

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIANA FABIANI MIRANDA

**ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR DA
AÇÃO DO FÁRMACO TRICLOSAN NA
REVERSÃO DO PROCESSO FIBROSANTE
EM CÉLULAS HEPÁTICAS LX-2.**



Rio Claro
2016

JULIANA FABIANI MIRANDA

ANÁLISE CELULAR E MOLECULAR DA AÇÃO DO FÁRMACO TRICLOSAN
NA REVERSÃO DO PROCESSO FIBROSANTE EM CÉLULAS HEPÁTICAS
LX-2.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karen Cristiane Martinez de Moraes

Co-orientadora: Msc. Brenda Oliveira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de
Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2016

574.88 Miranda, Juliana Fabiani
M672a Análise celular e molecular da ação do fármaco triclosan
na reversão do processo fibrosante em células hepáticas LX-2
/ Juliana Fabiani Miranda. - Rio Claro, 2016
52 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes
Coorientadora: Brenda Oliveira da Silva

1. Biologia molecular. 2. Fibrose hepática. 3. LX-2. 4.
FASN. 5. Metabolismo de lipídeo. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais Osmar e Suely pelo imenso apoio durante toda essa jornada e por sempre me inspirarem a ser uma pessoa melhor.

À professora e orientadora Dr^a Karen Cristiane Martinez de Moraes pela oportunidade de aprendizado, pelos conselhos sinceros e a pela confiança depositada no desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores e colegas do laboratório de Biologia Molecular por todo auxílio, em especial, à minha co-orientadora Msc Brenda Oliveira da Silva por todo conhecimento compartilhado e pelo bom-humor deixando o trabalho sempre mais divertido, e à Letícia Rocha Gonçalves, pelo auxílio incondicional no desenvolvimento deste trabalho assim como pela amizade e conselhos que me fizeram crescer tanto neste ano. À professora Dr^a Márcia Cristina Brochetto Braga e à Letícia Ferreira Ramos pelas colaborações fundamentais neste trabalho.

Ao meu amigo e parceiro Justus por todo amor e apoio nos momentos mais difíceis e comemorações nos momentos não tão difíceis.

Aos meus amigos Ian, Gabi, Nahanna, Lúcia, Michele, Ana, Helo, Ari, Carlos, Jesus, Bruno, e todos do CBN 2011 pela companhia, conversas e ensinamentos, os quais vou sempre levar comigo.

À FAPESP e PIBIC pelos financiamentos que possibilitaram esta pesquisa.

E finalmente, a todas tantas outras pessoas maravilhosas, professores, colegas e funcionários, que tive a oportunidade de compartilhar alguns momentos dessa jornada e que tiveram grande influência no meu crescimento tanto no acadêmico quanto pessoal.

“There is nothing like looking, if you want to find something.

*You certainly usually find something, if you look,
but it is not always quite the something you were after.”*

(J.R.R. Tolkien - The Hobbit)

RESUMO

A fibrose hepática é uma condição clínica presente em todas as doenças hepáticas, caracterizada pelo aumento na síntese dos componentes da matriz extracelular na tentativa de cicatrização do tecido lesionado. A principal célula responsável pelo desenvolvimento da fibrose hepática é a célula estrelada hepática, localizada no espaço de Disse. Esta apresenta dois fenótipos: o quiescente e o ativado. O metabolismo de lipídeo na célula estrelada está relacionado com o fornecimento de energia para a iniciação e perpetuação do seu estado ativado. Dentro desse contexto a enzima ácido graxo sintase (FASN), proteína chave da síntese de ácido graxo *de novo* torna-se o alvo do estudo, uma vez que o metabolismo de lipídeo está intimamente relacionado ao processo fibrosante em células estreladas hepáticas. Sabe-se que o fármaco triclosan (TCS) é inibidor da proteína FASN na síntese de ácido graxo *de novo*, com potencial alteração do processo fibrosante em células hepáticas estreladas. Sendo assim, avaliamos os aspectos celulares e moleculares do efeito do fármaco TCS na modulação do metabolismo de lipídeo através da inibição da FASN em modelo de células estreladas hepáticas (LX-2). Os resultados demonstraram que o TCS na concentração 50 μ M em cultura celular LX-2 crescidas em 10% de soro bovino fetal (estado ativado) promove alterações morfofuncionais nas células, tanto aumentando a quantidade de gotículas de lipídeos nas células; quanto pela despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto, e a formação de estruturas globulares de actina no citoesqueleto celular. As células tratadas com TCS 50 μ M também apresentaram alterações morfológicas no núcleo. Dessa maneira, o TCS apresentou características possivelmente citotóxicas. Por outro lado, o estudo da inibição da proteína FASN demonstrou resultados que sugerem uma transdiferenciação celular correlacionada com a reversão do quadro pró-fibrosante hepático em células LX-2, requerindo maiores investigações da sua modulação na patogenia investigada.

Palavras-chave: Fibrose hepática; LX-2; FASN; triclosan; metabolismo de lipídeo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Doenças hepáticas: visão geral.....	6
1.2 Fibrose hepática e a célula estrelada hepática.....	7
1.3 Ácido graxo e o metabolismo de lipídeos.....	11
1.4 Ácido graxo sintase (FASN) e a síntese de ácido graxo <i>de novo</i>	13
1.5 Fármaco inibidor de FASN – triclosan – e a fibrose hepática.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Cultura e tratamento celular.....	18
3.2 Preparação da solução de Triclosan (TCS)	18
3.3 Teste de viabilidade celular (MTT) em LX-2.....	19
3.4 Análises de expressão de genes.....	20
3.4.1 Extração de RNA total.....	20
3.4.2 Transcrição reversa.....	21
3.4.3 Reações de PCR.....	21
3.5 Análises celulares de microscopia.....	24
3.5.1 Análises de microscopia de luz: avaliação das gotículas de lipídeos.....	24
3.5.2 Análises de microscopia de fluorescência: investigação dos filamentos de actina.....	25
3.6 Análises estatísticas.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
4.1 Cultura de células e ensaios de viabilidade celular.....	26
4.2 Análises de expressão gênica: PCR semi-quantitativo e PCR em tempo real.....	28
4.3 Análises morfofuncionais: microscopia de luz e fluorescência.....	39
4.3.1 Microscopia de luz.....	39
4.3.2 Microscopia de fluorescência.....	41
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças hepáticas: visão geral

O fígado atua em diversos papéis fundamentais na manutenção da homeostase do organismo, como a gliconeogênese, a síntese de proteínas, a metabolização de substâncias tóxicas, dentre outras. Neste contexto, o tecido hepático se organiza em grupo de células parenquimatosas (hepatócitos), que estão organizadas em lóbulos hepáticos e constituem a parte metabolizadora; e não parenquimatosas (célula kupffer, células endoteliais sinusoidais, células estreladas hepáticas). Estas células desempenham diferentes funções que auxiliam no funcionamento adequado do fígado (SENOO et al., 2010).

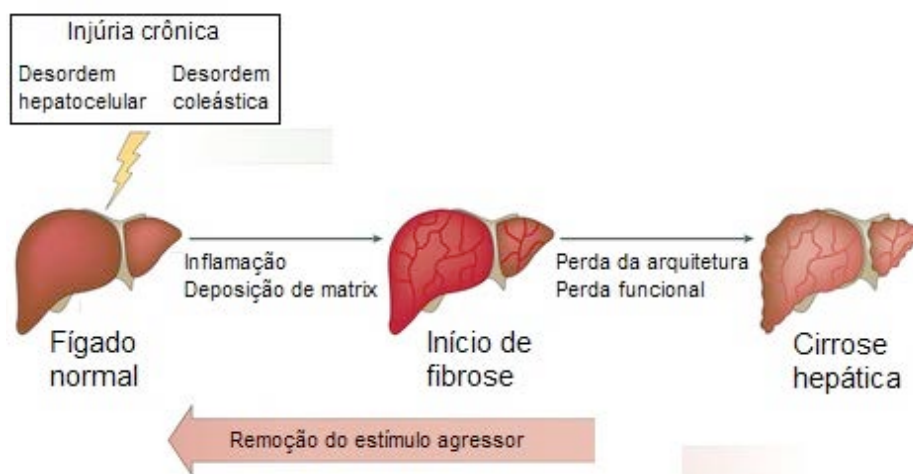
As doenças hepáticas são classificadas como hepatocelular ou coleástica (obstrutivas) e podem ser desencadeadas por diferentes agentes etiológicos. As doenças hepatocelulares são desencadeadas pelo dano em células do tecido hepático, podendo promover a inflamação e a necrose. Dentre elas, podemos citar as hepatites virais (hepatite A, B e C) e a doença hepática alcoólica (ANDRADE, 2005; BECKER, 2013). Estima-se que um terço da população mundial está infectada pelo vírus da hepatite B (BECKER, 2013) e aproximadamente 10% de toda morbidade e mortalidade no Brasil, nos últimos anos, esteja relacionada à doença hepática alcoólica (BECKER, 2013; ROCHA, PEREIRA, 2007). Dentre as doenças coleásticas podemos citar a colecistite, ocorrendo em mais de 10% da população ocidental, e a doença de caroli, uma doença congênita rara, mas que pode apresentar alta gravidade à vida do paciente através da dilatação e formação de cistos nos dutos biliares presentes no interior do fígado (BECKER, 2013; MAYA et al., 2009).

Nos últimos anos, mesmo frente aos avanços da medicina, as doenças hepáticas ainda são consideradas um grave problema de saúde pública devido a poucos tratamentos eficazes. As doenças hepáticas têm causa multifatorial, não havendo ainda uma droga eficaz para as suas diferentes etiologias (ANDRADE, 2005). Estima-se que aproximadamente

80% a 90% do parênquima hepático devem estar modificados para configurar a existência de uma doença hepática, levando o paciente a iniciar o tratamento quando esta se encontra em estado avançado (BECKER, 2013).

Infelizmente, tratamentos convencionais através de terapias antiinflamatórias, imunossupressivas e antivirais não são satisfatórios na erradicação das diferentes doenças hepáticas, havendo a necessidade do desenvolvimento de tratamentos suplementares (FRIEDMAN, 2000; GUO et al., 2009). Embora o fígado apresente grande capacidade regenerativa após a retirada do estímulo agressor e a utilização de alguns tratamentos, a exposição crônica ao agente causador da lesão pode ocasionar a perda da arquitetura do parênquima hepático. A ação constante do agressor pode progredir a doença ao estágio terminal de funcionalidade do fígado conhecido como cirrose, o qual torna o processo de reversão praticamente impossível (Figura 1) (CZAJA, 2014).

Figura 1: Progressão do comprometimento hepático desencadeada por injúrias crônicas no fígado.



Fonte: adaptado de PELLICORO et al., 2014

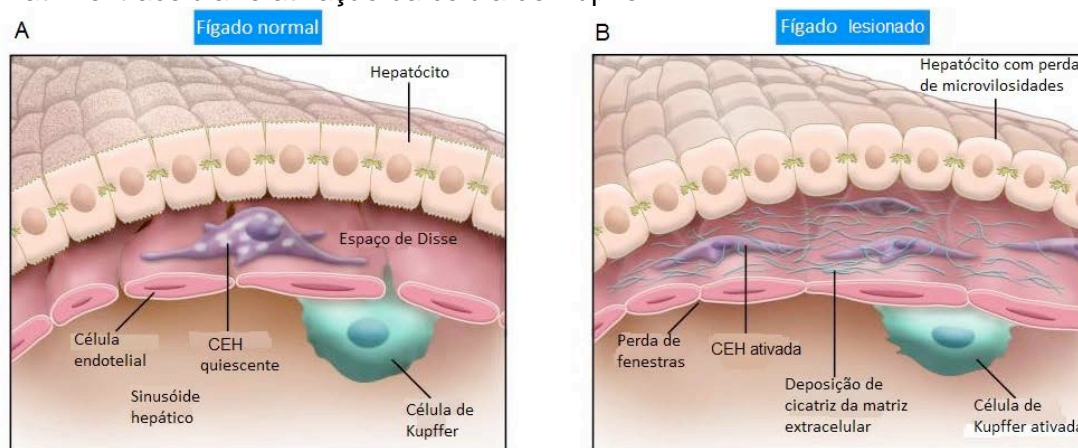
1.2 Fibrose hepática e a célula estrelada hepática

A fibrose hepática é uma condição clínica presente em qualquer lesão que acometa o fígado, caracterizada pelo aumento da síntese dos componentes da matriz extracelular na tentativa de cicatrização e reparo do tecido hepático lesionado (ANDRADE, 2005; BECKER, 2013; GUO et al., 2009; SHI et al., 2007). A fibrose hepática é um evento complexo, com a

participação de células e substâncias heterogêneas, e inicia-se pela ação parácrina de células parenquimais e células inflamatórias através de estímulos pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos. Embora uma variedade de células faça parte desse processo, a célula estrelada hepática (CEH) é a principal responsável (MALLAT, et al., 2014; SENOO et al., 2010).

A CEH foi descrita por Kupffer no século XIX e se localiza no espaço de Disse do parênquima hepático, entre capilares sinusoidais e a superfície basolateral dos hepatócitos. Compreende aproximadamente um terço da população de células não parenquimais e 15% do número total de células no fígado normal (FRIEDMAN, 2008). No estado normal as CEH encontram-se no fenótipo quiescente, caracterizado pelo corpo celular em forma de estrela e apresenta em seu citoplasma inúmeras gotículas de lipídeos contendo retinóide (IREDALE, 2007). A presença de qualquer injúria no fígado acarreta a mudança do fenótipo da CEH de quiescente para ativado, a qual é caracterizada pela perda das gotículas de lipídeos no citoplasma, pela mudança morfológica e pelo aumento na síntese dos componentes da matriz extracelular (Figura 2) (FRIEDMAN, 2008; IREDALE, 2007).

Figura 2: Representação ilustrativa de um fígado normal (A), e um fígado lesionado (B). (A) Células do tecido hepático com fenótipo normal. (B) Há perda de microvilosidades do hepatócito, perda de fenestras das células endoteliais, perda de lipídeos e alteração morfológica da célula estrelada hepática – CEH-, deposição de matriz extracelular e ativação da célula de Kupffer.

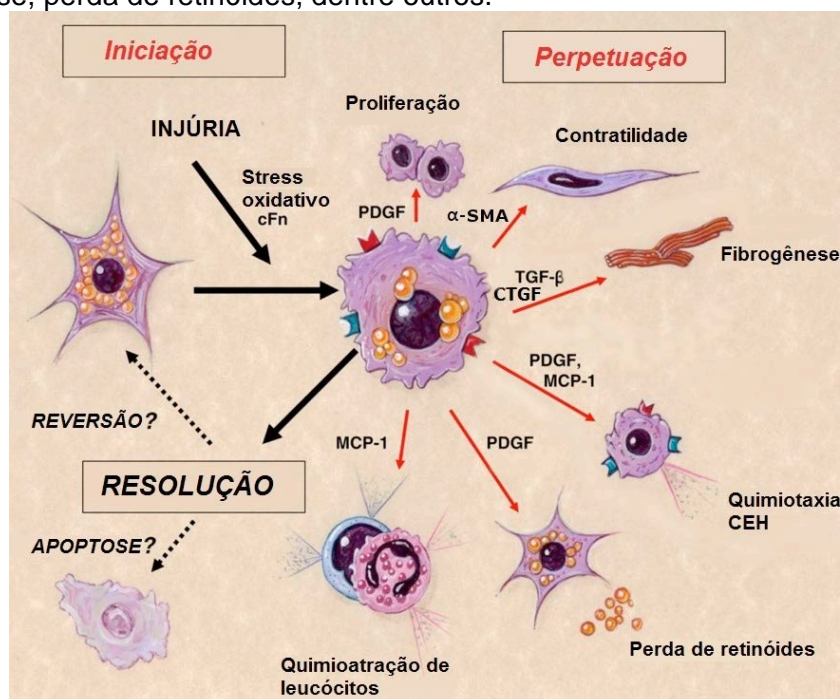


Fonte: adaptado de IREDALE, 2007

A mudança fenotípica da CEH é induzida pela ação de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos produzidos por células inflamatórias

(linfócitos, hepatócitos, células de Kupffer, célula endotelial sinusoidal) (ANDRADE, 2005). Os mediadores que se destacam no processo de iniciação e perpetuação da fibrogênese são: o fator de crescimento transformador ($TGF-\beta$), como principal fator indutor da fibrogênese; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), importante mitógeno celular; proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) promove quimioatração de leucócitos e regula crescimento e acumulação de macrófagos; fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), fator indutor da fibrogênese; proteína alfa actina de músculo liso (α SMA), conferindo aumento da contratilidade celular (Figura 3) (FRIEDMAN, 2008; REYNAERT et al. 2002; ROCKEY, 2001).

Figura 3: Exemplo de alguns mediados na iniciação e perpetuação do processo fibrosante na CEH ativada, resultando no aumento da proliferação, contratilidade, fibrogênese, perda de retinóides, dentre outros.



Fonte: adaptado de FRIEDMAN, 2008

Em adição, a viabilização das diversas mudanças celulares nas CEHs ocasionadas pelo processo fibrosante incluem: proliferação celular, contratilidade aumentada, aumento na produção dos elementos de matriz (colágenos, elastina, proteoglicanos), expressão de citocinas fibrogenênicas e inflamatórias; é necessária uma grande disponibilidade de energia

(ANDRADE, 2005; GUO et al., 2009; SHI et al., 2007). Especula-se que a energia necessária para promover essas mudanças seja proveniente da liberação do conteúdo das gotículas de lipídeo através da autofagia, resposta de proteção às injúrias do fígado na tentativa de manter a homeostase celular (MALLAT et al., 2014).

Sendo assim, o metabolismo de lipídeo está intimamente ligado à ativação da CEH durante o processo fibrosante. Dentre os fatores de transcrição e genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, destacam-se: enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LRAT), responsável pela esterificação do retinol; malonil-CoA decarboxilase (MLYCD), responsável pela conversão da malonil-CoA em acetil-CoA e dióxido de carbono; receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ), receptor nuclear regulador do metabolismo de lipídeo; ácido graxo sintase (FASN), complexo enzimático responsável pela síntese de ácido graxo; e proteína de ligação do elemento de regulação do estero1 1c (SREBP1c), fator de transcrição ativador da FASN; acetil-CoA carboxilase (ACACA), enzima catalisadora dos intermediários da síntese de ácido graxo (CHENG, et al., 2014; FRIEDMAN, 2008; KLUWE, et al., 2011; LIU et al., 2010).

Visando a melhor caracterização do processo da fibrose hepática e o desenvolvimento de novos tratamentos, torna-se importante a utilização de um modelo celular da principal célula responsável à fibrose hepática, a CEH. Xu e colaboradores (2005) estabeleceram uma linhagem celular de CEH denominada LX-2, desenvolvida a partir de células estreladas hepáticas de fígado humano normal, e imortalizadas espontaneamente sob o cultivo em baixas condições de soro. A linhagem celular LX-2 se caracteriza pela capacidade de se transdiferenciar em cultura do fenótipo quiescente para o ativado dependendo da concentração de soro bovino fetal (SBF) em que é cultivada. Em baixas concentrações de SBF ela expressa o fenótipo quiescente (não fibrosante) e sob concentrações mais elevadas de soro, o fenótipo ativado (pró fibrosante) (XU et al., 2005).

1.3 Ácido graxo e o metabolismo de lipídeos

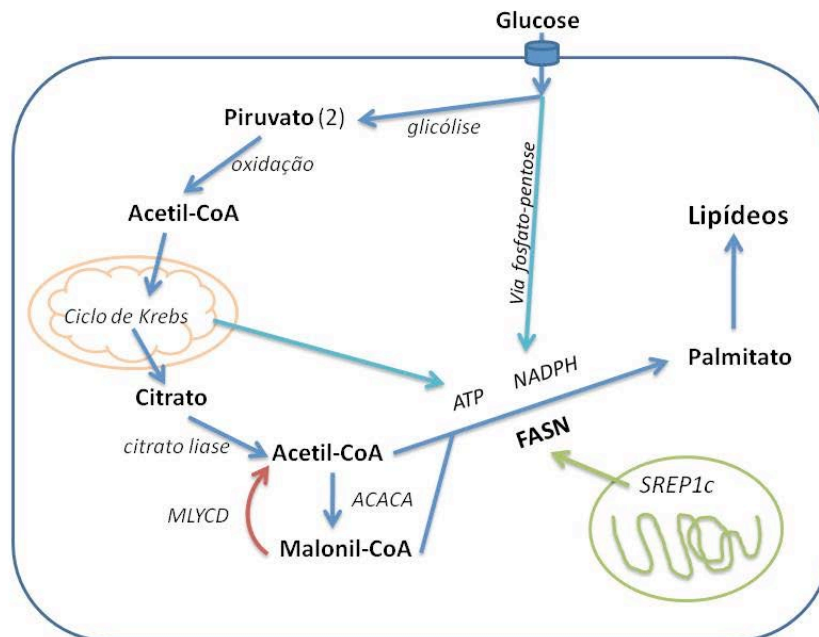
Durante o processo fibrosante a CEH utiliza a energia proveniente das gotículas de lipídeos. Os lipídeos são constituídos por ácidos graxos, os quais podem existir de forma livre ou compor os lipídeos mais complexos, como o triacilglicerol, fosfolipídeo e colesterol. Os lipídeos são essenciais na construção da membrana celular, na composição de mensageiros secundários intra e extracelular, produção e armazenamento de energia, âncoras para proteínas de membrana, entre outras funções (LEHNINGER, 2006). Em mamíferos, existem duas vias de obtenção de ácido graxo: através da alimentação, onde as células irão usar os ácidos graxos livres na circulação; e através da síntese de ácido graxo *de novo*, realizada no fígado, tecido adiposo, mama em lactação, endométrio, e em tecidos com alguma alteração metabólica (LIU et al., 2010).

Antes das reações de montagem do ácido graxo, sucede-se a formação dos intermediários da sua biossíntese (Figura 4). Inicialmente, a glucose excedente na circulação entra na célula e sofre glicólise, resultando em duas moléculas de piruvato. Este, através do processo de oxidação irá originar uma molécula de acetil-CoA, a qual através do ciclo de Krebs na mitocôndria dará origem ao citrato. Ao alcançar o citossol o citrato é convertido em acetil-CoA pela enzima citrato liase. Finalmente, a síntese de malonil-CoA a partir da carboxilação de acetil-CoA é catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACACA). No processo reverso do metabolismo de lipídeo, a malonil-CoA decarboxilase (MLYCD) é responsável por catalisar a desagregação da malonil-CoA em acetil-CoA e dióxido de carbono (LEHNINGER, 2006).

Em seguida, inicia-se a síntese de ácido graxo *de novo* a partir da ativação do complexo enzimático ácido graxo sintase (FASN) pela proteína de ligação (SREBP1c). A síntese segue pela transferência dos grupos acetil e malonil para os grupos tióis da FASN. O processo de alongamento do ácido graxo ocorre através da sequência repetitiva das seguintes reações catalisadas pela FASN: condensação dos grupos acetil e malonil, redução do grupo carbonila, desidratação e redução da dupla ligação. As reações se repetem por sete ciclos e quando a cadeia atinge 16 carbonos, o palmitato

livre é liberado da FASN abandonando o ciclo e concluindo a montagem de ácido graxo simples. O palmitato pode compor lipídeos mais complexos no organismo (CHENG et al., 2014; LEHNINGER, 2006; SADOWSKI et al., 2014).

Figura 4: Processos metabólicos e síntese de ácido graxo *de novo*. As reações de glicólise e do ciclo de Krebs antecedem as reações de montagem do ácido graxo; o citrato é convertido em acetil-CoA, que por sua vez é convertido em malonil-CoA. A ação enzimática da FASN condensa os grupos acetil e malonil originando o palmitato.



Fonte: adaptado de Liu, et al., 2010.

Este processo metabólico é altamente regulado, o citrato no citossol ativa a ACACA, esta por sua vez limita a velocidade da biossíntese do ácido graxo pela produção de malonil-CoA e, finalmente, o palmitato irá inibir a reação por retroalimentação negativa. Além dos produtos do próprio processo metabólico, a síntese de ácido graxo *de novo* também é regulada por fatores hormonais, nutricionais e genéticos, qualquer alteração desse processo pode ocasionar diversas doenças (CZAJA, 2014; LEHNINGER, 2006).

Em suma a síntese de ácido graxo *de novo* requer o substrato acetil-CoA e energia. No entanto, podemos citar quatro elementos chave dessa via: citrato liase, formando acetil-CoA a partir do citrato através do ciclo de Krebs; ACACA, irá ativar o carbono metil da acetil-CoA através de

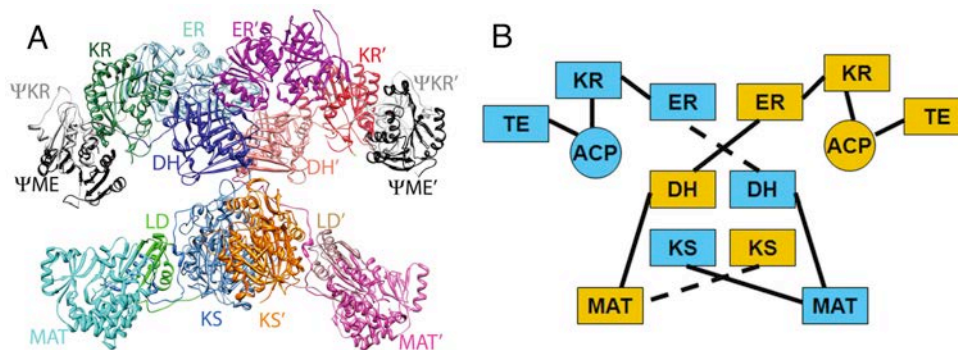
carboxilação resultando em malonil-CoA; energia - NADPH, como fonte de energia nas reações de redução e ATP como fonte de energia na síntese de malonil-CoA -; e FASN, complexo enzimático que catalisa o processo de síntese de lipídeos através de sucessivas condensações de acetil-CoA e malonil-CoA (LIU et al., 2010).

1.4 Ácido graxo sintase (FASN) e a síntese de ácido graxo *de novo*

A proteína denominada ácido graxo sintase (*fatty acid synthase* - FASN) pode ser encontrada em dois subtipos: FASN tipo II, presente em bactérias e plantas e que se caracteriza pela presença de sete domínios funcionais independentes entre si formando um sistema multicatalítico; e, a FASN tipo I, presente em mamíferos, que apresenta sete domínios funcionais conectados entre si (CHENG, 2014). A FASN tipo I é uma enzima citosólica codificada pelo gene *FASN* responsável por catalisar diferentes etapas da biossíntese de lipídeos e armazenar energia. A sua expressão não é significativa na maioria dos tecidos humanos normais, com exceção do fígado e do tecido adiposo (CHENG, 2014; MIGITA, et al., 2009; RUSHTON, 2003).

A estrutura da proteína é composta por dois polipeptídios de 272 kDa constituindo um homodímero entrelaçado em forma de “x”, o que viabiliza múltiplas interações entre seus domínios (Figura 5) (LIU, et al., 2010). A proteína apresenta sete domínios catalíticos: β -cetoacil-PCA sintase (KS), malonil/acetil transferase (MAT), desidrogenase (DH), enoil-PCA redutase (ER), β -cetoacil-PCA redutase (KR), proteína carreadora de acil (ACP) e tioesterase (TE). Podendo ser divididos em duas subunidades: uma subunidade de condensação, incluindo os domínios KS e MAT; e uma subunidade de modificação β -carbono, incluindo os domínios DH, ER e KR. As duas subunidades se associam principalmente pelas interações entre os domínios KS, ER e DH (WITKOWSKI, et al., 1991; LIU et al., 2010).

Figura 5: Modelos estruturais da FASN resultantes de microscopia crio - eletrônica. A) Estrutura atômica da FASN. B) Modelo de organização dos sete domínios catalíticos da FASN. A posição das subunidades viabiliza múltiplas interações inter e intrasubunidades.



Fonte: adaptado de LIU et al., 2010

Na síntese de ácido graxo *de novo*, catalisada pela FASN tipo I, os substratos são transmitidos a partir de um domínio catalítico para o seguinte, na presença de NADPH, formando uma cadeia de 16 carbonos de ácido graxo saturado. Neste processo os domínios catalíticos da FASN tipo I irão catalisar três passos principais: 1) iniciação, a partir da condensação de malonil-CoA e acetil-CoA catalisado pelo MAT; 2) alongação, ciclos repetidos de redução e desidratação adicionando dois carbonos por ciclo, catalisado pelos KS, DH, ER e KR; 3) terminação, libera o palmitato do ACP catalisado pelo subdomínio TE (CHENG, 2014; LIU et al., 2010).

Em mamíferos, a expressão da FASN é regulada positivamente através do aumento nos níveis de carbono, hormônio da tireóide, insulina e glucocorticóides na circulação. Por outro lado, a presença de ácidos graxos insaturados, AMP cíclico (cAMP) e glucagon irão diminuir a expressão da proteína (CHENG et al., 2014).

Sabe-se que a síntese de ácido graxo *de novo* está relacionada às transformações celulares malignas (JIANG, et al., 2014; LIU, et al., 2010; ZAYTSEVA, et al., 2014). Estudos que correlacionam a FASN tipo I ao câncer demonstraram que a sua inibição pode resultar em apoptose celular através do acúmulo de substrato malonil-CoA, criando um ambiente citotóxico (IMPHENG, et al., 2014; JIANG et al., 2014; LIU et al., 2002). As funções e a regulação da expressão dessa proteína têm sido amplamente estudadas em tecidos tumorais de humanos, indicando a FASN tipo I como

uma proteína mediadora de processos biológicos. No entanto, apesar de apresentar alta expressão no fígado, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares desta proteína nas doenças hepáticas, apontando a necessidade de maiores estudos sobre a FASN (MIGITA et al., 2009).

1.5 Fármaco inibidor da FASN – triclosan - e a fibrose hepática

Para compreender a atividade da proteína FASN, é fundamental a análise de inibidores da proteína no estudo do seu efeito no metabolismo celular. Existem diversos inibidores naturais e sintéticos da FASN que resultam em efeitos citotóxicos agindo em diferentes domínios da proteína. No início do desenvolvimento deste trabalho, devido a limitações farmacológicas dos diferentes inibidores, o triclosan se mostrou um composto pertinente por ter sido aprovado pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), no entanto, recentemente foi retirado da lista de compostos aprovados pela mesma (SADOWSKI et al., 2014; VANDHANA et al., 2010). O triclosan (TCS; 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter) de fórmula molecular $C_{12}H_{17}Cl_3O_2$ foi originalmente desenvolvido pela empresa *Ciba-Geigy* na década de 60 e pode ser desativado pela ação de surfactantes com a formação de micelas. Devido a sua atividade antimicrobiana, vem sendo utilizado desde então em uma variedade de cosméticos ao redor do mundo (JONES, et al., 2000).

O fármaco é amplamente conhecido pela sua ação em bactérias e fungos, a inibição da proteína FASN tipo II e da expressão da fímbria impede o crescimento bacteriano (ELWOOD, et al., 2007; MOVAHED, et al., 2016). O TCS acarreta a morte microbiana por difundir-se na parede celular bacteriana e provocar perturbações na membrana, RNA, lipídeo e síntese protéica (JONES, et al, 2000). Mais recentemente, Surolia (2001) demonstrou o potencial da ação inibitória da FASN em *Plasmodium falciparum* no tratamento contra a malária. Por outro lado, a sua presença em corpos d'água levantou a questão da toxicidade do TCS na fauna e flora aquática, indicando a necessidade de regulamentação da deposição do fármaco no intuito da preservação do ambiente aquático (MONTAGNER, et al., 2014).

Em razão da correlação da FASN tipo I a diversos tipos de cânceres, os efeitos do TCS em humanos vem sendo amplamente estudados. Liu et al. (2002) demonstrou o efeito citotóxico do triclosan nas células cancerígenas MCF-7 e SKBR-3 responsáveis por câncer de mama. O fármaco ainda apresenta ação antiinflamatória pela interação com prostaglandinas, assim como pela redução do fator de necrose tumoral (TNF- α) na bexiga (ELWOOD, et al., 2007; JONES, 2000). A atividade do triclosan na síntese de ácido graxo *de novo* é decorrente da inibição do alongamento do ácido graxo através da ação do fármaco no domínio enoil-PCA redutase (ER) da FASN (GUO et al., 2012).

Ainda que presente na lista de prováveis disruptores endógenos, o TCS não apresenta riscos concretos à saúde humana. A maioria do TCS é absorvida pelo trato gastrointestinal e pele, sendo excretada através da urina (KUMAR et al., 2008; VANDHANA et al., 2010). Entretanto, outros estudos apontam efeitos negativos do fármaco TCS no desenvolvimento fetal e na regulação hormonal, além do potencial carcinogênico (GUO, et al., 2012; KUMAR, et al., 2008; PARK, 2016). São necessários maiores estudos sobre os efeitos do TCS na regulação sistêmica do organismo.

Estudos recentes apontam que a regressão do quadro fibrosante no fígado está relacionada à formação de gotículas de lipídeos, oposto ao processo de ativação celular onde a atividade autofágica irá digerir as gotículas de lipídeo oferecendo energia necessária para iniciação dos mecanismos pró-fibrosantes (MALLAT, et al., 2014). A inibição farmacológica da proteína FASN pelo TCS atinge a síntese de ácido graxo *de novo*, o qual irá alterar as gotículas de lipídeos no citoplasma celular e, conseqüentemente, os mecanismos pró-fibrosantes de células estreladas hepáticas (SADOWSKI et al., 2014; VANDHANA et al., 2010). Finalmente, o TCS demonstra alto potencial no estudo da reversão de células estreladas hepáticas do fenótipo ativado para quiescente através do metabolismo de lipídeos.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos celulares e moleculares do efeito do fármaco triclosan (TCS) na modulação do metabolismo de lipídeo através da inibição da proteína ácido graxo sintase (FASN) em células hepática estrelada LX-2, visando à investigação de seu potencial na reversão do processo fibrosante hepático.

2.1 Objetivos específicos

I. Analisar a viabilidade celular da célula estrelada hepática (LX-2) tratadas com o fármaco triclosan e com o controle experimental (DMSO), em ensaios de citotoxicidade (MTT), e selecionadas as concentrações de interesse do estudo dos efeitos do triclosan em células LX-2;

II. Analisar os efeitos morfofisiológicos do TCS em culturas celulares de LX-2 utilizando ensaios de microscopia para se avaliar o metabolismo de lipídeos e alterações de elementos do citoesqueleto

III. Analisar o padrão de expressão de genes relacionados com o processo fibrosante hepático e com o metabolismo de lipídeo nas células LX-2 tratada e não tratada com o fármaco triclosan.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura e tratamento celular

Células da linhagem LX-2, estabelecidas por XU et al. (2005) e oriundas de célula estrelada hepática humana, foram crescidas em garrafas de 25 ou 75 cm² em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM – *Life Technologies*) suplementado com SBF em duas concentrações (2% e 10%). As diferentes concentrações de SBF se justificam pela alteração na fisiologia celular: em culturas crescidas na presença de 2% de SBF as células se mantêm em quiescência e em culturas crescidas na presença de 10% de SBF ocorre a ativação dos mecanismos pró-fibrosantes. As culturas celulares foram mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para a execução deste estudo as células foram incubadas e crescidas até atingirem a confluência celular de 90%, removidas por tripsinização e contadas em câmara de Neubauer para em seguida serem utilizadas nas análises celulares e moleculares.

Para a realização dos ensaios, as células foram crescidas em meio contendo 10% de SBF e em seguida foram tratadas com fármaco triclosan (TCS) nas concentrações de 10 µM ou 50 µM. Em adição, como controle experimental, culturas celulares também crescidas em 10% de SBF foram incubadas nas concentrações de 70,4 mM (0,5% v/v) e 140,8 mM (1% v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO). As incubações foram realizadas por um intervalo de 24 h e em seguida as análises foram realizadas.

3.2 Preparação da solução de Triclosan (TCS)

Para a realização dos ensaios, uma solução estoque de 10 mM de TCS (1M = 289,54 g/ L) foi preparada seguindo as recomendações do fornecedor (*Sigma–Aldrich*). Após a homogeneização em temperatura ambiente, a solução foi filtrada, aliquotada em microtubo e armazenada em freezer a -20° C.

3.3 Teste de viabilidade celular (MTT) em LX-2

A avaliação da citotoxicidade do TCS foi realizada através do clássico ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular (MTT), adaptando-se a metodologia descrita em MONSMAN (1983). Foram realizados dois testes de viabilidade, um teste para o DMSO e outro para o TCS em cultura celular LX-2 crescida em 10% de SBF. Para ambos os testes foram crescidas primeiramente 8×10^3 células em microplacas de 96 poços contendo 100 μ l de meio de cultura (DMEM), até as culturas atingirem 80% de confluência.

Primeiramente, para o teste de citotoxicidade foram selecionadas diferentes concentrações de DMSO (0,2%; 0,5%; 1%; 2%; 3%; 4%; 5%; 7%; 10% e 40% v/v), uma vez que os ensaios seguintes com o fármaco triclosan utilizam DMSO como solvente e é descrito na literatura a toxicidade do DMSO (SANTOS, et al., 2003). Com base nas informações disponíveis na literatura (ELWOOD et. al, 2007; GUO et. al, 2012; LIU et. al, 2002), diferentes concentrações do fármaco TCS foram selecionadas (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 e 200 μ M) para serem utilizadas nos ensaios. Inicialmente, para cada um dos dois testes, o meio de cultura DMEM foi substituído pelo DMSO ou TCS, e os procedimentos seguintes foram realizados em ambos os testes de viabilidade celular.

A incubação processou-se por 24 horas a 37° C em 5% de CO₂ como descrito anteriormente. Após o intervalo de incubação, foi adicionada uma solução contendo 0,5 mg/ ml de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em cada poço e novamente as culturas foram incubadas por um intervalo de 4 horas a 37° C em 5% de CO₂. A atividade mitocondrial celular reduz os sais amarelos de tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em sais azuis de formazan através da ação enzimática da desidrogenase succínica. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μ l de DMSO e a placa incubada *over-night*.

Os resultados do MTT foram avaliados em leitor de absorvância *Spectra Count* no comprimento de onda de 570 nm. As células LX-2 com 10% de SBF não tratadas com o fármaco (grupo controle) foram consideradas como tendo 100% de viabilidade celular, para os demais

tratamentos a viabilidade celular foi calculada a partir do valor do comprimento de onda do grupo controle. Para as realizações das etapas subsequentes foram selecionadas duas concentrações de TCS (10 μM e 50 μM) e seus respectivos controles experimentais DMSO (0,5% v/v e 1% v/v), cuja viabilidade celular assegura a realização dos experimentos.

3.4 Análises de expressão de genes

3.4.1 Extração de RNA total

Para as análises de expressão gênica, os extratos de RNA das células nas condições estudadas foram coletados por tripsinização, lavadas com PBS 1X RNA e armazenados em freezer a -80°C até o momento do processamento das amostras. Para a extração de RNA os extratos celulares foram ressuspensos em 500 μl de TRIZOL® *Reagent* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μl de clorofórmio seguido de 15 segundos de agitação e 2 minutos de incubação. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, a este foram adicionados 250 μl de isopropanol. Após homogeneização manual, as amostras contidas nos microtubos foram incubadas por 5 minutos em gelo e centrifugadas a 10.000 rpm por 8 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 80%. Finalmente, descartou-se o sobrenadante e, após o precipitado secar, o mesmo foi ressuspensado em 30 μl de água livre de RNase.

As amostras de RNA foram quantificadas em aparelho *NanoVue™ Plus* (*GE Healthcare*) e a qualidade foi avaliada utilizando as razões A260/A280 e A260/A230. Para as reações de transcrição reversa, foram utilizados 200 ng de RNA.

3.4.2 Transcrição reversa

Para a síntese de cDNA, reações de transcrição reversa foram

montadas utilizando 200 ng de RNA utilizando transcriptase reversa do vírus de mioblastoma aviária (AMV *Reverse Transcriptase*) seguindo as especificações do fabricante *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Thermo Fisher Scientific*). As reações foram submetidas ao termociclador *Mastercycle pro S*[®] - *Eppendorf*, seguindo o ciclo de 10 minutos a 25° C, 120 minutos a 37° C e 5 minutos a 85° C. Os cDNAs foram utilizados como moldes em reações de PCR e qPCR.

3.4.3 Reações de Polimerização em Cadeia

Para a análise de expressão gênica, Reações de Polimerização em Cadeia (PCR) semiquantitativa (convencional) e/ou de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas seguindo a metodologia básica descrita em Ausubel et al., 2002. Para as reações citadas anteriormente, oligonucleotídeos dos genes alvo foram desenhados por meio do programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e dentre eles, genes correlatos ao processo fibrosante (α -SMA, TGF- β 1, TGF- β 2, CTGF, COL1A1, MCP1 e PDGF) e genes relacionados ao metabolismo de lipídeo (SREBPc, LRAT, MLYCD, ACACA, PPAR γ e FASM) foram analisados, utilizando-se a expressão transcricional do gene β -actina como normalizador. As análises de PCR semiquantitativo e PCR em tempo real foram realizadas para os diferentes genes específicos tanto em células do grupo controle quanto do grupo tratamento.

Para as reações de PCR semiquantitativo foram utilizados os oligonucleotídeos listados na Tabela 1. As reações foram processadas em volume final de 15 μ l, para cada amostra utilizou-se 2 μ l de cDNA (na diluição 1:10 dos RNAs transcritos), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 0,4 mM de oligonucleotídeos direto e reverso específicos, enzima *Taq DNA polimerase* (0,025 U/ μ l) e solução tampão para PCR. Em seguida as amostras foram submetidas ao termociclador *Mastercycle pro S*[®], no qual foram realizados 30 ciclos de amplificação equivalentes a uma desnaturação (95° C por 1 minuto), um

anelamento (temperatura específica de anelamento – TM por 1 minuto), e extensão (72° C por 3 minutos). Para as análises das amostras amplificadas, foram corridas eletroforeses em gel de agarose 1% corados com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)* e fotografados em *MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System)*.

A quantificação dos resultados foi realizada utilizando o software *Image-J* (programa de domínio público desenvolvido pelo *National Institute of Health, USA*). Como referencial do efeito do TCS nas células foi adotado o valor das análises realizadas com as células LX-2 crescidas em 2% de SBF não tratadas com o fármaco.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR convencional semiquantitativa e suas respectivas temperaturas de anelamento (Tm).

Gene	Sequência (5'-3')	Tm
<i>β-actina</i>	Direto: GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC Reverso: CTCCTTAATGTACGCAC	55° C
<i>CTGF</i>	Direto: GCTGACCTGGAAGAGAACAT Reverso: ACAGCGATTCAAAGATGTCA	45° C
<i>COL1A1</i>	Direto: ATGACGTGATCTGTGACGAG Reverso: AAATTCCTCCGGTTGATTTTC	45° C
<i>MCP1</i>	Direto: GACTAACCCAGAAACATCCA Reverso: GGTCAGCACAGATCTCCTT	45° C

Também foram realizadas reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando-se *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems® – Thermo Fisher Scientific)* em placas de 96 poços vedadas com selo óptico (*Applied Biosystems® Micro Amp Optical Adhesive Film - Thermo Fisher Scientific*). A Tabela 2 apresenta as sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real. As reações foram processadas em volume final de 10 µl e para cada amostra utilizou-se 2 µl de cDNA (na diluição 1:10 dos RNAs transcritos), 0,75 µM de oligonucleotídeos específicos e 5 µl de *SYBR® Green PCR Master Mix*. Para as análises, as reações de qPCR foram submetidas à programação contida no aparelho *Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR* utilizando-se o modo de análise

baseado no Ct ($\Delta\Delta C_t$) para uma comparação de quantificação relativa, utilizando-se a β -actina como gene normalizador.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Sequência (5'-3')
<i>β-actina</i>	Direto: GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC Reverso: CTCCTTAATGTCACGCAC
<i>ACACA</i>	Direto: TGTAAGAGCTCATTGTTGGAGGA Reverso: GAATCGAGAGTGCTGGTTCAG
<i>α-SMA</i>	Direto: GCCGAGATCTCACTGACTAC Reverso: GCTGTTGTAGGTGGTTTCAT
<i>TGF-β1</i>	Direto: GACTCGCCAGAGTGGTTATC Reverso: GGAGCTGAAGCAATAGTTGG
<i>TGF-β2</i>	Direto: GCACCTCCACATATAACCAGT Reverso: GGCAATAACATTAGCAGGAG
<i>CTGF</i>	Direto: GCTGACCTGGAAGAGAACAT Reverso: ACAGCGATTCAAAGATGTCA
<i>PDGF</i>	Direto: CTGTCCAGGTGAGAAAGATCG Reverso: ATGCCAGGTGGTCTTCCA
<i>SREBP1c</i>	Direto: ATATCCGAAAACCAAATGAA Reverso: CATAACCGAATCTTCAGCAT
<i>LRAT</i>	Direto: GTGGTCTCCAACAAGCGTCT Reverso: TAGGCGAAGTCCTCCACTGT
<i>MLYCD</i>	Direto: GACATCTCCAGCAACATCCA Reverso: CTGGGTCAAGCTGATGGAAT
<i>PPAR-γ</i>	Direto: GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC Reverso: AACTCAAACCTGGGCTCCATAAAG
<i>FASN</i>	Direto: TCCTGCTGACCAAGAAGTCC Reverso: CTTGCTCCTTGAAGCCATCT

3.5 Análises celulares de microscopia

3.5.1 Análises de microscopia de luz: avaliação das gotículas de lipídeos

O efeito do TCS nas gotículas de lipídeo presentes no citoplasma de células LX-2 crescidas em 10% de SBF foi verificado pela análise de microscopia de luz. As células previamente crescidas foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer seguindo metodologia usual.

Para a montagem das lamínulas, $8,0 \times 10^4$ células foram crescidas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro circulares. As culturas foram realizadas em meio DMEN (300 μ l) contendo 2 ou 10% de SBF. Após atingirem 80% de confluência, o meio de cultura celular foi substituído em todos os grupos. Foram adicionados 10 μ M ou 50 μ M do fármaco TCS às células do grupo tratamento e às culturas controle de duas concentrações de DMSO 0,5% (v/v) (70,4 mM) e DMSO 1% (v/v) (140,8 mM). Após 24 horas a 37° C em 5% de CO₂ as células foram fixadas.

As células contidas nas lamínulas foram fixadas com formol-cálcio por 30 minutos e lavadas com PBS 0,5X, para posterior marcação dos lipídeos. Para a marcação, as células foram lavadas em 300 μ l de propilenoglicol 100% e incubadas por 5 minutos duas vezes, em seguida se adicionou a mesma quantidade da solução de *Red Oil* (*Red Oil O*, *Sigma-Aldrich*) 0,7% até cobrir as lamínulas e foram incubadas por 7 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a solução de *Red Oil* foi retirada e acrescentou propilenoglicol 85% na mesma quantidade, por um período de 3 minutos. Em seguida, ocorreu a incubação com hematoxilina por um minuto, e as lamínulas foram lavadas em água corrente antes de serem montadas em lâminas utilizando gelatina glicerinada (7%).

As imagens foram obtidas em microscópio de campo claro modelo *Leica DMLB* acoplado a um sistema fotográfico *Leica MPS-3* e as análises foram realizadas em triplicatas. Para quantificar as gotículas de lipídeos, foi utilizado o software *Image-J* (programa de domínio público desenvolvido pelo *National Institute of Health*, EUA).

3.5.2 Análises de microscopia de fluorescência: investigação dos filamentos de actina

Utilizamos os mesmos procedimentos de cultura celular especificados anteriormente (item 3.5.1), para as análises de microscopia de fluorescência na investigação do efeito do fármaco TCS na distribuição dos filamentos de actina do citoesqueleto de células LX-2.

Para as análises de microscopia de fluorescência, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 1,36% contendo Triton X-100 (0,2%), e lavadas sucessivamente com PBS 0,5X. Inicialmente as lamínulas foram incubadas com 200 µl de BSA (albumina bovina sérica) a 1% por um intervalo mínimo de 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o citoesqueleto foi corado com solução de faloidina-TRITC a 100 µg/ml em solução de BSA a 1% e incubado por 2 horas. Após lavagens sucessivas com PBS 0,5X, o núcleo celular foi corado por 3 minutos à temperatura ambiente com DAPI (4', 6'-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato) 3,33 ng/ ml diluído em PBS 0,5X. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo N-propilgalato e analisadas as triplicatas utilizando o microscópio de fase modelo *BX51 OLYMPUS* acoplado a um sistema fotográfico.

3.5 Análises estatísticas

Análises estatísticas dos resultados foram geradas utilizando o programa *Graph Pad* versão 5.0 (*Prism Inc.*), adotando o valor $p < 0.05$ de significância estatística, aplicando cálculos de variância simples (*ANOVA one-way*), teste *post-hoc de Dunnet* de maneira distinta entre os grupos controle e tratamento.

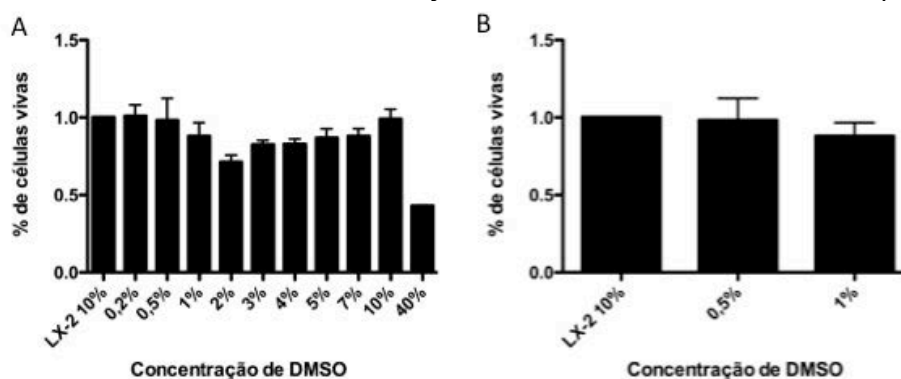
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Cultura de células e ensaios de viabilidade celular

Para analisar o potencial citotóxico de dez diferentes concentrações de DMSO na sobrevivência de culturas de células LX-2 crescidas na presença de 10% de SBF, foi realizado ensaio de MTT. Os resultados desse ensaio, após o tratamento com DMSO e incubado por um período de 24 horas, demonstraram que a concentração de 40% v/v de DMSO limitou a viabilidade celular numa porcentagem de células vivas abaixo de 50% comparados com a cultura celular sem adição do DMSO (controle) (Figura 6).

No entanto, comparando com o controle, as demais concentrações apresentaram porcentagem satisfatória de células vivas (acima de 70%) para assegurar a viabilidade do experimento (Figura 6A). Para os ensaios subsequentes foram selecionadas as concentrações de 0,5% v/v (70,4 mM) e 1% v/v (140,8 mM) de DMSO que não apresentam alterações significativas na viabilidade das células LX-2 crescidas em 10% de SBF (Figura 6 B). Os resultados foram analisados por *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Dunnet, com significância estatística $p < 0.05$.

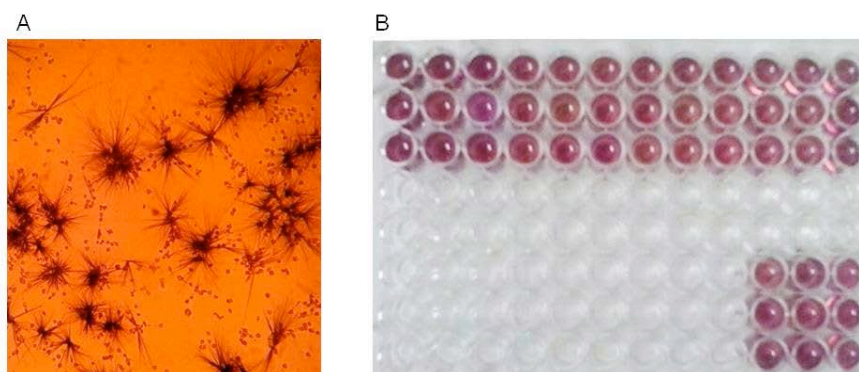
Figura 6: Análise de viabilidade celular. Células LX-2 crescidas na presença de 10% de SBF foram incubadas com DMSO ou não (controle) em diferentes concentrações, por um intervalo de 24 horas, e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Dunnet, com significância estatística $p < 0.05$. A – controle e as dez concentrações de DMSO selecionadas para serem testadas. B – controle e duas concentrações utilizadas nos ensaios subsequentes.



Em seguida, o ensaio de viabilidade celular foi repetido na presença

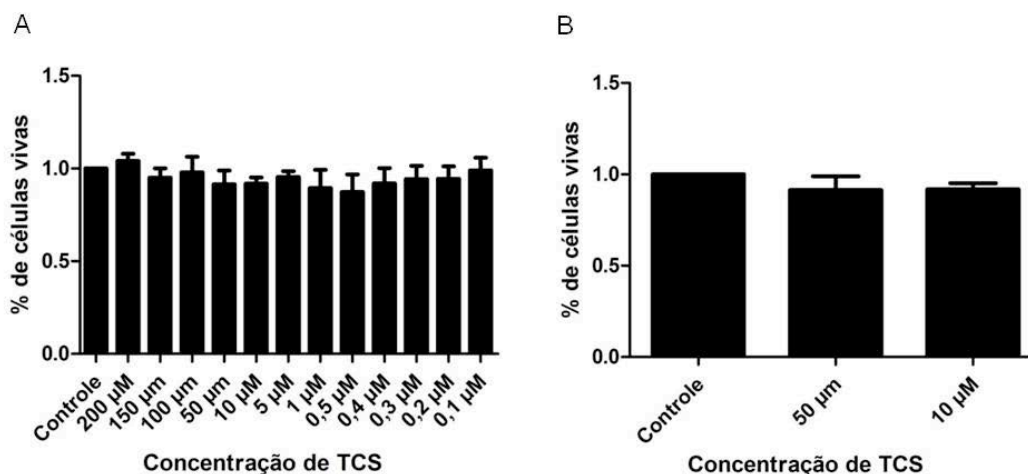
ou ausência de diferentes concentrações do fármaco triclosan (TCS, 0,1 μM a 200 μM). Para isso, novamente o ensaio foi realizado conforme as especificações acima e o fármaco diluído nas concentrações de DNA padronizadas foi adicionado por um intervalo de 24 h e após 4 horas de incubação com o MTT as análises foram realizadas. A Figura 7A apresenta os cristais de formazan produzidos nos ensaios. A presença dos cristais de formazan indica a atividade mitocondrial celular. Quando dissolvidos com DMSO, todas as concentrações de TCS testadas apresentaram uma coloração arroxeada (Figura 7 B), assegurando a viabilidade celular dos tratamentos.

Figura 7: Análise de viabilidade celular em células LX-2 crescidas na presença de 10% de SBF e incubadas ou não com diferentes concentrações de TCS e por um intervalo de 24 horas. A – Cristais de formazan: células com TCS 50 μM após 4 horas de incubação com uma solução contendo 0,5 mg/ mL de MTT B - Microplaca de 96 poços com os tratamentos após a dissolução dos cristais de formazan apresentando coloração arroxeada. Os cristais indicam a viabilidade celular em todos os tratamentos.



Os resultados desses ensaios foram mensurados em leitor de absorvância *Spectra Count* demonstraram que não apresentou alteração significativa na viabilidade das células LX-2 crescidas na presença de 10% de SBF em nenhuma das doze concentrações de TCS quando comparadas com cultura celular sem adição do fármaco (controle) (Figura 8 A). No entanto, as células nas concentrações de TCS 50 μM e TCS 10 μM apresentaram um início de variação morfológicas, quando comparadas com o controle, no intervalo de 24 horas (dados não mostrados) sem afetar a viabilidade celular. Dessa forma. As concentrações de 50 μM e 10 μM de TCS foram escolhidas para os ensaios subsequentes (Figura 8 B) e estes preparados com 1% e 0,5% de DMSO, respectivamente.

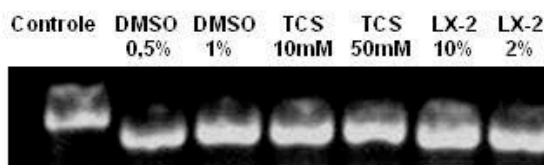
Figura 8: Análise de viabilidade celular. Células LX-2 crescidas na presença de 10% de SBF foram incubadas com TCS ou não (controle) em diferentes concentrações por um intervalo de 24 horas e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet, tomado como significância estatística $p < 0.05$. A – controle e as doze concentrações de TCS para serem testadas selecionadas a partir da literatura. B – controle e duas concentrações com início de variação morfológica celular (dados não mostrados).



4.2 Análises de expressão gênica: PCR semiquantitativo e PCR em tempo real

Após as análises de citotoxicidade do fármaco triclosan, o mRNA foi extraído das células LX-2 crescidas nas diferentes condições na presença ou ausência do fármaco. O mRNA de células oriundas de culturas incubadas com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) serviram como controle experimental para se avaliar o efeito real do fármaco. Após a extração do RNA, a qualidade das amostras transcritas foi realizada pela PCR semiquantitativa do gene da β -actina (Figura 9).

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do gene β -actina, verificando a qualidade dos mRNAs extraídos e a transcrição reversa.



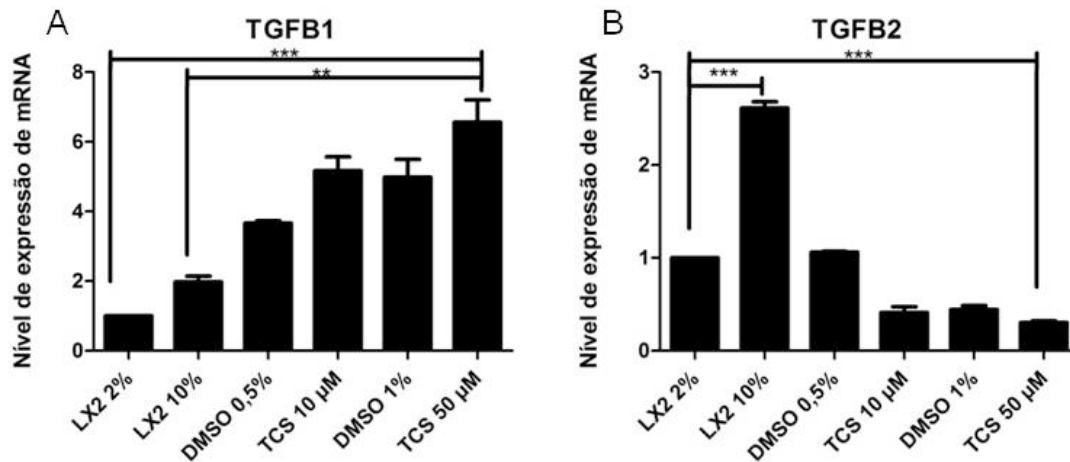
Para as análises de expressão gênica, foram realizados PCR semiquantitativo de três genes relacionados ao processo fibrosante (*CTGF*,

COL1A1 e *MCP1*). E para as reações de PCR em tempo real foram selecionados onze genes, dentre os quais cinco genes relacionados ao processo fibrosante (α -SMA, *TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *CTGF*, e *PDGF*) e seis genes relacionados ao metabolismo de lipídeo (*ACACA*, *SREBP1c*, *LRAT*, *MLYCD*, *PPAR γ* e *FASN*). As análises de expressão de genes foram realizadas adotando as células LX-2 com 2% de SBF como controle experimental (célula em quiescência).

A Figura 10 apresenta os resultados das análises do nível de expressão de mRNA para os fatores de transformação de crescimento (*TGF β 1* e *TGF β 2*). Estes são citocinas responsáveis pela proliferação celular e síntese de matriz em CEH ativadas (LX-2 crescida em 10% de SBF), não sendo eficazes em células quiescentes (LX-2 crescida em 2% de SBF), assim como demonstrado pelas análises de expressão de mRNA (POHLERS, 2009). O resultado para o gene *TGF β 1* não apresentou diferença significativa para células LX-2 crescidas em 10% de SBF e crescidas em 2% de SBF. E os tratamentos com (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M) aumentaram significativamente a expressão em relação às LX-2 com 2% de SBF (Figura 10 A).

No entanto, o resultado para o gene *TGF β 2* apresentou um aumento significativo na expressão em células LX-2 crescidas em 10% de SBF quando comparado à LX-2 com 2% de SBF. Os resultados do gene *TGF β 2* para os tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M) apresentaram uma redução significativa na sua expressão em relação à cultura celular LX-2 crescida em 10% de SBF, em especial, o tratamento com TCS 50 μ M apresentou redução significativa da expressão quando comparado a células LX-2 crescidas em 2% de SBF (Figura 10 B).

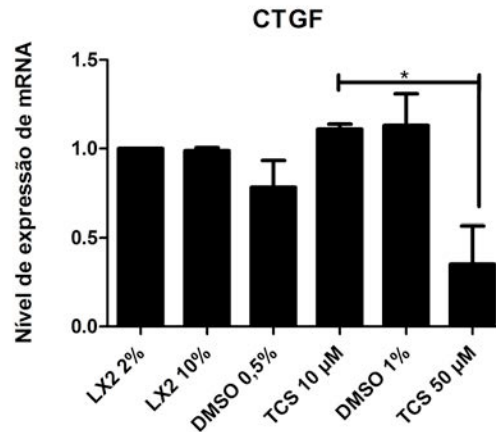
Figura 10: Níveis de expressão relativa dos mRNA *TGFβ1* e *TGFβ2* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μM e 50 μM). As análises foram realizadas em duplicatas por PCR em tempo real e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$ e ** $p < 0,005$, utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



Os resultados dos tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μM e 50 μM) apresentaram um aumento significativo no nível de expressão para o gene *TGFβ1*, e uma diminuição para o gene *TGFβ2*. Estes resultados para ambos os genes relacionados à proliferação celular em CEH ativadas, *TGFβ1* e *TGFβ2*, sugerem que a atividade de DMSO nas concentrações 0,5% v/v e 1% v/v presentes nos tratamentos com TCS 10 μM e 50 μM, respectivamente, sejam responsáveis pelas alterações na expressão dos genes em células LX-2 em 10% de SBF tratadas com o fármaco TCS, e não necessariamente o fármaco.

Continuando as análises, segundo Lipson et al. (2012), o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) não apenas reverte a fibrose quando inibido, mas também é essencial na atividade fibrosante do *TGFβ1* e *TGFβ2*. Na Figura 11, apesar dos resultados estatísticos das análises de PCR não apresentarem variância significativa entre os tratamentos, a análise do gráfico para gene *CTGF* sugere uma redução na expressão de mRNA no tratamento com TCS 50 μM quando comparado aos demais tratamentos. O resultado gráfico sugere que a atividade do TCS nesta concentração module a progressão do processo fibrosante, e, inibe os fatores de transformação de crescimento devido a sua relação ao *TGFβ1* e *TGFβ2*.

Figura 11: Níveis de expressão relativa do mRNA *CTGF* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em duplicatas por (A) PCR em tempo real e (B) PCR semiquantitativo e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde $*p < 0,05$ utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



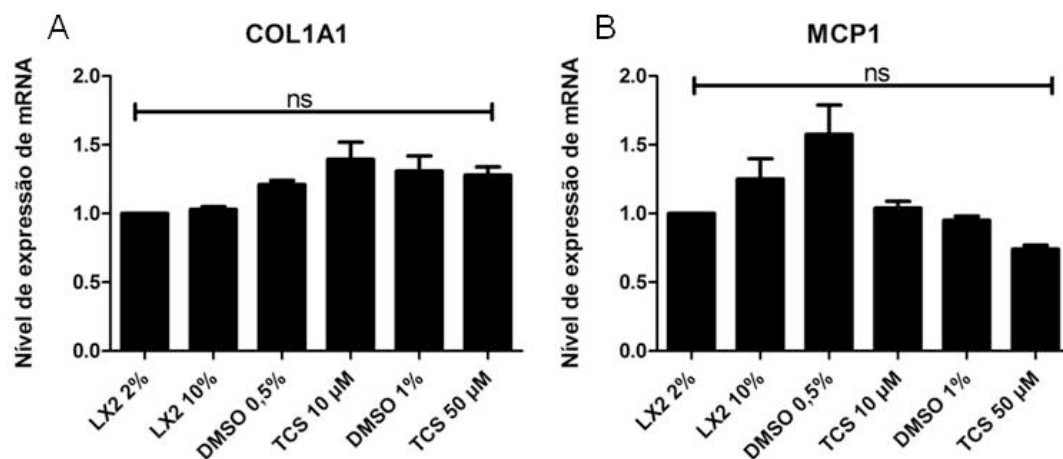
As análises do nível de expressão de mRNA para os genes *TGF β 1*, *TGF β 2* e *CTGF* apresentaram resultados interessantes: apesar de o *CTGF* não apresentar diferença entre os tratamentos com células normais (LX-2 crescida em 2% de SBF) e células ativadas (LX-2 crescida em 10% de SBF), a progressão do processo fibrosante em células LX-2 com 10% de SBF é assegurada pelos fatores de transformação de crescimento, sugerindo a indiferença da ação do CTGF na atividade dos TGF β 1 e TGF β 2 para estes tratamentos. Por outro lado, o resultado gráfico para o gene *CTGF* no tratamento com TCS 50 μ M sugere que independente dos resultados dos genes *TGF β 1* e *TGF β 2*, a redução do nível de expressão do *CTGF* resulta na inibição da atividade fibrosante dos fatores de transformação de crescimento *TGF β 1* e *TGF β 2*, conseqüentemente, diminuindo a progressão do processo fibrosante.

Paralelamente, os resultados para o gene correlato ao processo fibrosante *COL1A1* responsável pela produção de matriz extracelular não demonstraram variação significativa entre a cultura quiescente (LX-2 crescida em 2% de SBF e considerada controle experimental) e os demais tratamentos (Figura 12 A).

Foi analisada a expressão gênica da citocina responsável pela ativação do processo inflamatório em injúrias do fígado, MCP1 (DESHMANE,

2009; MANDREKAR, 2011). Os resultados estatísticos para o gene *MCP1* não apresentaram variância significativa entre os tratamentos (Figura 12 B).

Figura 12: Níveis de expressão relativa dos mRNA *COL1A1* e *MCP1* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em duplicatas por PCR semiquantitativo e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde $p < 0,05$ utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.

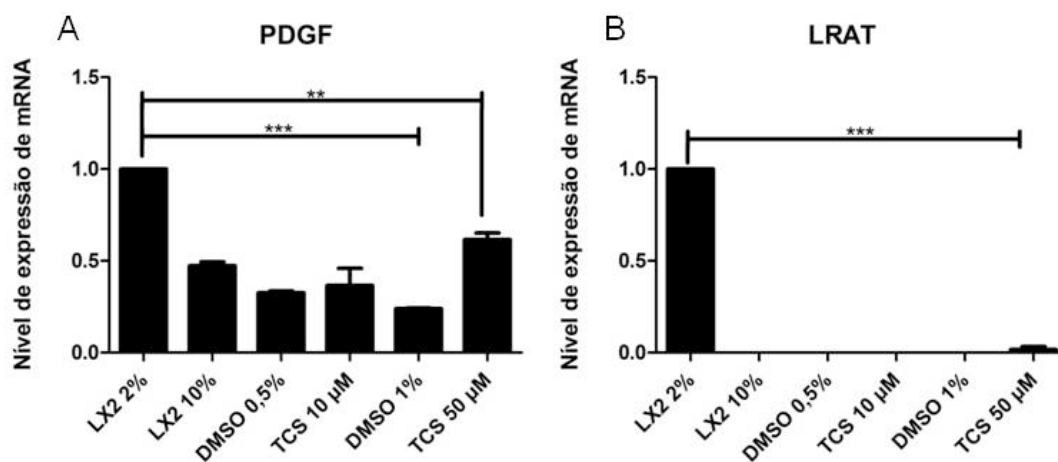


Em ambos os genes, *COL1A1* e *MCP1*, as análises estatísticas não demonstraram variância significativa entre os tratamentos, sugerindo que a modulação da iniciação e perpetuação do processo fibrosante é realizada pelos demais fatores envolvidos neste metabolismo.

O fator de crescimento PDGF foi selecionado por ser um importante mitógeno para a CEH e também por ser responsável pela perda das gotículas de lipídeos durante processo de ativação da CEH (BISSELL, 2001). A análise da expressão do gene *PDGF* nas células investigadas é apresentada na Figura 13 A. Interessantemente, a expressão do fator de crescimento PDGF diminui no tratamento celular com ativação dos mecanismos pró-fibrosantes (LX-2 com 10% de SBF) assim como a sua expressão diminui nos tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com o fármaco TCS (10 μ M e 50 μ M) quando comparado ao controle experimental (LX-2 com 2% de SBF). No entanto, o tratamento com TCS na concentração 50 μ M não apresenta diferença significativa da expressão gênica do *PDGF* comparando com a cultura celular LX-2 crescida em 10% de SBF (estado ativado).

Por outro lado, a enzima LRAT é responsável por catalisar a produção de vitamina A, e conseqüentemente, a produção de gotículas de lipídeos. A Figura 13 B apresenta os resultados do nível de expressão do gene responsável pelo metabolismo de lipídeo *LRAT* corroborando os resultados de Kluwe et al. (2011), sendo altamente expresso em CEH normais (LX-2 crescidas em 2% de SBF) e não significativo em CEH ativadas (LX-2 crescidas em 10% de SBF). Os resultados para os tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS 10 μ M não apresentam expressão significativa do gene, porém, o tratamento com TCS 50 μ M, apesar de não apresentar resultado estatístico significativo, há uma baixa expressão do mRNA de *LRAT*.

Figura 13: Níveis de expressão relativa dos mRNA *PDGF* e *LRAT* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em duplicatas por PCR em tempo real e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



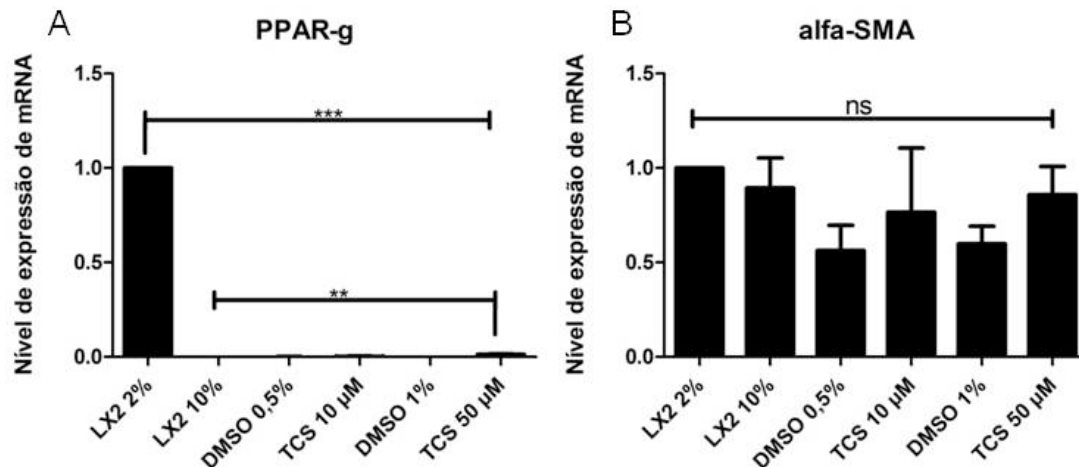
A relação dos genes correlatos ao processo fibrosante e ao metabolismo de lipídeo, *PDGF* e *LRAT*, respectivamente, permite uma análise comparativa dos seus resultados. Além da sua função de proliferação, os efeitos do PDGF levam à perda de gotículas de lipídeos, oposto à ação da LRAT na formação de gotículas de lipídeo (FRIEDMAN, 2008). Apesar do nível de expressão para o gene *PDGF* ser alto em células normais (LX-2 crescidas em 2% de SBF) comparando com os demais tratamentos, o alto nível de expressão do gene *LRAT* sugere uma

compensação da ação de perda das gotículas de lipídeos nestas células. No entanto, o nível de expressão do *LRAT* é extremamente baixo nos tratamentos de células LX-2 com 10% de SBF e com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) ou TCS (10 μ M e 50 μ M), sugerindo que para estes tratamentos a perda de gotículas de lipídeos é significativa comparada à LX-2 com 2% de SBF, quer seja pela ação do *PDGF* ou por um conjunto de moléculas.

A Figura 14 apresenta os resultados das análises de expressão dos genes correlatos ao metabolismo de lipídeo e ao processo fibrosante, *PPAR- γ* e *α -SMA*, respectivamente. A proteína *α -SMA* é responsável pelo aumento da contratilidade celular durante o processo de ativação das CEH, no entanto, os resultados para o gene *α -SMA* não demonstraram variação significativa entre a cultura quiescente (LX-2 cultivada em 2% de SBF e considerada controle) e os demais tratamentos.

O gene *PPAR- γ* é responsável pela regulação do metabolismo de lipídeo protegendo contra lipotoxicidade, e é capaz de reduzir os efeitos proliferativos do fator de crescimento PDGF e inibir a expressão da proteína *α -SMA* (FRIEDMAN, 2008). A análise dos resultados de expressão do mRNA *PPAR- γ* apresentaram níveis extremamente baixos para os tratamentos LX-2 com 10% de SBF, TCS (10 μ M e 50 μ M) e DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) em comparação com o controle (LX-2 crescida em 2% de SBF), porém, o tratamento com TCS 50 μ M nas culturas crescidas com 10% de SBF apresentou expressão estatística significativamente maior que os demais tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS 10 μ M (Figura 14 A).

Figura 14: Níveis de expressão relativa dos mRNA *PPAR-γ* e *α-SMA* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em duplicatas por PCR em tempo real e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$, utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.

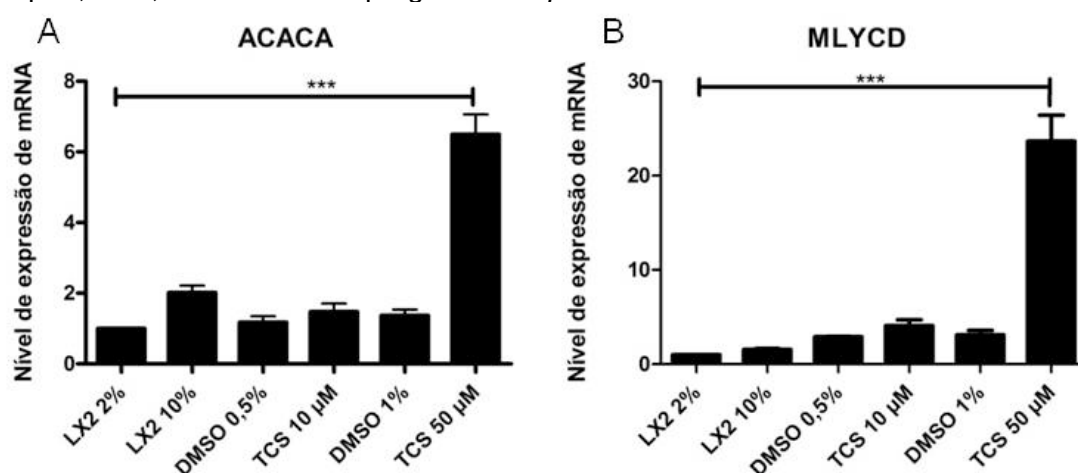


A análise comparativa dos resultados entre o nível de expressão do gene modulador *PPAR-γ* e os fatores modulados α -SMA e PDGF, apresentam respostas interessantes. O *PPAR-γ* reprime a expressão da proteína α -SMA e a sua alta expressão em células LX-2 crescidas em 2% de SBF, assim como a baixa expressão no tratamento com TCS 50 μ M, promove a inibição da ação de contratilidade aumentada da proteína α -SMA (FRIEDMAN, 2008). Para o fator de crescimento PDGF, a ação moduladora do *PPAR-γ* também se aplica para o tratamento com células LX-2 com 2% de SBF, modulando a sua ação celular proliferativa e a perda das gotículas de lipídeos. Entretanto, o nível de expressão do *PPAR-γ* para os demais tratamentos é extremamente baixo, permitindo a ação dos fatores α -SMA e PDGF na progressão do processo fibrosante.

A Figura 15 apresenta os resultados para os genes antagônicos correlatos à síntese de ácido graxo *de novo*, *ACACA* e *MLYCD*. A síntese ocorre através de sucessivas condensações de acetil-CoA e malonil-CoA. A enzima *ACACA* catalisa a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, e a enzima *MLYCD* catalisa a conversão da malonil-CoA em acetil-CoA (LEHNINGER, 2006). Os resultados do nível de expressão do mRNA *ACACA* apresentaram aumento significativo para o tratamento com o fármaco TCS 50 μ M, no entanto, os demais tratamentos não apresentaram

variância estatística significativa quando comparados entre si (Figura 15 A). O gene *MLYCD* apresentou resultado significativo no aumento do nível de expressão no tratamento com o fármaco TCS 50 μM quando comparado aos demais tratamentos (Figura 15 B), e, novamente, os demais tratamentos não apresentaram variação do resultado estatístico quando comparados entre si.

Figura 15: Níveis de expressão relativa dos mRNA *ACACA* e *MLYCD* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μM e 50 μM). As análises foram realizadas em duplicatas por PCR em tempo real e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde $***p < 0,0005$, utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



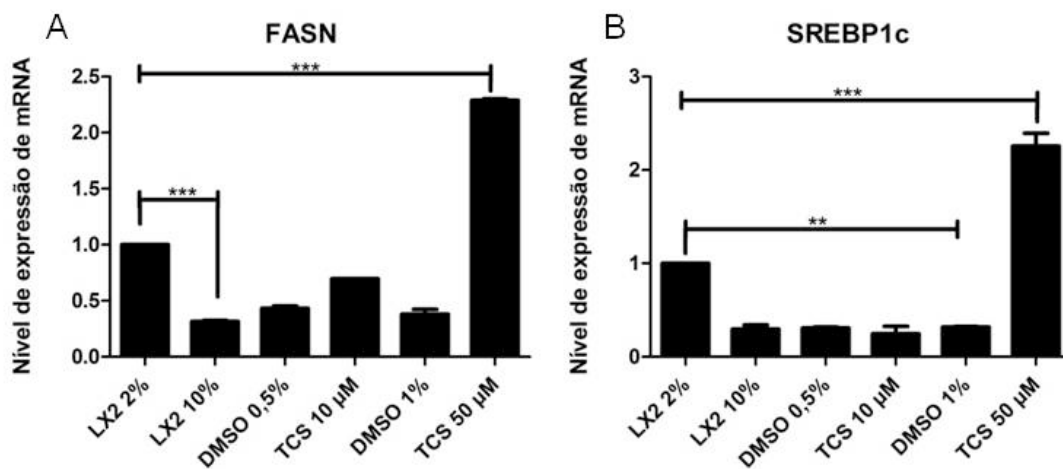
Uma vez que acetil-CoA e malonil-CoA são os substratos na síntese de ácido graxo *de novo*, o aumento da atividade da enzima ACACA sugere a amplificação da síntese. No entanto, o acúmulo de malonil-CoA em conjunto com a inibição de FASN pode suceder em apoptose, sendo a ação da enzima MLYCD importante para o reparo celular (IMPHENG, et al., 2014). Os resultados dos genes *ACACA* e *MLYCD* para o tratamento com o inibidor de FASN, triclosan, na concentração 50 μM sugerem que os níveis de expressão para ambos os genes equilibram o metabolismo celular, assegurando a viabilidade das células e permitindo a amplificação da síntese de ácido graxo *de novo*.

Finalmente, os resultados para o gene da proteína chave da síntese de lipídeo, *FASN*, apresentou aumento significativo na sua expressão quando tratado com fármaco TCS na concentração 50 μM em comparação com o controle experimental LX-2 crescida em 2% de SBF (Figura 16 A). Os

níveis de expressão do gene *FASN* foram significativamente baixos para os tratamentos LX-2 com 10% de SBF e DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) quando comparados à LX-2 com 2% de SBF.

O fator de transcrição *SREBP1c* é responsável pela ativação da proteína *FASN*. Na Figura 16 B observamos um aumento significativo do nível de expressão do gene *SREBP1c* no tratamento com TCS 50 μ M comparado aos demais tratamentos. Em adição, a cultura celular LX-2 crescida em 10% de SBF e os tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS 10 μ M apresenta nível de expressão significativamente baixo do gene *SREBP1c* quando comparado ao controle experimental (LX-2 com 2% de SBF).

Figura 16: Níveis de expressão relativa dos mRNA *FASN* e *SREBP1c* em células LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em duplicatas por PCR em tempo real e o nível de expressão de mRNA obtidos através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$, utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



O fármaco TCS é um famoso inibidor da proteína *FASN* impedindo o alongamento do ácido graxo (GUO et al., 2012). No entanto, em ambos os tratamentos com TCS (10 μ M e 50 μ M) foi observado o aumento do nível de expressão do mRNA *FASN* em comparação à célula LX-2 crescida em 10% de SBF, sugerindo um mecanismo de compensação da proteína *FASN*. Quanto tratada com TCS na maior concentração, 50 μ M, o nível de expressão ultrapassou significativamente o nível de *FASN* em células normais (LX-2 com 2% de SBF).

Complementando os resultados da FASN, o fator de transcrição SREBP1c apresentou resultados interessantes. Os tratamentos com LX-2 crescidas em 10% de SBF, DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS 10 μ M apresentaram nível de expressão do mRNA *SREBP1c* significativamente baixo comparado ao TCS 50 μ M e ao controle experimental (LX-2 com 2% de SBF). Estes resultados para ambos os tratamentos com LX-2 com 2% de SBF e TCS 50 μ M, sugerem que a FASN juntamente com a ativação pelo SREBP1c irão resultar no aumento da síntese de ácido graxo *de novo*. Ademais, o nível de expressão do *SREBP1c* para TCS 10 μ M não apresentou variância significativa comparando à célula ativada (LX-2 com 10% de SBF), o que sugere a manutenção da baixa atividade de síntese de ácido graxo *de novo* neste tratamento.

Em suma, as análises em conjunto da expressão gênica dos mRNA correlatos ao processo fibrosante e ao metabolismo de lipídeo apresentaram resultados interessantes: a modulação dos fatores que permitem a iniciação e perpetuação do processo fibrosante, como o TGF β 1 e TGF β 2, PDGF e α -SMA, é realizada pelos fatores correlatos ao metabolismo de lipídeo, como o LRAT e PPAR- γ . Além disso, apresentou a diferença significativa dos intermediários da síntese de ácido graxo *de novo* - PPAR- γ , LRAT, FASN e SREBP1c- entre células normais (LX-2 crescidas em 2% de SBF) e células ativadas (LX-2 crescidas em 10% de SBF), principalmente quanto à presença de gotículas de lipídeos nas células.

Finalmente, o tratamento com o fármaco TCS na concentração 50 μ M além de apresentar resultado positivo para o gene responsável pela reversão e inibidor de genes relacionados ao processo fibrosante, *CTGF*, demonstrou um mecanismo de compensação da inibição da proteína chave da síntese de ácido graxo *de novo*, FASN, aumentando os níveis da expressão gênica dos mRNA correlatos ao metabolismo de lipídeo - *ACACA*, *MLYCD*, *FASN* e *SREBP1c*.

4.3 Análises morfofuncionais: microscopia de luz e de fluorescência

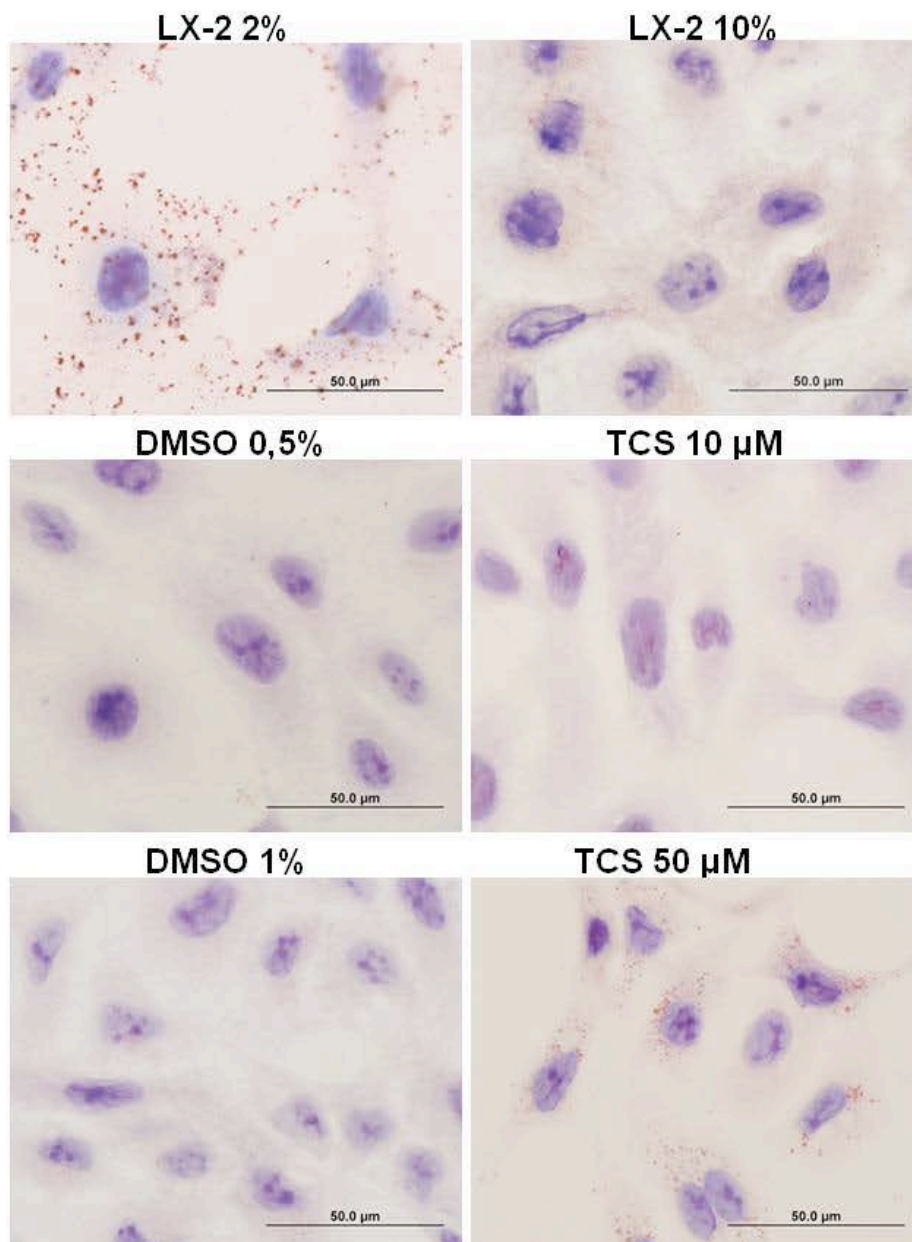
4.3.1 Microscopia de luz

Análises de microscopia de luz foram realizadas para avaliar os efeitos do fármaco TCS nas gotículas de lipídeos em células LX-2 crescidas em 10% de SBF. A avaliação das gotículas de lipídeos auxilia na compreensão do metabolismo de lipídeo celular, uma vez que células estreladas hepáticas apresentam grande quantidade de gotículas de lipídeos quando em estado saudável, os quais são perdidos uma vez que a célula é ativada durante o processo de fibrose (MALLAT, et al., 2014). A Figura 17 apresenta os resultados da microscopia de luz para células LX-2 crescidas em 2% de SBF (estado quiescente), LX-2 crescidas em 10% de SBF (estado ativado) e para os tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). Os resultados apresentaram a quantidade elevada de gotículas de lipídeos em células LX-2 com 2% de SBF, as quais são perdidas na condição LX-2 com 10% de SBF, corroborando a observação acima descrita por Mallat, et al. (2014).

Os resultados para células LX-2 crescidas em 10% de SBF e tratadas com DMSO 0,5% (v/v), controle experimental, e TCS 10 μ M foram semelhantes. Não foram observadas grandes modificações na quantidade de gotículas de lipídeos no citoplasma das células nestes tratamentos.

As análises de microscopia de luz de células LX-2 crescidas em 10% de SBF e em seguida tratadas com DMSO 1% (v/v) ou TCS 50 μ M apresentaram resultados interessantes. Como descrito acima, os resultados para DMSO 0,5% (v/v), considerado controle experimental, não apresentou mudanças significativas na presença das gotículas de lipídeos, quando comparadas a células LX-2 crescidas em 10% de SBF; da mesma forma dos resultados para DMSO 1% (v/v). Desta maneira, quando tratadas com o fármaco TCS na concentração 50 μ M as células apresentaram aumento significativo da quantidade de gotículas de lipídeos no seu citoplasma quando comparadas às LX-2 crescidas em 10% de SBF.

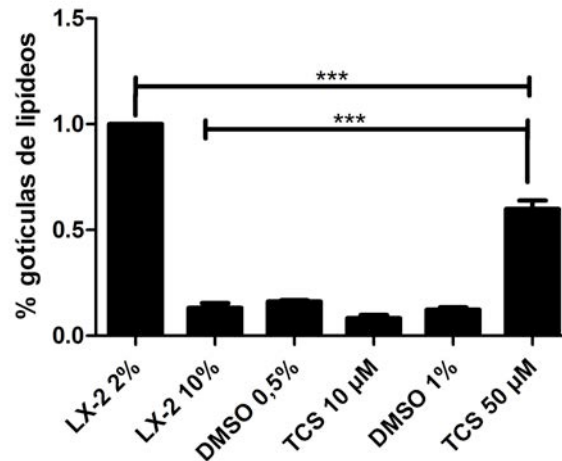
Figura 17: Microscopia de luz de cultura celular LX-2 crescida em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). Células coradas com *Red Oil O* e hematoxilina.



Para verificar os resultados das análises de microscopia de luz, foram quantificadas as gotículas de lipídeo presentes no citoplasma dos diferentes tratamentos utilizando o programa *ImageJ*. Os resultados para a quantificação das gotículas de lipídeos para o fármaco TCS, inibidor da proteína chave do metabolismo de lipídeo, na concentração 50 μ M apresentou aumento significativo em relação à cultura celular LX-2 crescida em 10% de SBF (Figura 18). Este resultado sugere que, apesar de inibir a FASN, o efeito do TCS nas células ativa um mecanismo de compensação,

fazendo com que as células amplifiquem o metabolismo de lipídeos e, conseqüentemente, a quantidade de gotícula de lipídeos no seu citoplasma.

Figura 18: Quantificação das gotículas de lipídeos presentes no citoplasma de células LX-2 crescidas em 2% de SBF e LX-2 crescidas em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em duplicatas pelo programa *ImageJ* e em seguida aplicada análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$ utilizando-se o programa *Graph Pad* versão 5.



4.3.2 Microscopia de fluorescência

Os filamentos de actina presentes no citoesqueleto são fundamentais em processos celulares como a migração, morfogênese, fagocitose e adesão. Alterações na dinâmica do citoesqueleto estão associadas a diversas patologias, como a fibrose hepática. Durante o processo fibrosante, além da fibrogênese e o aumento da síntese de matriz extracelular, a reorganização do citoesqueleto de CEH oferece a energia necessária para a sua remodelação (CUI, et al., 2014; TOJKANDER, et al., 2012). Desta maneira, foram analisados os efeitos morfofuncionais do fármaco TCS em culturas celulares LX-2 através do uso de microscopia de fluorescência, utilizando faloidina-TRICT e DAPI.

A Figura 19 apresenta os resultados das análises da arquitetura celular de LX-2 crescidas em 2% de SBF, LX-2 crescidas em 10% de SBF e dos tratamentos com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). A análise deste resultado para a cultura celular em estado quiescente (LX-2 com 2% de SBF) demonstra a presença de filamentos de actina

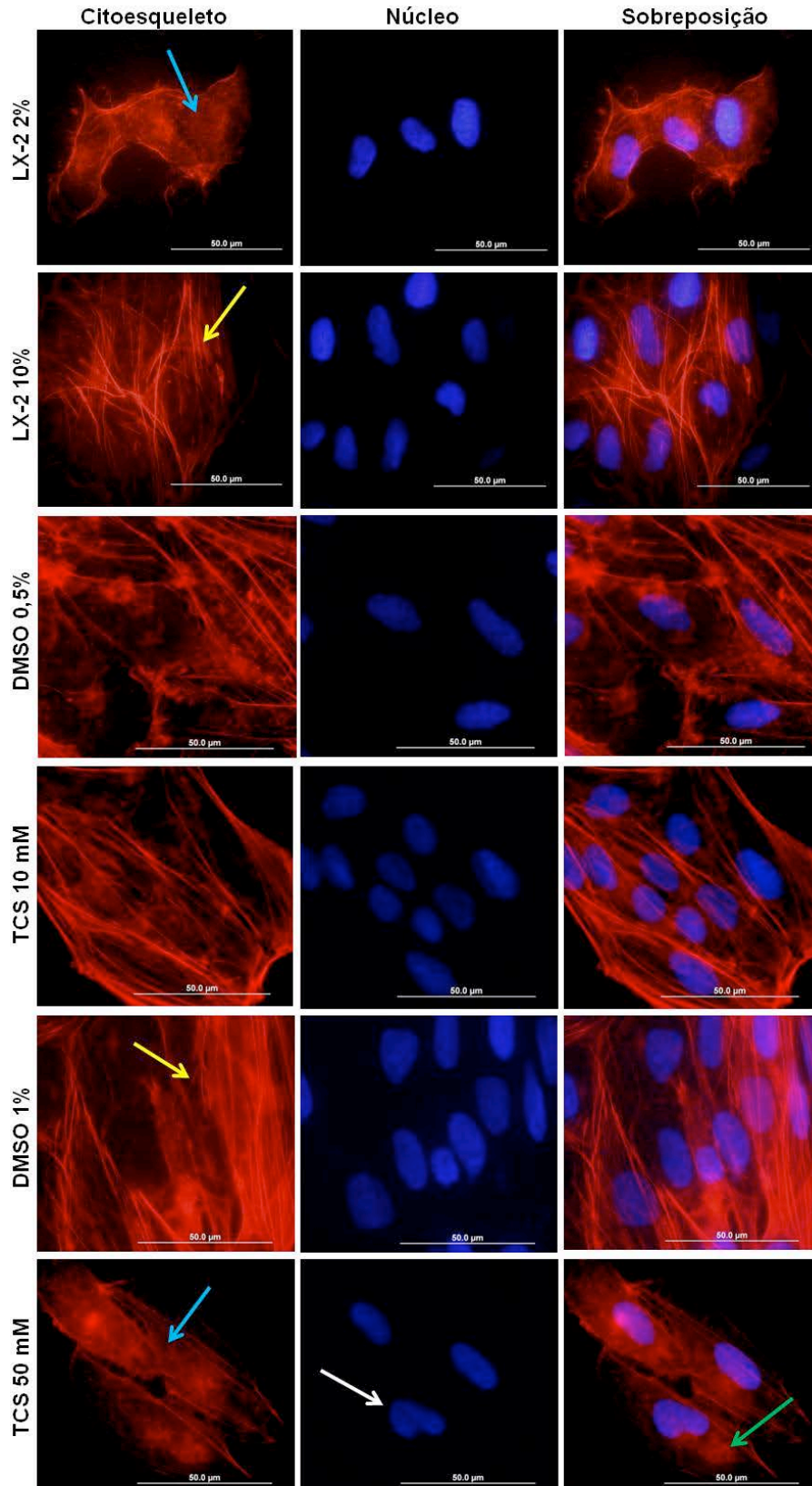
despolimerizados (seta azul). E a cultura celular em estado ativado (LX-2 com 10% de SBF) apresenta filamentos de actina polimerizados (seta amarela), corroborando os resultados de Cui, et al. (2014) para CEH ativadas com filamentos de actina polimerizados.

Os resultados das análises do citoesqueleto para células LX-2 crescidas em 10% de SBF e tratadas com DMSO 0,5% (v/v), controle experimental, ou com TCS 10 μ M apresentaram para ambos a presença de filamentos de actina polimerizados, característica semelhante à CEH ativada.

Os tratamentos com DMSO 1% (v/v), controle experimental, e com TCS 50 μ M de cultura celular LX-2 com 10% de SBF, apresentaram resultados interessantes. Na Figura 19 podemos observar que o DMSO 1% (v/v) não apresentou alteração morfológica significativa quando comparado à LX-2 crescida em 10% de SBF. No entanto, o tratamento com o fármaco TCS na concentração 50 μ M apresentou algumas alterações: foi possível observar uma diminuição geral da quantidade de filamentos de actina polimerizados (seta amarela), prevalecendo células com filamentos de actina despolimerizados (seta azul); em adição, as células neste tratamento apresentaram estruturas globulares de actina no citoesqueleto (seta verde).

Os resultados tanto para DMSO 0,5% (v/v) quanto para DMSO 1% (v/v) sugerem que a presença do DMSO como controle experimental não são responsáveis por alterações morfológicas em células LX-2 com 10% de SBF, uma vez que apresentam filamentos de actina polimerizados, assim como CEH em estado ativado (LX-2 com 10% de SBF). Entretanto, o resultado para o tratamento com TCS na concentração 50 μ M, além de apresentar a morfologia do citoesqueleto semelhante àquele de CEH quiescente (LX-2 com 2% de SBF), com a presença de filamentos de actina despolimerizados; também apresentam estruturas globulares de actina no seu citoesqueleto, das quais a função ainda não foi esclarecida. Estas estruturas de actina apresentam características morfológicas similares aos podossomos, os quais são estruturas ricas em actina presentes em células móveis e que contribuem para a invasão de tecidos e para o remodelamento de matriz extracelular (LINDER & AEPFELBACHER, 2003).

Figura 19: Microscopia de fluorescência de cultura celular LX-2 crescidas em 2% de SBF e LX-2 crescida em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). Células coradas com faloidina-TRICT, citoesqueleto em vermelho, e DAPI, núcleo em azul, e ambas as Figuras sobrepostas. Setas: azul: Filamentos de actina despolimerizados; amarela: filamentos de actina polimerizados; verde - estruturas globulares de actina; branca – núcleo deformado.



Em conjunto, os resultados das análises de microscopia de fluorescência revelaram mudanças interessantes no citoesqueleto para o tratamento com TCS na concentração 50 μM . Apesar de perder os filamentos de actina polimerizados, o fármaco TCS apresenta a presença de estruturas globulares de actina no citoesqueleto, potencialmente identificados como podossomos (LINDER & AEPFELBACHER, 2003). Sadowski, et al. (2014) demonstra que células tratadas com TCS apresentam estas formações na membrana celular durante o processo de apoptose. Outro estudo demonstra a formação destas estruturas em células cancerígenas expostas a pH alcalino (KHAJAH, et al., 2015). Estes resultados sugerem que os podossomos presentes em células LX-2 tratadas com o fármaco TCS 50 μM pode tanto apresentar papel no remodelamento da matriz extracelular e início de uma transdiferenciação celular para hepatocarcinoma, quanto indicar possível citotoxicidade resultando na apoptose celular.

Em adição, para o tratamento com o fármaco TCS 50 μM foram observadas mudanças na morfologia do núcleo celular (seta branca, Figura 19). Versaevel et al. (2012) demonstrou que grandes mudanças na morfologia celular induzem a deformação e orientação do núcleo, afetando também a proliferação celular. Portanto, as alterações da distribuição geral dos filamentos de actina podem ter ocasionado a deformação do núcleo destas células, conseqüentemente, afetando a capacidade de proliferação celular de células tratadas com TCS 50 μM .

5. CONCLUSÕES

Nos últimos anos, as doenças hepáticas ainda são consideradas um grave problema de saúde pública, mesmo frente aos avanços da medicina, os tratamentos convencionais não são satisfatórios na erradicação das suas diferentes etiologias. A característica clínica presente em qualquer lesão do fígado é a inflamação do tecido hepático na tentativa de reparação, conhecida como fibrose hepática (ANDRADE, 2005; BECKER, 2013). Assim, considerando-se a necessidade do desenvolvimento de novas terapias, o estudo de diferentes vias metabólicas relacionadas ao processo de iniciação e perpetuação da fibrose hepática se torna essencial. Dentro deste contexto, foi investigada a via metabólica da síntese de ácido graxo *de novo*, considerando-se que o fármaco triclosan, inibidor da proteína chave desta síntese (FASN), modula o processo de fibrose hepática em células modelo da CEH, a LX-2.

Os resultados do presente estudo demonstraram que ao nível de expressão gênica, os genes correlatos à fibrose hepática não apresentaram resultados significativos para os tratamentos com o fármaco TCS, com exceção do *CTGF*, o qual a sua inibição por parte do TCS 50 μ M diminui a progressão do processo fibrosante. Os resultados para os genes correlatos ao metabolismo de lipídeo podem modular os fatores que promovem a fibrose hepática, e o efeito inibidor do fármaco TCS ativa um mecanismo de compensação celular com o aumento da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeo, como o gene *FASN*. Este mecanismo de compensação foi verificado na microscopia de luz e na quantificação das gotículas de lipídeos, podendo observar uma maior quantidade de gotícula de lipídeos no citoplasma de células LX-2 crescidas em 10% de SBF e tratadas com TCS 50 μ M. Finalmente, as análises da distribuição dos filamentos de actina demonstraram o efeito do TCS na reversão da morfologia de células LX-2 com 10% de SBF (ativadas) ao estado quiescente (LX-2 com 2% de SBF), através da perda de filamentos de actina polimerizados.

Por outro lado, os resultados da microscopia de fluorescência apresentaram estruturas globulares de actina no citoesqueleto destas células, possivelmente os denominados podossomos; assim como a deformação do núcleo celular, os quais os motivos não foram esclarecidos. No entanto, estudos sugerem que o pH e produtos tóxicos à célula podem causar essa alteração na distribuição da actina celular formando essas estruturas globulares (KHAJAH, et al., 2015; SADOWSKI, et al., 2014); as quais podem ser responsáveis pela remodelação da matriz extracelular. Em adição, a mudança geral na distribuição da actina do citoesqueleto celular pode ocasionar a deformação do núcleo, assim como afetar a capacidade de proliferação celular (VERSAEVEL et al., 2012).

Os resultados alcançados neste estudo apontaram o TCS como um composto favorável ao estudo da via metabólica do lipídeo e, conseqüentemente, do processo de fibrose hepática; assim como a síntese do ácido graxo *de novo* apresenta potencial no desenvolvimento de novas terapias para doenças hepáticas. Entretanto, o fármaco TCS apresentou efeitos de citotoxicidade em cultura celular LX-2. Recentemente, foi anunciado pelo órgão regulador de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration, FDA*) que produtos que utilizam o triclosan em sua composição deverão ser retirados do mercado, por apresentarem risco a saúde, como bactérias super-resistentes e distúrbios hormonais (FDA, 2016). Porém, antes da eliminação do uso do TCS em pesquisas, são necessárias maiores investigações dos efeitos reais do fármaco na reversão do processo fibrosante, considerando os resultados obtidos no presente estudo.

Em suma, foi apresentada a complexidade do processo de fibrose hepática em células LX-2 através da interação de diferentes moléculas e vias metabólicas. A proteína FASN se mostrou importante alvo terapêutico devido a sua função no controle do fornecimento de energia para o processo de fibrose hepática, e, em longo prazo, pode subsidiar o desenvolvimento de novos fármacos. O fármaco TCS estudado, e recentemente retirado da lista de substâncias aprovadas pela *FDA*, demonstrou aptidão na reversão do quadro fibrosante, como também apresentou características possivelmente citotóxicas, as quais demandam de maiores estudos.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, Zilton A. Regression of hepatic fibrosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.

AUSUBEL, F. M. (Ed.). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. **Wiley**, 1, 2002.

BECKER, Carlos Eduardo et al. Melting curve analysis for the screening of hepatitis B virus genotypes A, D and F in patients from a general hospital in southern Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 50, n. 3, p. 219-225, 2013.

BISSELL, D. Montgomery. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. **Experimental and molecular medicine**, v. 33, n. 4, p. 179-190, 2001.

CHENG, Chien-shan; WANG, Zhiyu; CHEN, Jianping. Targeting FASN in breast cancer and the discovery of promising inhibitors from natural products derived from traditional Chinese medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

CUI, Xiaodong et al. F-actin cytoskeleton reorganization is associated with hepatic stellate cell activation. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 5, p. 1641-1647, 2014.

CZAJA, Albert J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 10, p. 2515-32, 2014.

DESHMANE, Satish L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

ELWOOD, Chelsea N. et al. Triclosan inhibits uropathogenic Escherichia coli-stimulated tumor necrosis factor- α secretion in T24 bladder cells in vitro. **Journal of endourology**, v. 21, n. 10, p. 1217-1222, 2007.

FDA. FDA issues final rule on safety and effectiveness of antibacterial soaps. **FDA News Release**, US, September 2, 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm517478.htm>>. Acesso em: 08 set. 2016.

FRIEDMAN, Scott L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.

FRIEDMAN, Scott L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.

IMPHENG, Hathaichanok et al. The selective target of capsaicin on FASN expression and de novo fatty acid synthesis mediated through ROS generation triggers apoptosis in HepG2 cells. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107842, 2014.

IREDALE, John P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 3, p. 539-548, 2007.

GUO, Guang-Hui et al. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 8, n. 1, p. 59-64, 2009.

GUO, Li-Wu et al. Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 262, n. 2, p. 117-123, 2012.

JIANG, Li et al. Up-regulated FASN expression promotes transcoelomic metastasis of ovarian cancer cell through epithelial-mesenchymal transition. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 11539-11554, 2014.

JONES, Rhonda D. et al. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. **American journal of infection control**, v. 28, n. 2, p. 184-196, 2000.

KHAJAH, Maitham A. et al. Bleb formation is induced by alkaline but not acidic pH in estrogen receptor silenced breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 46, n. 4, p. 1685-1698, 2015.

KLUWE, Johannes et al. Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. **Gut**, v. 60, n. 9, p. 1260-1268, 2011.

KUMAR, Vikas; BALOMAJUMDER, Chandrajeet; ROY, Partha. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. **Toxicology**, v. 250, n. 2, p. 124-131, 2008.

LEHNINGER, Albert. L.; NELSON, David L.; COX, Michael. **Princípios de bioquímica**, 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LINDER, Stefan; AEPFELBACHER, Martin. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 7, p. 376-385, 2003.

LIPSON, Kenneth E. et al. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

LIU, Binqiu et al. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 187-193, 2002.

LIU, Hailan et al. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 69, 2010.

MALLAT, Ariane et al. Autophagy: a multifaceted partner in liver fibrosis. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MANDREKAR, Pranoti et al. An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: Regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 2185-2197, 2011.

MAYA, Maria Cristina A. et al. Colecistite Aguda: diagnóstico e tratamento. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 8, n. 1, 2009.
MIGITA, Toshiro et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 7, p. 519-532, 2009.

MONSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MONTAGNER, Cassiana C. et al. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 1850-1858, 2014.

PARK, Bo Kyung et al. Effects of Triclosan on Neural Stem Cell Viability and Survival. **Biomolecules & therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 99, 2016.

PELLICORO, Antonella et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 181-194, 2014.

POHLERS, Dirk et al. TGF- β and fibrosis in different organs—molecular pathway imprints. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 8, p. 746-756, 2009.

REYNAERT, H. et al. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. **Gut**, v. 50, n. 4, p. 571-581, 2002.

ROCHA, Edilma Gomes; PEREIRA, Maria Lúcia Duarte. Representações sociais sobre a cirrose hepática alcoólica elaboradas por seus portadores. **Esc. Anna Nery Rev. Enferm**, v. 11, n. 4, p. 670-676, 2007.

ROCKEY, Don C. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. **Seminars in liver disease**. v. 21, n. 03, p. 337-350, 2001.

RUSHTON, D. N. Functional electrical stimulation and rehabilitation—an hypothesis. **Medical engineering & physics**, v. 25, n. 1, p. 75-78, 2003.

SADOWSKI, Martin C. et al. The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an anti-microbial agent for targeting prostate cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 9362, 2014.

SANTOS, Nuno C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035-1041, 2003.

SENOO, Haruki et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative—past, present and future. **Cell biology international**, v. 34, n. 12, p. 1247-1272, 2010.

SHI, Yue-Feng et al. Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF- β signaling pathway. **FEBS letters**, v. 581, n. 2, p. 203-210, 2007.

SUROLIA, Namita; SUROLIA, Avadhesha. Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of Plasmodium falciparum. **Nature medicine**, v. 7, n. 2, p. 167-173, 2001.

TOJKANDER, Sari; GATEVA, Gergana; LAPPALAINEN, Pekka. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. **J Cell Sci**, v. 125, n. 8, p. 1855-1864, 2012.

VANDHANA, S. et al. Evaluation of suitable solvents for testing the anti-proliferative activity of triclosan—a hydrophobic drug in cell culture. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, 2010.

VERSAEVEL, Marie; GREVESSE, Thomas; GABRIELE, Sylvain. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. **Nature communications**, v. 3, p. 671, 2012.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 142-151, 2005.

WITKOWSKI, Andrzej et al. Structural organization of the multifunctional animal fatty-acid synthase. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 3, p. 571-579, 1991.

ZAYTSEVA, Yekaterina Y. et al. Cancer cell-associated fatty acid synthase activates endothelial cells and promotes angiogenesis in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, p. bgu042, 2014.