍTULO 4

4.1 REFERÊNCIAS

Bissell, D.M. Chronic liver injury, TGF- β , and cancer. **Experimental and Molecular Medicine**. v. 33, p. 179-190, 2001.

Brenner, D.A, Bataller, R. Liver fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 115, p. 209-218, 2005.

Elsharkawy, A.M. et al. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. **Apoptosis**. v. 10, p. 927-939, 2005.

EMBRAPA Hortaliças. Sistemas de Produção. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html>. Acesso em: 20 de janeiro de 2009.

Farrell, G.C; Larter C.Z. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Steatosis to Cirrhosis. **Hepatology**. v. 43, n^o. 2, Suppl. 1, p. 99-111, 2006.

Finkel T.; Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p.239-247, 2000.

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

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

Friedman, S.L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n.4, p.2247-2250, 2000.

Goodwin, D. C; Hertwig, K. M. Peroxidase-catalyzed oxidation of capsaicinoids: steady-state and transient-state kinetic studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 417, n. 1, p. 18-26, 2003.

Gressner, A.M. et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Frontiers in Bioscience**. v. 7, p. 793-807, 2002.

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

lida, V. H. et al. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados as suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41, n.1, p. 29-36, 2005.

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

Joly, A.B. Botânica: **Introdução à taxonomia vegetal**. 12^a edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

- Jung, M.Y., Kang, H.J., Moon, Aree. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. **Cancer Letters**. v. 165, p. 139-145, 2001.
- Kempaiah, R. K; Srinivasan K. Integrity of erythrocytes of hypercholesterolemic rats during spices treatment. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 236, p.155-161, 2002.
- Kerdilès, M.C.L.B. et al. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. **Eur. Cytokine Netw.** v. 19, n.2, p.69-80, 2008.
- Krizhanovsky, V. et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. **Cell**. v.134, n. 4, p.657-667, 2008.
- Kwon, M. J. et al. Red pepper attenuates cholesteryl ester transfer protein activity and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Clinica Chimica Acta**. v. 332, n.1-2, p. 37-44, 2003.
- Linguanotto Neto N. **Dicionário gastronômico: pimentas com suas receitas**. São Paulo: Boccato editores, 2004.
- Naidu, K. A; Thippeswamy, N. B. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 229, p.19-23, 2002.
- Ogorzaly, M. C; Simpson, B. B. **Exconomic botany: plants in our world**. 2a edição, New York, 1995.
- Parola, M; Novo, E. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. **Fibrogenesis and Tissue Repair**. v.1, p.1-58, 2008.
- Pennington, J. A. T. Food Composition Databases for Bioactive Food Components. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 15, n. 4, p. 419-434, 2002.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2008. *Farmacologia*, 6th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Reifschneider FJB (organizador). *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: **Embrapa comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa hortaliças**, 2000.
- Sarem, M. et al. Lãs células estrelladas del hígado: su importancia em condiciones normales y patológicas. **Gastroenterología y hepatología**, 2006.
- Senoo, H. Structure and function of hepatic stellate cells. **Medical Electron Microscopy**. v. 37, n.1, p.3-15, 2004.
- Sies, H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. v.82, p.291-295, 1997.
- Souza, I. C. et al. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 315. p. 1-7, 2008.

Spiller, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 60, p. 473,478, 2007.

Surh, Y. J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, n. 8, p. 1047-1228, 2002.

Surh, Y. J. Molecular mechanisms of chemiopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic compounds. **Mutation Research**. v. 428, p. 305-327, 1999.

Surh, Y. J. More Than Spice: Capsaicin in Hot Chili Peppers Makes Tumor Cells Commit Suicide. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 94, 2002.

Surh, Y. J; Lee, E. e Lee, J. M. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. **Mutation Research**. v. 402, nos.1-2, p. 259-267, 1998.

Takashi K; Akiko I e Toshihiro Y. Effect of red pepper *Capsicum annum* var. conoides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. **Food and Chemical Toxicology**. v. 42, p. 1695-1700, 2004.

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

Wagner, C. M. Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annum* L. – Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

Wei, Y. et al. Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction Contributes to Angiotensin II-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Transgenic Ren2 Rats. **The American Journal of Pathology**. v.174, n.4, p.1329-1337, 2009.

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

Wu, C.C et al. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 601, p. 71-82, 2006.

ANEXO A

DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Gastroenterology and Hepatology*.

Manuscript ID: JGH-00374-2010

Title: Antifibrotic effects of total juice and fractions of red pepper (*Capsicum baccatum*) in cell line GRX.

Authors: Scherer, Bárbara; Zimmer, Aline; da Costa, Vinícius; da Silva, Gabriela; Oliveira, Letícia de; Caberlon, Eduardo; Scherer, Patrícia; Rocha, Débora; Rodriguez, Daniela; Melo, Denizar; Donadio, Márcio; Nunes, Fernanda; de Oliveira, Fernanda; Uribe, Carolina and de Oliveira, Jarbas.

Date submitted: 29-Mar-2010.