

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2021.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células estreladas hepáticas (LX-2): Controle do processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos

CAIO MATEUS DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia celular e molecular)

Abril - 2019

CAIO MATEUS DA SILVA

**Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em
linhagem de células estreladas hepáticas (LX-2): Controle do
processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos**

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

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia celular e molecular)

Rio Claro – SP

Abril – 2019

S586a

Silva, Caio Mateus da

Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células estreladas hepáticas (LX-2) : Controle do processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos / Caio Mateus da Silva. -- Rio Claro, 2019

71 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Biologia Molecular. 2. Silimarina. 3. Plantas medicinais. 4. Técnicas de cultura de Células. 5. Fígado Doenças. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ERRATA

SILVA, Caio M. **Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células estreladas hepáticas (LX-2): Controle do processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos.**

2019, 71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro, 2019.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
Certificado de aprovação	Título da dissertação	Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células hepáticas estreladas (LX-2): controle do processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos	Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células estreladas hepáticas (LX-2): Controle do processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos
Agradecimentos	25	Às agências: CAPES pela bolsa de mestrado e FAPESP (2013/21186-5 e 2018/05286-3) pelo apoio financeiro para a realização dos projetos de pesquisa.	Às agências: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2013/21186-5 e 2018/05286-3) pelo apoio financeiro para a realização dos projetos de pesquisa.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação dos efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células hepáticas estreladas (LX-2): controle do processo fibrosante hepático e alterações no metabolismo de lipídeos

AUTOR: CAIO MATEUS DA SILVA

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

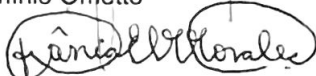
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI
x / Fundação Hermínio Ometto



Profa. Dra. DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES
Pós-Doutoranda do Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 27 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmã e irmão, por todo o amor e suporte, sempre me confortando nos momentos de dificuldades. Agradeço-os por acreditarem no meu sonho e por toda a confiança e incentivo que tive durante esse período. Palavras não são o suficiente para descrever quanto eu amo minha família.

Agradeço de maneira especial a professora Dra. Karen, pela orientação e amizade durante a realização desse trabalho. Agradeço-a pela dedicação nas incontáveis horas de discussão, reflexão e leitura, além disso, por ter tido muita paciência e acima de tudo por todos os conselhos em relação a vida academia e pessoal.

Às minhas colegas de trabalho: Lara, Letícia Ramos, Lígia, Marina, Priscila e Thaís, sem vocês e todo o trabalho em equipe, ajuda em experimentos e ótimas conversas eu não conseguiria realizar essa dissertação. Obrigado meninas por tornarem os momentos no laboratório muito mais fácil e agradável. Vocês são sensacionais! Obrigado à todos(as) que de alguma maneira contribuíram com esse trabalho.

Aos amigos de república: Luan (Guache), Nata (Maori), Rafael (Spyro) e Gabriel (Gabigol), agradeço toda a amizade durante esse tempo em que moramos juntos em nossa querida casa. Obrigado pela paciência, conversas e reflexões. Vocês foram meu incentivo diário para não desistir dos meus sonhos.

Agradeço imensamente às amigadas que construí em Rio Claro durante esse período. Agradeço todos os amigos que construí no time de vôlei e por se tornarem tão importantes na minha vida. Em especial aos amigos Rafaela de Camargo e Marco Contessoto os melhores amigos que a vida me trouxe. Obrigado por todos os momentos juntos, pelos conselhos em momentos de angústia e por todo o companheirismo e diversão.

À Unesp, ao programa de pós-graduação e ao departamento de biologia pela oportunidade.

Às agências: CAPES pela bolsa de mestrado e FAPESP (2013/21186-5 e 2018/05286-3) pelo apoio financeiro para a realização dos projetos de pesquisa.

RESUMO

As doenças hepáticas são um grave problema de saúde mundial. Muitas patologias crônicas acometem o fígado e em comum à essas doenças há o surgimento do processo fibrosante. A fibrose hepática é caracterizada pela deposição de fibras cicatriciais e alterações na matriz extracelular do órgão. O estabelecimento da fibrose ocorre quando células estreladas hepáticas (CEHs) passam de seu fenótipo quiescente para o ativado. Essas células em fenótipo ativado, são proliferativas e sintetizadores de elementos da matriz extracelular. Caracteristicamente as CEHs ativadas alteram seu metabolismo lipídico perdendo a capacidade de armazenar gotículas lipídicas em seu citoplasma e alguns autores propõem o controle desse metabolismo para auxiliar a reversão do processo fibrosante hepático. Compostos obtidos através de plantas pode ajudar no tratamento de doenças hepáticas. Nesse contexto, a planta medicinal *Silybum marianum* é conhecida pelos seus efeitos medicinais. O conjunto de compostos encontrados em seus frutos e sementes são denominados silimarina. A silimarina apresenta efeitos hepatoprotetores, anti-inflamatórios e anti-oxidativos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos celulares e moleculares da silimarina em linhagem de células estreladas hepáticas (LX-2) e seu potencial de reversão da fibrose hepática e o controle do metabolismo lipídico. Além disso, o efeito do composto no metabolismo lipídico foi avaliado em um modelo de co-cultivo entre células hepáticas (HepG2) e as LX-2. Os resultados apontam que a concentração de 100 μM de silimarina atua no controle do processo fibrosante, reduzindo a sinalização pró-fibrótica das células LX-2. Essa mesma concentração é capaz de restaurar a homeostase do metabolismo lipídico, após alterações ocasionadas pelo tratamento das células com dimetil-sulfóxido. Uma concentração mais elevada de silimarina (150 μM) conduz as LX-2 para um acúmulo de ácidos graxos e triglicerídeos. Mas modelos de co-cultivos entre hepatócitos (HepG2) e LX-2 demonstram que essa é uma estratégia celular para restaurar a homeostase celular após o descontrole do metabolismo de lipídeos causados pelo DMSO. Em conclusão a silimarina apresenta efeitos positivos para a reversão do quadro fibrótico, além disso, seu potencial hepatoprotetor é confirmado. Sendo assim, a silimarina demonstra grande potencial para auxiliar em terapias voltadas ao tratamento da fibrose hepática.

Palavras-chave: planta medicinal, cultura de células, *Silybum marianum*, DMSO

ABSTRACT

Liver diseases are a serious health problem worldwide. Many chronic pathologies affect the liver and in common to these diseases, there are the appearance of the fibrotic process. The hepatic fibrosis is characterized by the deposition of scar tissue and changes in the extracellular matrix of the organ. The establishment of the fibrotic process occurs when hepatic stellate cells (HSCs) transdifferentiate from their quiescent to their activated phenotype. These activated cells are proliferative and synthesizes extracellular matrix elements. Characteristically the activated HSCs change their lipid metabolism losing the ability to store lipid droplets in their cytoplasm. Some authors proposes that the control of the lipid metabolism contributes to the reversal of the hepatic fibrosing process. Compounds obtained through plants can help in the treatment of liver diseases. In this context, the medicinal plant *Silybum marianum* is known for its medicinal effects. The set of compounds found in their fruits and seeds are known as silymarin. Silymarin has hepatoprotective, anti-inflammatory and anti-oxidative effects. The aim of the present study was to evaluate the cellular and molecular effects of silymarin in the hepatic stellate cell line (LX-2) and its potential for reversion of hepatic fibrosis and control of lipid metabolism. In addition, the effect of the compound on lipid metabolism was evaluated in a co-culture model between hepatic cells (HepG2) and LX-2. The results indicate that the concentration of 100 μM of silymarin acts as a regulator of the fibrotic process, reducing the pro-fibrotic signaling of LX-2 cells. This same concentration is able to restore the hoemostasis of the lipid metabolism, after changes caused by the treatment of the cells with dimethyl sulfoxide. A higher concentration of silymarin (150 μM) leads the LX-2 cells towards an accumulation of fatty acids and triglycerides. However, the co-culture models between hepatocytes (HepG2) and HSCs (LX-2) demonstrate this as a cellular strategy to restore cellular homeostasis after the imbalance in the lipid metabolism caused by DMSO. In conclusion, the silymarin has positive effects in the fibrotic reversion; in addition, its hepatoprotective potential is confirmed. Thus, silymarin shows great potential to assist in therapies aimed at the treatment of hepatic fibrosis.

Key words: medicinal plant, cell culture, *Silybum marianum*, DMSO

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACADM:** acil-CoA desidrogenase
- ACAT1:** acil-CoA acetil transferase
- ACC** ou **ACAC:** acetil-CoA carboxilase
- ACLY:** ATP citrato liase
- ACSL:** acetil-CoA sintase de cadeia longa
- AGs:** ácidos graxos
- CEHs:** Células estreladas hepáticas
- CES:** Células endoteliais sinusoidais
- COX:** ciclooxigenase
- CPT-1:** carnitina palmitoil transferase 1
- CS:** citrato sintase
- CTGF:** fator de crescimento de tecido conectivo
- DAPI:** 4'-6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato
- DMSO:** Dimetil-sulfóxido
- EGF:** fator epidermal de crescimento
- EHHADM:** enoil-CoA hidratase
- EROs:** Espécies reativas ao oxigênio
- FASN:** ácido graxo sintase
- FGF2:** fator de crescimento de fibroblastos 2
- FOXO:** *forkhead box O*
- HADHB:** β -hidroxiacil-CoA desidrogenase
- HepG2:** células de hepatocarcinoma
- IL-4:** interleucina
- LD:** Gotículas lipídicas
- MCD** ou **MLYCD:** malonil-CoA carboxilase
- MEC:** Matriz extracelular
- MMP:** metaloproteinases
- MTT:** Brometo Tiazolil Azul De Tetrazolio
- NRF2:** fator nuclear eritroide-2

PBS: tampão salino-fosfatado

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGF β R: receptor β de PDGF

PPAR: proliferador de peroxissomo

SBF: soro bovino fetal

SREBP-1: fator de transcrição regulador de esteróis

TGF- β : fator de crescimento transformador β

TIMPs: Inibidores de metaloproteinases

TRAIL: receptores de morte como o ligante indutor de apoptose

α -SMA: alfa-actina de músculo liso

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	09
1.1 O fígado e sua arquitetura celular	09
1.2 Fibrose hepática e seus elementos	10
1.3 Células estreladas hepáticas e seu processo de ativação	11
1.4 Células estreladas hepáticas na resolução da fibrose	13
1.5 O metabolismo lipídico e sua atuação no controle da fibrose hepática.....	15
1.6 Cultura de células e co-cultivo como modelo de avaliação do metabolismo de lipídeos no controle da fibrose	19
1.7 Plantas medicinais: doenças hepáticas e o potencial da silimarina no controle da fibrose	20
REFERÊNCIAS	24

CAPÍTULO I. Silimarina protege células estreladas hepáticas (LX-2) de estresse gerado por dimetil-sulfóxido, reduz sinalização pró-fibrótica e modula metabolismo de lipídeos	32
Resumo	32
Abstract	33
1. Introdução	34
2. Material e métodos	35
2.1 Cultura de células	35
2.2 Tratamento com silimarina e desenho experimental	35
2.3 Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade	36
2.4 Microscopia de fluorescência e contraste de fase.....	37
2.5 Rastreamento de ácidos graxos fluorescentes	37
2.6 Extração de RNA total e PCR em tempo real	38
2.7 Mensuração de triglicerídeos totais	39
2.8 Quantificação de ácidos graxos via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)	39
2.9 Western blot.....	39
2.10 Análises dos dados	40
3. Resultados	40
3.1 Silimarina controla o estresse celular gerado por dimetil-sulfóxido e reduz a sinalização pró-fibrogênica nas células LX-2	40
3.2 Silimarina reverte efeito de redução lipídica causada pelo dimetil-sulfóxido e conduz a linhagem de células LX-2 para um acúmulo de ácidos graxos e triglicerídeos	41
3.3 A silimarina de maneira diferencial reduz oxidação de ácidos graxos geradas pelo DMSO	42
3.4 Silimarina provoca um aumento na expressão de genes de síntese lipídica e opostamente reduz genes de oxidação lipídica na linhagem LX-2.....	43
4 Discussão	44
Agradecimentos	47
Legenda das figuras	47
Figuras	49
Tabela	54

Referências	55
CAPÍTULO II. Silimarina retorna metabolismo de lipídeos à homeostase em co-cultivo de células hepáticas (HepG2) e CEHs (LX-2) controlando efeito de acúmulo de ácidos graxos ocasionado pelo DMSO	60
Resumo	60
Abstract.....	61
1. Introdução	62
2. Métodos	63
3. Resultados	64
3.1 LX-2 modula o metabolismo lipídico do co-cultivo: silimarina e DMSO possuem efeitos antagônicos	64
3.2 Silimarina retorna atividade transcricional à homeostase no co-cultivo	64
4. Discussão	65
Legenda da Figura.....	67
Figura.....	68
Referências	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

INTRODUÇÃO

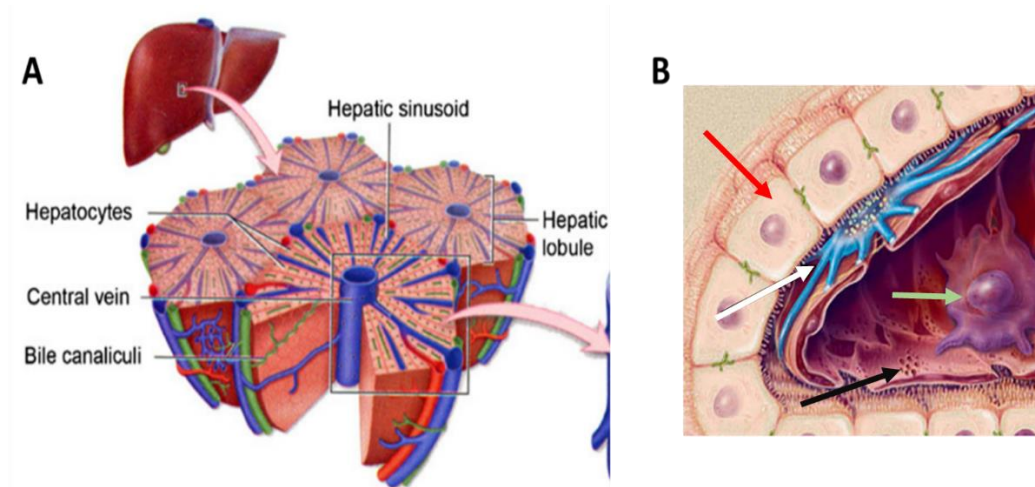
1.1 O fígado e sua arquitetura celular

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e anatomicamente é constituído por quatro lobos. O órgão desempenha funções metabólicas como síntese, secreção de bile e proteínas, quebra de substâncias tóxicas e armazenamento de vitaminas (BETTS, 2013). A unidade básica estrutural e funcional que compõe o fígado é denominada de lóbulo. Os lóbulos são estruturas hexagonais compostos pelas diversas células encontradas no órgão e irrigados pelas veias, artérias e dutos biliares (ISHIBASHI et al., 2009) (Figura 1A).

O principal tipo celular que compõe o órgão são os hepatócitos (células do parênquima hepático), que possuem formato poliédrico sendo ricos em mitocôndrias e retículos endoplasmáticos. Cada hepatócito é encontrado em contato com diversos outros e com as paredes dos sinusoides. Essas características celulares, favorecem com que os hepatócitos desempenhem suas funções secretoras, metabólicas e endócrinas. Dentre essas funções, se destacam a metabolização de substâncias tóxicas como álcool e síntese de glicose, por meio da gliconeogênese (POTTER, 2018).

Outras células são residentes no órgão e compreendem as não-parenquimatosas: (1) as células de *Kupffer* são os macrófagos que residem no sinusóide do órgão em proximidade com as células endoteliais (Figura 1B). Essas células possuem como função a fagocitose de partículas como bactérias, secreção de moléculas reguladoras do sistema imune e remoção de células senescentes. (2) As células endoteliais sinusoidais (CES) contribuem para a formação das paredes dos sinusoides hepáticos, moldando o sistema vascular endotelial no órgão e formando uma interface entre o fluxo sanguíneo e os outros tecidos (Figura 1B). Morfologicamente, as CES possuem uma descontinuidade em sua membrana, chamada de fenestras e não possuem membrana basal o que contribui para a difusão rápida dos metabólitos dos vasos sanguíneos para os hepatócitos. Essas células, também agem como barreira retendo as células sanguíneas nos vasos (POISSON et al., 2017). (3) As células estreladas hepáticas (CEHs) são encontradas no espaço de Disse, entre os hepatócitos e as células endoteliais sinusoidais (Figura 1B). Em estados fisiológicos, as células armazenam gotículas de lipídeos ricos em retinol no seu citoplasma. As CEHs contribuem para a produção de matriz extracelular no fígado secretando diversos tipos de colágenos. Essas células, atualmente, são consideradas as principais células envolvidas no processo de fibrose hepática.

Figura 1 – Representação histológica do fígado



(A) Representação do lóbulo hepático (STENVALL et al., 2014); (B) Tipos de células encontradas no fígado. Seta vermelha: hepatócitos. Seta branca: células estreladas hepáticas. Seta verde: Células de *Kupffer*. Seta preta: Células endoteliais sinusoidais (FRIEDMAN, 2008).

1.2 Fibrose hepática e seus elementos

As doenças hepáticas foram elencadas como a 12^a causa de morte no ano de 2014, sendo consideradas um problema de saúde mundial (ARAÚJO et al., 2018; KOCHANNEK et al., 2016). Diversas são as causas das doenças hepáticas, mas, em geral, o abuso de álcool, infecções virais e disfunções metabólicas como o consumo excessivo de gordura são responsáveis pelo desenvolvimento de complicações hepáticas (TRAUTWEIN et al., 2015). No Brasil, 28.337 mortes foram registradas no ano de 2015 relacionadas ao abuso etílico (MELO et al., 2017). Embora, diversas sejam as etiologias das doenças hepáticas como característica comum a essas patologias há a ocorrência do processo de fibrose.

A fibrose hepática é caracterizada como uma resposta do órgão frente a lesões crônicas que desencadeiam mecanismos de cicatrização. Esses mecanismos de cicatrização remodelam de maneira particular a matriz extracelular (MEC) do fígado. Em um estado saudável, a MEC apresenta substâncias fibrosas e gelatinosas como glicoproteínas, integrinas e colágenos. Essas moléculas são responsáveis por dar coesão e unir tecidos. Caracteristicamente, no estabelecimento da fibrose ocorre um desequilíbrio na síntese e degradação de componentes da MEC, gerando uma hiperplasia de tecido fibroso cicatricial depositado (JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

Após um estímulo inicial persistente, o estabelecimento da fibrose é sucedido através de uma complexa rede de sinalização. Essa deposição contínua de tecido cicatricial pode conduzir o órgão a perda progressiva de tecido parenquimal e subsequentemente a necrose do tecido. Em estágios avançados da lesão hepática, há um comprometimento das funções do fígado podendo

ocorrer o desenvolvimento de cirrose ou hepatocarcinoma (WALLACE; FRIEDMAN, 2014). Atualmente, sabe-se que é possível reverter o processo de fibrose hepática, mas ainda não há um tratamento eficaz que não seja a retirada do estímulo agressor (BONIS; FRIEDMAN; KAPLAN, 2001; LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015).

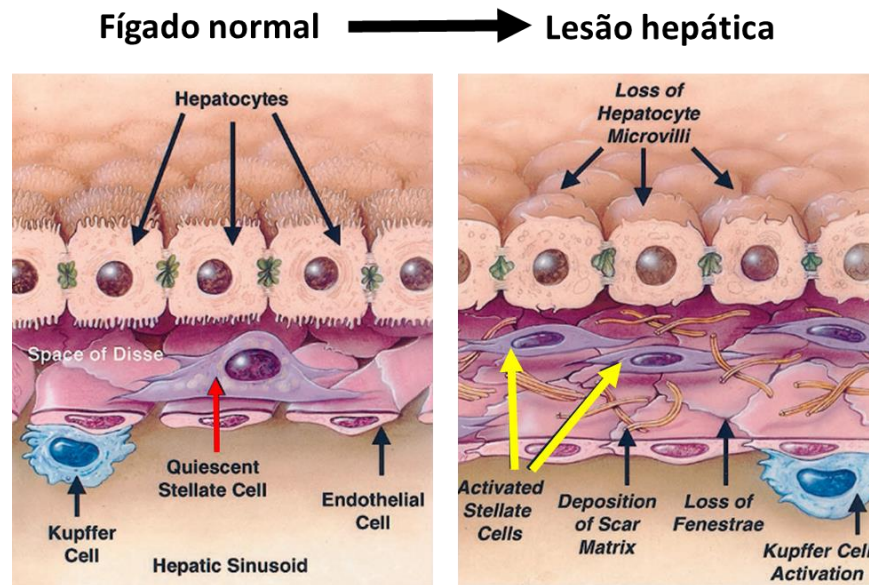
A instalação do processo fibrótico faz com que as diversas células hepáticas respondam de maneira diferenciada aos estímulos que culminam no dano no tecido hepático. Após lesões hepáticas, o processo de recuperação do órgão estimula os hepatócitos mantidos em fase G0 a elevar suas taxas de proliferação (NEVZOROVA; TRAUTWEIN, 2015; YIN et al., 2018). Hepatócitos lesionados iniciam processos de necrose e liberam moléculas como citocinas. Essas moléculas, são responsáveis por mediar processos pró-inflamatórios, aumentar a proliferação celular e elevar o recrutamento de células em uma região (CONG et al., 2012). Durante a lesão hepática, as células de *Kupffer* tem sua atividade elevada sendo consideradas a principal população celular produtora de espécies reativas ao oxigênio (EROs). Esse aumento de EROs, gera estresse oxidativo nas células o que estimula a produção e secreção de citocinas, amplificando a sinalização pró-inflamatória.

Apesar dos hepatócitos e as células de *Kupffer* constituírem a maior parte do volume celular do fígado, essas são responsáveis somente pela sinalização parácrina pró-inflamatória e pró-fibrogênica ocorrida no contexto da fibrose hepática. Essas células não são as principais responsáveis pelo remodelamento da MEC o qual é o principal fator agravante da fibrose. Nesse sentido, nos últimos anos, foi atribuído às células estreladas hepáticas o papel de principais responsáveis pela progressão da fibrose.

1.3 Células estreladas hepáticas e seu processo de ativação

No fígado saudável, as células estreladas hepáticas (CEHs) são encontradas nos espaços perisinusoidais e têm a capacidade de armazenar gotículas de lipídeos repletas de triglicerídeos, ésteres de colesterol e também ésteres de retinil, principal fonte precursora da vitamina A quando no seu estado quiescente (Figura 2) (BLANER et al., 2009; D'AMBROSIO, 2011; GEERTS, 2001). Após estímulos fibrogênicos, as CEHs atuam diretamente no desenvolvimento da fibrose se transdiferenciando para um fenótipo proliferativo e migratório, amplificando a síntese de compostos da MEC e perdendo suas gotículas de lipídeos (REEVES, 2002). O processo de ativação acontece devido a uma cascata de eventos pró-fibróticos e inflamatórios inicialmente derivados de células vizinhas lesionadas, que geram sinais parácrinos. Os eventos celulares e moleculares do processo de ativação são altamente orquestrados e estão divididos em duas fases: a iniciação e a perpetuação (Figura 2).

Figura 2 – Esquema representativo da alteração de fenótipo das células esteladas hepáticas (CEHs).



No fígado saudável as CEHs se encontram em seu fenótipo quiescente armazenadora de gotículas de lipídeos (seta vermelha). Após lesões e sinalizações fibrogênicas as CEHs transdiferenciam para seu estado ativado proliferador e sintetizador (setas amarelas). (FRIEDMAN, 2000).

Na fase de iniciação, ocorrem mudanças no perfil de expressão de genes das células, o que geram as mudanças morfológicas e as tornam responsivas à fatores pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). As principais moléculas reconhecidas por induzir essas sinalizações são: (1) a família de citocinas do fator de crescimento transformador β (TGF- β), que inicialmente é responsável por estimular um ambiente pró-inflamatório o que amplifica a síntese de colágenos e inibe a expressão de proteases que degradam e controlam elementos da MEC; e (2) o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que é a principal molécula responsável pela proliferação da célula estrelada, aumentando o número de células fibrogênicas e sintetizadoras (BORKHAM-KAMPHORST; WEISKIRCHEN, 2016; PINZANI, 2002; YOSHIDA; MATSUZAKI, 2012).

Durante a fase de perpetuação, as CEHs alteram de maneira sistêmica seu comportamento celular, tornando-se células mais contráteis, proliferativas e sintetizadoras (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Nesse processo de fibrogênese, o colágeno é o principal componente depositado pelas CEHs e é controlado por uma família de genes como *colla1* e *colla2*. Ainda nesse contexto, em um fígado saudável há um controle na deposição e degradação de compostos da MEC, através de uma família de proteínas denominadas metaloproteinases (MMP) e de proteínas que inibem suas atividades (TIMPs). Durante a lesão hepática, além da deposição do

colágeno como citado, há uma redução na função das MMPs facilitando a deposição de tecido cicatricial (BORKHAM-KAMPHORST; WEISKIRCHEN, 2016). Além disso, como as células se tornam mais contráteis elas passam a produzir alfa-actina de músculo liso (α -SMA), o que confere um maior potencial contrátil para a célula, e ainda, essa molécula é caracteristicamente usada como um marcador do processo de ativação das CEHs. Durante a perpetuação, as células estreladas hepáticas passam a produzir e secretar esses fatores pró-fibróticos e pró-inflamatórios favorecendo a continuidade da sinalização fibrótica (GANDHI, 2017).

Como as células estreladas hepáticas são consideradas centrais no processo fibrogênico, diversos estudos propõem maneiras de reverter a fibrose, através de mecanismos que controlem a ativação das células ou que as revertam para seu fenótipo quiescente. É explorado também, mecanismos que induzam a apoptose ou senescência em células que já estejam em seu fenótipo ativado (NISHIZAWA et al., 2016; PANEBIANCO et al., 2016; WU et al., 2015).

1.4 Células estreladas hepáticas na resolução da fibrose

Durante mais de 30 anos de pesquisa sobre a patofisiologia da fibrose hepática, nenhuma droga ou terapia foi apresentada de maneira eficaz. Existem limitações que dificultam o tratamento da fibrose, como por exemplo, a alteração na estrutura do órgão ocasionada pela excessiva deposição de compostos da MEC. Essa rede entrelaçada de colágenos e outras moléculas como elastinas dificulta a entrega de drogas e moléculas terapêuticas (BÖTTCHER; PINZANI, 2017). Contudo, modelos de estudos animais e ensaios clínicos demonstram que a fibrose hepática pode ser revertida (ELLIS; MANN, 2012; SUN; KISSELEVA, 2015).

Como elucidado anteriormente, as CEHs possuem papel central no desenvolvimento da fibrose hepática. A retirada do estímulo agressor no fígado promove o retorno de grande parte da população de CEHs ao seu fenótipo quiescente (EL TAGHDOUINI et al., 2015; KISSELEVA et al., 2012). Na última década, estão sendo sugeridas maneiras de controlar o processo de ativação dessas células como possível maneira de auxiliar a reversão da fibrose hepática. Foi proposto recentemente, o controle da via metabólica Wnt/ β -catenina e outros elementos correlatos a sua via de sinalização como facilitador do retorno das CEHs para o seu fenótipo quiescente reduzindo a síntese de citocinas e colágenos (XU et al., 2018; YU et al., 2019). A via da β -catenina é conhecida por estar associada há diversas funções fisiológicas do fígado como a proliferação celular, e é descrito que CEHs ativadas apresentam grandes quantidades dessa molécula (GE et al., 2014). Além da via Wnt/ β -catenina outras conexões metabólicas podem ser exploradas no processo de transdiferenciação das CEHs. A expressão ectópica do fator epidermal de crescimento (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos 2

(FGF2), por exemplo, quando associados com uma suplementação com retinol conduziram as CEHs à um fenótipo mais próximo do quiescente (EL TAGHDOUINI et al., 2015). Outras pesquisas para a resolução dos estímulos pró-fibrogênicos propõem a indução de mecanismos de apoptose nas CEHs ativadas. O processo de apoptose é uma maneira de controle celular que através de estímulos extrínsecos ou intrínsecos levam à morte celular. As CEHs quando ativadas aumentam o número de receptores de morte, como o ligante indutor de apoptose (TRAIL). Em um modelo animal de fibrose hepática, através de injeções intravenosas de uma molécula recombinante associada a polietilenoglicol e TRAIL, foi observado uma redução no número de CEHs ativadas melhorando o quadro fibrótico (OH et al., 2016). Além da indução da morte celular, a ativação do sistema imune pode facilitar a remoção de CEHs senescentes e contribuir para uma melhora nos aspectos da fibrose hepática (GAO; RADAIEVA; PARK, 2009). O processo de senescência é um mecanismo celular que restringe a divisão celular, prevenindo o acúmulo de células com danos genéticos. Os linfócitos NK e NKT são um grupo de células presentes no sistema de defesa do órgão e sabe-se que essas células se ativam na presença de citocinas e respondem ao aumento de IFN- γ , o que pode conduzir à morte de CEHs. Bansal et al., (2011) observaram que CEHs ativadas apresentam um aumento nos níveis de PDGF e seus receptores, o que os conduziu a desenvolver uma nano-partícula capaz de carrear IFN- γ às CEHs, pela ligação ao receptor β de PDGF (PDGF β R). Essa associação de moléculas demonstrou a capacidade de reduzir a presença de CEHs ativadas e melhorando o quadro fibrótico (BANSAL et al., 2011).

Novas abordagens ainda continuam sendo investigadas para o controle do processo de ativação das CEHs. Pesquisas realizadas nos últimos anos estão se focando no controle do metabolismo energético das células estreladas hepáticas através de vias conhecidas como AKT/mTOR (LI et al., 2018b; WEI et al., 2018). Dentre essas abordagens, foi visto que o bloqueio do metabolismo de piruvato é capaz de reduzir a presença de α -SMA e secreção de colágenos através de uma redução na atividade mitocondrial, em específico, na enzima ATP5 (KARTHIKEYAN et al., 2016). Outro trabalho sugere que, durante o processo de transdiferenciação, as CEHs adotam diferentes estratégias para a obtenção de energia e que o controle da via metabólica do glutamato através da sinalização da via *hedgehog* é capaz de reduzir a ativação das CEHs (DU et al., 2018).

1.5 O metabolismo lipídico e sua atuação no controle da fibrose hepática

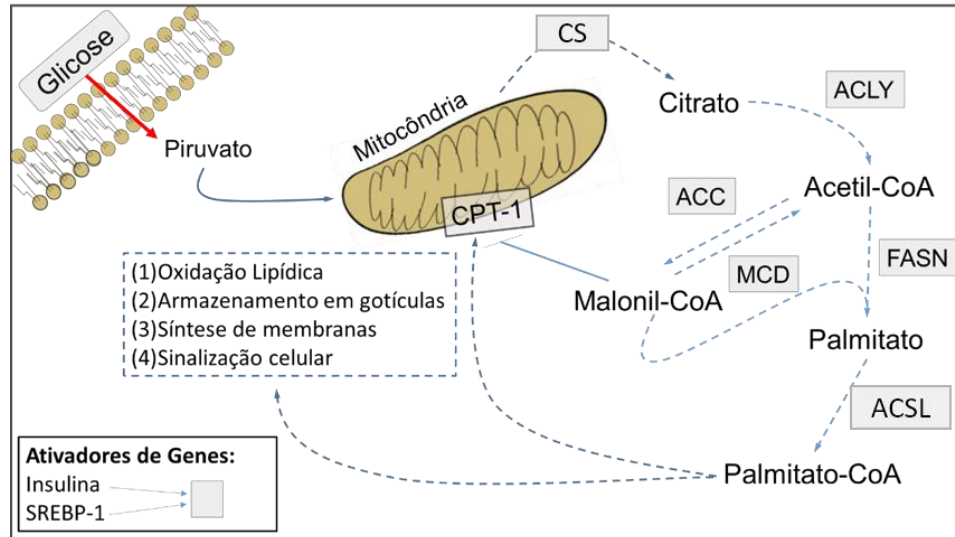
O metabolismo de lipídeos se apresenta como uma maneira complementar para as CEHs obter energia para seu processo de ativação durante estímulos fibrogênicos. Nesse tópico, será aprofundada a discussão sobre o metabolismo de lipídeos, de sua síntese à oxidação. Além disso, é demonstrado resumidamente o estado da arte em relação a investigação da atuação desse metabolismo no controle do processo fibrótico.

O metabolismo de lipídeos é essencial para os organismos, atuando na geração de energia, síntese de moléculas de sinalização e formação de membranas celulares. Existem diversas categorias de lipídeos que abrangem diversas funções, como: os fosfolipídios que constituem as membranas; triglicerídeos que podem ser usados como fonte de energia; colesterolis que auxiliam a síntese de hormônios (HARAYAMA; RIEZMAN, 2018; VANCE; VANCE, 2002). E para a obtenção desses ácidos graxos (AGs) no organismo existem duas vias: uma pela alimentação onde as células utilizam lipídeos disponíveis na circulação ou pela síntese *de novo* de ácidos graxos (JO et al., 2016).

Basicamente, a síntese *de novo* é a geração de um ácido graxo através de um substrato inicial em uma sequência de adições de carbono até a formação da molécula. Sendo assim, algumas enzimas e processos bioquímicos se destacam: O início da síntese *de novo* ocorre na presença de citrato, que é metabolizado pela enzima citrato sintase (CS) e gerado como subproduto da fosforilação oxidativa. A enzima ATP citrato liase (ACLY), produz acetil-CoA através da quebra do citrato, que desencadeia a síntese *de novo* de ácidos graxos (TESSARI et al., 2009). O acetil-CoA, em reação de carboxilação (adição de um carbono) é transformado em malonil-CoA, pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC ou ACAC). Quando altas concentrações de malonil-CoA são sintetizadas, a proteína malonil-CoA descarboxilase (MCD ou MLYCD) catalisa uma reação reversa à ACC, produzindo novamente acetil-CoA. Além disso, elevadas concentrações de malonil-CoA inibem alostericamente a proteína carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), que se encontra na membrana da mitocôndria e é responsável pelo transporte de ácidos graxos para o interior da organela iniciando processos energéticos β -oxidativos. Essa inibição, garante a continuação das reações de esterificação que levam à produção de um AG. Para que ocorra a síntese lipídica, o complexo enzimático ácido graxo sintase (FASN) é ativado, sendo responsável por catabolizar a reação de ligação entre acetil-CoA ou malonil-CoA, gerando principalmente palmitato. Para que os AGs gerados entrem nos ciclos bioativos a família de enzimas acetil-CoA sintase de cadeia longa (ACSL) adicionam um grupo acetil-CoA aos AGs formados. Esses ácidos graxos sintetizados, podem ser conduzidos

para a formação de moléculas sinalizadoras, armazenadas em gotículas de lipídeos ou oxidados para geração de energia (SANDERS; GRIFFIN, 2016)(Figura 3).

Figura 3 – Esquemática da síntese *de novo* de ácido graxo.

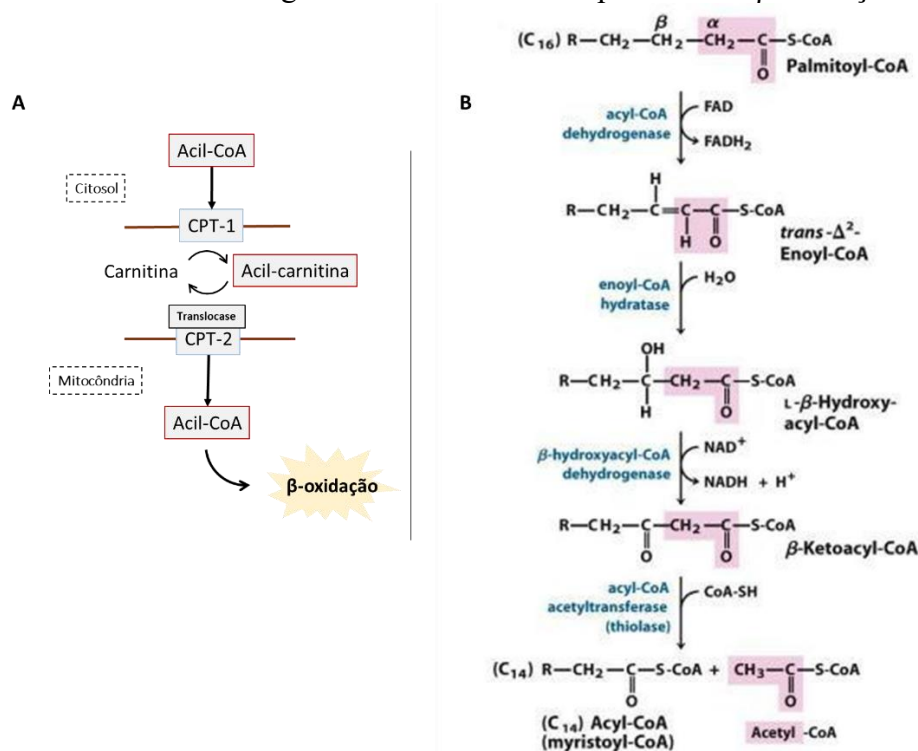


O citrato, derivado da mitocôndria é convertido em acetil-CoA e transformado em malonil-CoA. A enzima FASN é responsável pela síntese dos ácidos graxos, gerando palmitato. CS: citrato sintase; ACLY: ATP citrato liase; ACC: acetil-CoA carboxilase; MCD: malonil-CoA carboxilase; CPT-1: carnitina palmitoil transferase 1; FASN: ácido graxo sintase; ACSL: acetil-CoA sintase de cadeia longa. Elaborado pelo autor.

A demanda energética celular pode fazer com que ácidos graxos sejam utilizados no processo de geração de ATP, através da β -oxidação. Para que isso ocorra, AGs ativados pela adição de grupamentos acetil-CoA podem ser metabolizados na matriz mitocondrial. A oxidação lipídica se dá, pela retirada sucessiva de uma dupla de carbonos da cadeia do ácido graxo. Como esse processo ocorre dentro da mitocôndria, há processo ativo de transporte de moléculas para a matriz da organela, visto que moléculas de ácidos graxos de cadeia longa, não são permeáveis a membrana da organela. Para que se inicie então a β -oxidação, o ácido graxo-CoA, é associado à carnitina, através da enzima CPT-1. Além disso, outra proteína dessa família a CPT-2, tem o papel de auxiliar nesse transporte do ácido graxo para a matriz mitocondrial (Figura 4A). A quebra dos ácidos graxos, até chegar ao produto final acetil-CoA, ocorre através de 4 reações sequenciais (Figura 4B): O primeiro dos passos é a quebra do acil-CoA para enoil-CoA, com a transferência dos hidrogênios dessa reação ao cofator FAD, o qual é reduzido para FADH₂, esse processo é mediado pela enzima acil-CoA desidrogenase (ACADM). O segundo passo da reação ocorre a adição de uma molécula de água e há a formação de 3-hidroxiacil-CoA através da reação enzimática da enoil-CoA hidratase (EHHADM). No terceiro passo, a

molécula produzida é oxidada resultando em uma beta cetoacil-CoA e NADH mediados pela enzima a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (HADHB). O último passo das reações bioquímicas é a interação da molécula formada com uma CoA-livre, esse, é catalisado pela acil-CoA acetil transferase (ACAT1). Essas reações então, separam dois átomos de carbono da cadeia original do ácido graxo, gerando o acetil-CoA. Por fim, os elétrons provenientes das etapas iniciais e o acetil-CoA metabolizados no ciclo do citrato, fornecem as matérias-primas para que as células produzam ATP através da fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2014; TALBOT, 2008).

Figura 4 – Entrada de ácidos graxos na mitocôndria e processo de β -oxidação



(A) Entrada do Acil-CoA na mitocôndria para iniciar processos β -oxidativos. (B) Representação das reações bioquímicas que acontecem durante a β -oxidação. (NELSON; COX, 2014)

Durante o processo fibrosante, como já apresentado, as CEHs passam por um processo de transdiferenciação se tornando mais proliferativas, sintetizadoras de compostos da MEC e com maior contratilidade. Para que isso ocorra existe demanda energética, para a síntese de novas membranas e elementos da MEC e também para o remodelamento de seu citoesqueleto. Como exposto, durante o processo de ativação as CEHs perdem gradualmente a capacidade de armazenar suas gotículas lipídicas e retinol (BOBOWSKI-GERARD et al., 2018) e cogita-se que esse mecanismo fisiológico celular se correlacione com a demanda energética. Embora, ainda não esteja claro, se a perda das gotículas são causas ou consequências do processo

fibrosante (YONEDA et al., 2016). Autores sugerem que a degradação das gotículas podem contribuir para a obtenção da energia necessária (HERNÁNDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2012). Estudos descrevem que o perfil de ácidos graxos nessas células é alterado durante o processo de transdiferenciação, e é descrito um aumento nos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e fosfolipídios (MOLENAAR; VAANDRAGER; HELMS, 2017; TESTERINK et al., 2012), redução significativa nos níveis de retinol e aumento nos níveis de triglicerídeos nas gotículas (GRASSELLI et al., 2016; TESTERINK et al., 2012). Outra característica comum às CEHs ativadas é a redução nos níveis de fatores de transcrição relacionados com processos adipogênicos e lipogênicos como proliferador de peroxissomo (*ppars*) e fator de transcrição regulador de esteróis (*srebp-1*) (TSUKAMOTO, 2005; WAHLI; MICHALIK, 2012). Além disso, considerando-se que esses processos celulares, requerem energia, estudos apontam uma elevada atividade mitocondrial para a geração de ATP, e recentemente, foi observado que as células fibrogênicas apresentam uma “assinatura bioenergética” diferencial em relação as quiescentes, com: (1) maior número de mitocôndrias; (2) elevada taxa basal de consumo de oxigênio; (3) aumento na produção de ATP e (4) alterações no potencial de membrana das mitocôndrias (BAE et al., 2017; GAJENDIRAN et al., 2018).

Essas alterações no metabolismo lipídico das células podem ter implicações negativas, ocasionando a progressão da fibrose hepática. A elevada taxa metabólica das CEHs ativadas aumenta o fluxo de ácidos graxos livres no fígado o que pode gerar um ambiente lipotóxico. A atividade mitocondrial necessária para manter esses processos pode gerar espécies reativas ao oxigênio. Além disso, um aumento nos números de mitocôndrias pode favorecer processos de fissão ou fusão das organelas, que em um contexto patológico pode ser descontrolado e gerar um ambiente citotóxico (MANSOURI; GATTOLLIAT; ASSELAH, 2018). Ainda, o aumento nos níveis de triglicerídeos característico das CEHs ativadas pode contribuir para surgimento de outras patologias do fígado como a esteatose.

Frente a essas observações, torna-se evidente que o controle desse metabolismo pode contribuir para a reversão do quadro fibrótico. Nos últimos anos, diferentes autores demonstraram maneiras de alterar o metabolismo lipídico dessas células para controlar o processo de fibrogênese (JO et al., 2016; WURIE; BUCKETT; ZAMMIT, 2012). Experimentalmente, foi visto que a expressão ectópica de fatores de transcrição como PPAR γ e SREBP-1, favorecem o retorno das CEHs para um fenótipo próximo ao encontrado em quiescência (HAZRA et al., 2004; SHE et al., 2005). Além disso, o tratamento com vitamina A e insulina favorecem o retorno das CEHs para um estado quiescido controlando a via metabólica de JAK2/STAT5 e normalizando os níveis proteicos de genes adipogênicos como SREBP-1

(YONEDA et al., 2016). O controle nos níveis de triglicerídeos e aumento nos níveis de retinol é uma maneira ao qual pode se haver a reversão da fibrose hepática (BLANER, 2019; PANEBIANCO et al., 2017). Outro estudo demonstra que a inibição da atividade mitocondrial de maneira moderada utilizando o peptídeo natural Valinomicina, é capaz de reduzir a ativação da CEHs e a sinalização pró-inflamatória do TGF- β (SAKAI; SHIMIZU; MORIWAKI, 2014). Mais recentemente, o tratamento com o hormônio melatonina, que está relacionado com o ciclo circadiano e controle energético demonstrou em CEHs a capacidade de restaurar a níveis fisiológicos as atividades enzimáticas associadas à cadeia respiratória mitocondrial, inibindo a ativação das CEHs (DAS et al., 2017).

Baseado nessas informações, pode-se sugerir que moléculas que controlem o metabolismo de lipídeos das CEHs possam auxiliar na descoberta de terapias inovadoras que controlem e/ou revertam os quadros de fibrose hepática.

1.6 Cultura de células e co-cultivo como modelo de avaliação do metabolismo de lipídeos no controle da fibrose

Para entender os efeitos mecanísticos de compostos em uma via metabólica como a de síntese de lipídeos, o sistema de cultivo de células se destaca visto a facilidade de isolar um único tipo de célula. Como destacado anteriormente, as CEHs atuam diretamente no desenvolvimento da fibrose se transdiferenciando para seu fenótipo ativado e muitos estudos atualmente vem sendo realizado com essas células (GUPTA; KHADEM; UZONNA, 2018; HONG et al., 2018; KIAGIADAKI et al., 2018). Muitas limitações existiam para a realização de estudos com CEHs, pois inicialmente eram utilizadas células de camundongos, ratos ou células primárias isoladas de tecidos o que dificultava a reprodutibilidade das análises. Entretanto, com o estabelecimento da linhagem CEH LX-2 por Xu et al., (2005), vários estudos, estudos moleculares e bioquímicos correlatos a modulação da fibrose hepática vêm sendo desenvolvidos. Essa linhagem imortalizada apresenta a característica de responder rapidamente a estímulos de estresse se transdiferenciando de um estado de quiescência para um estado ativado. Em cultura, as células LX-2 apresentam a capacidade de se transdiferenciarem através de alterações nas concentrações de soro bovino fetal (SBF). Onde, células na presença de altas concentrações de SBF (10%) alteram seu metabolismo e sua morfologia para um fenótipo próximo ao encontrado nas CEHs ativadas; enquanto, que baixas concentrações de SBF (2%) trazem as células para um fenótipo próximo ao encontrado em CEHs quiescente assim como nas linhagens primárias extraídas de explantes animais. Além disso, o metabolismo de lipídeos

nessa linhagem imortalizada apresenta diversas características em comum com as células primárias.

Na tentativa de se avaliar de maneira mais aprofundada os efeitos de compostos no controle da fibrose o co-cultivo celular vem se destacando. Sabe-se que a utilização de um sistema de cultura com múltiplas células apresenta a vantagem de simular o microambiente celular com interações célula à célula (MIKI et al., 2012). Nesse contexto, estudos apontam que moléculas derivadas de hepatócitos podem induzir o processo de ativação das células estreladas hepáticas através de uma sinalização parácrina (HEANEY et al., 2016; SVEGLIATI-BARONI; DE MINICIS; MARZIONI, 2008), conduzindo ao aumento da produção de elementos pró-fibrogênicos como elementos da MEC (colágenos e metaloproteinases) (GIRAUDI et al., 2015; THERET et al., 1997). Reforçando essas observações, Povero et al., (2015), demonstraram que a sinalização de células de hepatoma (HepG2) co-cultivadas com CEHs diminuem a expressão do gene proliferador de peroxissomo-gama (*PPAR γ*), destacado anteriormente como central em processos de ativação das CEHs e modulação do metabolismo de lipídeos. Sendo assim, de maneira simples o co-cultivo entre células auxilia a validação de mecanismos bioquímicos identificados em monocultura. Nesse trabalho, esses modelos de estudo auxiliaram na avaliação do efeito do composto testado e na elucidação de seus mecanismos no ambiente pro-fibrosante.

1.7 Plantas medicinais: doenças hepáticas e o potencial da silimarina no controle da fibrose

Plantas medicinais são utilizadas historicamente no tratamento de diversas doenças. Os organismos vegetais por serem sésseis desenvolveram evolutivamente uma miríade de metabólitos para proteção ou comunicação entre espécies. Esses compostos podem possuir efeitos medicinais (BARTON; BOEGE, 2017; WISECAVER et al., 2017) e ao longo do tempo, percebeu-se o elevado impacto causado por plantas medicinais no bem-estar humano. A indústria farmacêutica obtém uma variedade de medicamentos derivados de plantas (DE LUCA et al., 2012) e na última década, diversos compostos ou produtos naturais foram propostos para o tratamento de doenças do fígado (YAO et al., 2016; YUAN et al., 2016). Em países em desenvolvimento estima-se que 80% da população já utilizou medicamentos derivados de plantas (SEN; SAMANTA, 2014). De maneira específica para a fibrose hepática, a curcumina, um pigmento natural da espécie *Curcuma longa* L. (Açafrão-da-terra) é descrita reduzindo a ativação das CEHs, modulando o metabolismo lipídico e balanceando a síntese e degradação de compostos da MEC (FARZAEI et al., 2018; TANG, 2015). Outras espécies conhecidas

como *Plectranthus barbatus* Andrews (Boldo) e *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Chá verde) e seus compostos ativos, são capazes de melhorar os aspectos da fibrose, reduzindo níveis de TGF β e inibindo a via metabólica *hedgehog* (EL-AGROUDY et al., 2016; WANG et al., 2015). Portanto, é indiscutível o potencial das plantas no tratamento de diversas doenças e na descoberta de novas terapias.

A planta *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Figura 5) pertence à família Asteraceae e é uma erva com flor arroxeadada e nervuras de aspecto leitoso em suas folhas. O fruto apresenta aproximadamente 5 mm, de cor castanha e lisa. Originalmente, a planta foi descoberta distribuída ao longo do sul da Europa até regiões próximas ao Mediterrâneo. A planta é popularmente conhecida e amplamente descrita na literatura científica pelos seus efeitos no tratamento de doenças associadas ao fígado (FEDERICO; DALLIO; LOGUERCIO, 2017). Essa planta introduzida no Brasil, é comumente encontrada em comércios na forma de extrato padronizado obtido de seus frutos e sementes, o qual é denominado silimarina. Dentre seus compostos, 70% são do grupo dos flavonoides, sendo os mais abundantes a silibinina (60-70%), silicristina (20%) e silidianina (10%) (CHAMBERS et al., 2017). Em pequena quantidade são encontrados também esteróis, lipídeos como o ácido graxo linoleico, açúcares e proteínas (BIJAK, 2017).

Figura 5 – A planta *Silybum marianum* (L.) Gaertn e suas flores.



Fonte: Site Ervanarium

A silimarina é descrita no fígado com ações anti-oxidativas capturando radicais livres produzidos, normalizando níveis de peroxidação lipídica através da inibição de NF- κ B em modelos celulares de esteatose hepática (VECCHIONE et al., 2016). Em modelos *in vivo* alimentados com uma dieta rica em lipídios é visto um aumento no peso corporal, intolerância à glicose e resistência à insulina. O tratamento com silimarina nesses animais reduziu os efeitos negativos da dieta diminuindo o estresse oxidativo gerado e melhorando a resistência à insulina (FENG et al., 2016). A silimarina então é sugerida por Colica e colaboradores (2017) como uma possível alternativa para o tratamento da esteatose hepática, visto que essa patologia está associada com o acúmulo de gordura no fígado. Outros trabalhos demonstram também, um efeito anti-inflamatório do composto em cultura de células hepáticas, através da inibição da via de sinalização de *forkhead box O* (FOXO) importante molécula regulatória de mecanismos de reparo ao estresse (LOVELACE et al., 2015). É descrito na literatura que a silimarina apresenta efeitos anti-proliferativos em hepatócitos e CEHs inibindo a via de sinalização *downstream* da proteína Akt (EZHILARASAN et al., 2016, 2017). Além disso, em pacientes com o vírus da hepatite C a silimarina administrada por via intravenosa em conjunto com a terapia convencional auxiliou na redução da carga viral (FERENCI et al., 2008). Outra aplicação da silimarina no contexto das doenças hepáticas é no tratamento de hepatocarcinomas. Em culturas de células de hepatocarcinoma (HepG2), foram observadas a capacidade da planta medicinal em reduzir a via metabólica *Notch* controlando assim aspectos antitumorais, reduzindo a migração celular e elevando a sinalização pró-apoptótica (ZHANG et al., 2013).

Nos últimos anos, alguns estudos vêm demonstrando efeitos da silimarina para o tratamento da fibrose hepática. Em modelos animais induzidos à fibrose com tetracloreto de carbono (CCL₄), o tratamento com a planta medicinal reduziu a presença do fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) reduzindo aspectos fibrogênicos e o estresse oxidativo (CLICHICI et al., 2015; TZENG et al., 2013). Em relação ao estresse oxidativo *in vivo* a silimarina reduz moléculas que podem iniciar essa resposta como o fator nuclear eritroide-2 (NRF2) (KIM et al., 2012). O composto natural, também demonstra a capacidade de reduzir a deposição de colágeno e reduzir os níveis de α -SMA em fígados lesionados de ratos (KIM et al., 2012). Especificamente nas CEHs ativadas, a silibinina um dos compostos presentes na silimarina é capaz de inibir a proliferação dessas células reduzindo os níveis da proteína cMyc, uma proteína relacionada com a progressão do ciclo celular (EZHILARASAN et al., 2016). Os efeitos anti-proliferativos da silimarina são igualmente regulados pela inibição da via Akt e suas moléculas a jusante, mas também pelo aumento da sinalização de p53/ p27 que induzem uma parada no ciclo celular (EZHILARASAN et al., 2017). A silimarina em modelos celulares

ainda demonstra a capacidade de reduzir os níveis de citocinas pró-fibrogênicas como a interleucina-4 (IL-4) e IL-13, IFN- γ e PDGF (MATA-SANTOS et al., 2014; TRAPPOLIERE et al., 2009). Outra característica observada da silimarina é o controle de vias pró-inflamatórias, inibindo a via da ciclooxigenase (COX) e a formação de ácido araquidônico (BIJAK; SALUK-BIJAK, 2017). Essas diversas características do extrato, favorecem o interesse para pesquisa atualmente, visto os diversos efeitos que a silimarina demonstra em doenças do fígado e em seu possível controle do metabolismo de lipídeos.

Devidamente apresentadas as motivações para a realização do trabalho e considerando-se a necessidade de entender melhor o potencial das plantas medicinais, o presente trabalho foi proposto e organizado além desta introdução em mais dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta um manuscrito à ser submetido para uma revista científica, sintetizando os resultados moduladores da silimarina nas CEHs (LX-2), no controle da fibrose hepática e no controle do metabolismo de lipídeos. O segundo capítulo demonstra a investigação dos efeitos da silimarina no metabolismo de lipídeos em co-cultivo de hepatócitos (HepG2) e CEHs (LX-2) revelando sua capacidade de hepatoproteção contra os efeitos tóxicos do DMSO.

Referências

- ARAÚJO, A. R.; ROSSO, N.; BEDOGNI, G.; TIRIBELLI, C.; BELLENTANI, S. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, v. 38, p. 47–51, 2018.
- BAE, M.; PHAM, T. X.; PARK, Y.-K.; LEE, J.-Y. Astaxanthin attenuated increased mitochondrial respiration and decreased glycolysis during the activation of hepatic stellate cells. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1, p. 170.7-170.7, 2017.
- BANSAL, R.; PRAKASH, J.; POST, E.; BELJAARS, L.; SCHUPPAN, D.; POELSTRA, K. Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 586–596, 2011.
- BARTON, K. E.; BOEGE, K. Future directions in the ontogeny of plant defence: understanding the evolutionary causes and consequences. **Ecology letters**, v. 20, p. 403–411, 2017.
- BETTS, J. G. Anatomy & physiology. Disponível em: <<https://openstax.org/subjects>>
- BIJAK, M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (silybum marianum l. Gaernt.)—chemistry, bioavailability, and metabolism. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1942, 2017.
- BIJAK, M.; SALUK-BIJAK, J. Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BLANER, W. S. Hepatic stellate cells and retinoids: toward a much more defined relationship. **Hepatology**, v. 0, n. 6, p. 1–3, 2019.
- BLANER, W. S.; O'BYRNE, S. M.; WONGSIRIROJ, N.; KLUWE, J.; D'AMBROSIO, D. M.; JIANG, H.; SCHWABE, R. F.; HILLMAN, E. M. C.; PIANTEDOSI, R.; LIBIEN, J. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 467–473, 2009.
- BOBOWSKI-GERARD, M.; ZUMMO, F.; STAELS, B.; LEFEBVRE, P.; EECKHOUTE, J. Retinoids issued from hepatic stellate cell lipid droplet loss as potential signaling molecules orchestrating a multicellular liver injury response. **Cells**, v. 7, n. 9, p. 137, 2018.
- BONIS, P. a; FRIEDMAN, S. L.; KAPLAN, M. M. Is liver fibrosis reversible? **The New England journal of medicine**, v. 344, p. 452–454, 2001.
- BORKHAM-KAMPHORST, E.; WEISKIRCHEN, R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 28, p. 53–61, 2016.
- BÖTTCHER, K.; PINZANI, M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 3-8 2017.
- CHAMBERS, C. S.; HOLEČKOVÁ, V.; PETRÁSKOVÁ, L.; BIEDERMANN, D.; VALENTOVÁ, K.; BUCHTA, M.; KŘEN, V. The silymarin composition... and why does it matter? **Food Research International**, v. 100, p. 339–353, 2017.
- CLICHICI, S.; OLTEANU, D.; NAGY, A.-L.; OROS, A.; FILIP, A.; MIRCEA, P. A. Silymarin inhibits the progression of fibrosis in the early stages of liver injury in ccl4-treated rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 3, p. 290–298, 2015.
- COLICA, C.; BOCCUTO, L.; ABENAVOLI, L. Silymarin: an option to treat non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 47, p. 8437–8438, 2017.

- CONG, M.; IWASAKO, K.; JIANG, C.; KISSELEVA, T. Cell signals influencing hepatic fibrosis. **International Journal of Hepatology**, p. 1–18, 2012.
- D'AMBROSIO, D. N. Physiology and pathophysiology of retinoid and lipid storage in mouse hepatic stellate cell lipid droplets. **Columbia University Academic Commons**, 2011.
- DAS, N.; MANDALA, A.; NAAZ, S.; GIRI, S.; JAIN, M.; BANDYOPADHYAY, D.; REITER, R. J.; ROY, S. S. Melatonin protects against lipid-induced mitochondrial dysfunction in hepatocytes and inhibits stellate cell activation during hepatic fibrosis in mice. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 4, p. e12404, 2017.
- DE LUCA, V.; SALIM, V.; ATSUMI, S. M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658–1661, 2012.
- DU, K.; HYUN, J.; PREMONT, R. T.; CHOI, S. S.; MICHELOTTI, G. A.; SWIDERSKA-SYN, M.; DALTON, G. D.; THELEN, E.; RIZI, B. S.; JUNG, Y.; DIEHL, A. M. Hedgehog-YAP signaling pathway regulates glutaminolysis to control activation of hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 154, n. 5, p. 1465–1479, 2018.
- EL-AGROUDY, N. N.; EL-NAGA, R. N.; EL-RAZEQ, R. A.; EL-DEMERDASH, E. Forskolin, a hedgehog signalling inhibitor, attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 22, p. 3248–3260, 2016.
- EL TAGHDOUINI, A.; NAJIMI, M.; SANCHO-BRU, P.; SOKAL, E.; VAN GRUNSVEN, L. A. In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 8, n. 1, p. 14, 2015.
- ELLIS, E. L.; MANN, D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1171–1180, 2012.
- EZHILARASAN, D.; EVRAERTS, J.; BRICE, S.; BUC-CALDERON, P.; KARTHIKEYAN, S.; SOKAL, E.; NAJIMI, M. Silibinin inhibits proliferation and migration of human hepatic stellate LX-2 cells. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, p. 1–8, 2016.
- EZHILARASAN, D.; EVRAERTS, J.; SID, B.; CALDERON, P. B.; KARTHIKEYAN, S.; SOKAL, E.; NAJIMI, M. Silibinin induces hepatic stellate cell cycle arrest via enhancing p53/p27 and inhibiting Akt downstream signaling protein expression. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v. 16, n. 1, p. 80–87, 2017.
- FARZAEI, M.; ZOBEIRI, M.; PARVIZI, F.; EL-SENDUNY, F.; MARMOUZI, I.; COY-BARRERA, E.; NASERI, R.; NABAVI, S.; RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 855, 2018.
- FEDERICO, A.; DALLIO, M.; LOGUERCIO, C. Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.
- FENG, B.; MENG, R.; HUANG, B.; SHEN, S.; BI, Y.; ZHU, D. Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. **Free Radical Research**, v. 50, n. 3, p. 314–327, 2016.
- FERENCI, P.; SCHERZER, T. M.; KERSCHNER, H.; RUTTER, K.; BEINHARDT, S.; HOFER, H.; SCHÖNIGER-HEKELE, M.; HOLZMANN, H.; STEINDL-MUNDA, P. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis c not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1561–1567, 2008.

- FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, p. 2247–2250, 2000.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 125–172, 2008.
- GAJENDIRAN, P.; VEGA, L. I.; ITOH, K.; SESAKI, H.; VAKILI, M. R.; LAVASANIFAR, A.; HONG, K.; MEZEY, E.; GANAPATHY-KANNIAPPAN, S. Elevated mitochondrial activity distinguishes fibrogenic hepatic stellate cells and sensitizes for selective inhibition by mitotrophic doxorubicin. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 2210–2219, 2018.
- GANDHI, C. R. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 5, p. 1104–1105, 2017.
- GAO, B.; RADAIEVA, S.; PARK, O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 3, p. 513–528, 2009.
- GE, W.-S.; WANG, Y.-J.; WU, J.-X.; FAN, J.-G.; CHEN, Y.-W.; ZHU, L. β -catenin is overexpressed in hepatic fibrosis and blockage of Wnt/ β -catenin signaling inhibits hepatic stellate cell activation. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 2145–2151, 2014.
- GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, p. 311–335, 2001.
- GIRAUDI, P. J.; BARBERO BECERRA, V. J.; MARIN, V.; CHAVEZ-TAPIA, N. C.; TIRIBELLI, C.; ROSSO, N. The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 1, p. 85–92, 2015.
- GRASSELLI, E.; VOCI, A.; DEMORI, I.; VECCHIONE, G.; COMPALATI, A. D.; GALLO, G.; GOGLIA, F.; DE MATTEIS, R.; SILVESTRI, E.; VERGANI, L. Triglyceride mobilization from lipid droplets sustains the anti-steatotic action of iodothyronines in cultured rat hepatocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–10, 2016.
- GUPTA, G.; KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. **Cytokine**, n. June, p. 0–1, 2018.
- HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 281–296, 2018.
- HAZRA, S.; MIYAHARA, T.; RIPPE, R. a; TSUKAMOTO, H. PPAR gamma and hepatic stellate cells. **Comparative hepatology**, v. 3, n. 1, p. S7, 2004.
- HEANEY, J.; OAKLEY, F.; HANTON, F.; WILLIAMS, R.; ALEXANDER, G. Hepatocyte senescence activates hepatic stellate cells to drive liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 2, p. S709, 2016.
- HERNÁNDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. **Autophagy**, v. 8, n. 5, p. 849–850, 2012.
- HONG, Y.; LI, S.; WANG, J.; LI, Y. In vitro inhibition of hepatic stellate cell activation by the autophagy-related lipid droplet protein ATG2A. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- ISHIBASHI, H.; NAKAMURA, M.; KOMORI, A.; MIGITA, K.; SHIMODA, S. Liver architecture, cell function, and disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 3, p. 399–409, 2009.

- JIAO, J.; FRIEDMAN, S. L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. **Current opinion in gastroenterology**, v. 25, p. 223–229, 2009.
- JO, Y.; OKAZAKI, H.; MOON, Y.-A.; ZHAO, T. Regulation of lipid metabolism and beyond. **International Journal of Endocrinology**, p. 1–2, 2016
- KARTHIKEYAN, S.; POTTER, J. J.; GESCHWIND, J.-F.; SUR, S.; HAMILTON, J. P.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W.; MEZEY, E.; GANAPATHY-KANNIAPPAN, S. Deregulation of energy metabolism promotes antifibrotic effects in human hepatic stellate cells and prevents liver fibrosis in a mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 3, p. 463–469, 2016.
- KIAGIADAKI, F.; KAMPA, M.; VOUMVOURAKI, A.; CASTANAS, E.; KOUROUMALIS, E.; NOTAS, G. Activin-A causes hepatic stellate cell activation via the induction of TNF α and TGF β in Kupffer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 3, p. 891–899, 2018.
- KIM, M.; YANG, S. G.; KIM, J. M.; LEE, J. W.; KIM, Y. S.; LEE, J. II. Silymarin suppresses hepatic stellate cell activation in a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis: Analysis of isolated hepatic stellate cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 3, p. 473–479, 2012.
- KISSELEVA, T.; CONG, M.; PAIK, Y.; SCHOLTEN, D.; JIANG, C.; BENNER, C.; IWASAKO, K.; MOORE-MORRIS, T.; SCOTT, B.; TSUKAMOTO, H.; EVANS, S. M.; DILLMANN, W.; GLASS, C. K.; BRENNER, D. A. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, p. 9448–9453, 2012.
- KOCHANNEK, K. D.; MURPHY, S. L.; XU, J.; TEJADA-VERA, B. Deaths: final data for 2014. National vital statistics reports : from the centers for disease control and prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, Hyattsville, MD, v. 65, n. 4, p. 1–122, 2016.
- LEE, Y. A.; WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. **Gut**, v. 64, n. 5, p. 830–841, 2015.
- LI, Z.; DING, Q.; LING, L. P.; WU, Y.; MENG, D. X.; LI, X.; ZHANG, C. Q. Metformin attenuates motility, contraction, and fibrogenic response of hepatic stellate cells in vivo and in vitro by activating amp-activated protein kinase. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 7, p. 819–832, 2018.
- LOVELACE, E. S.; WAGONER, J.; MACDONALD, J.; BAMMLER, T.; BRUCKNER, J.; BROWNELL, J.; BEYER, R. P.; ZINK, E. M.; KIM, Y. M.; KYLE, J. E.; WEBB-ROBERTSON, B. J. M.; WATERS, K. M.; METZ, T. O.; FARIN, F.; OBERLIES, N. H.; POLYAK, S. J. Silymarin suppresses cellular inflammation by inducing reparative stress signaling. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 1990–2000, 2015.
- MANSOURI, A.; GATTOLLIAT, C.-H.; ASSELAH, T. Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, p. 629–647, 2018.
- MATA-SANTOS, H. A.; DUTRA, F. F.; ROCHA, C. C.; LINO, F. G.; XAVIER, F. R.; CHINALIA, L. A.; HOSSY, B. H.; CASTELO-BRANCO, M. T. L.; TEODORO, A. J.; PAIVA, C. N.; PYRRHO, A. S. Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2076–2083, 2014.
- MELO, A. P. S.; FRANÇA, E. B.; MALTA, D. C.; GARCIA, L. P.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M. Mortality due to cirrhosis, liver cancer, and disorders attributed to alcohol use: Global Burden of Disease in Brazil, 1990 and 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 1, p. 61–74, 2017.

- MIKI, Y.; ONO, K.; HATA, S.; SUZUKI, T.; KUMAMOTO, H.; SASANO, H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 3–5, p. 68–75, 2012.
- MOLENAAR, M. R.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B. Some lipid droplets are more equal than others: different metabolic lipid droplet pools in hepatic stellate cells. **Lipid Insights**, v. 10, p. 1–3, 2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninguer*. 4a ed. Porto Alegre: **ArtMed**, 2014. v. 2
- NEVZOROVA, Y. A.; TRAUTWEIN, C. Regulation of Cell Cycle During Liver Regeneration. **Liver Regeneration**. 2015. p. 153–166.
- NISHIZAWA, H.; IGUCHI, G.; FUKUOKA, H.; TAKAHASHI, M.; SUDA, K.; BANDO, H.; MATSUMOTO, R.; YOSHIDA, K.; ODAKE, Y.; OGAWA, W.; TAKAHASHI, Y. IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34605, 2016.
- OH, Y.; PARK, O.; SWIERCZEWSKA, M.; HAMILTON, J. P.; PARK, J.-S.; KIM, T. H.; LIM, S.-M.; EOM, H.; JO, D. G.; LEE, C.-E.; KECHRID, R.; MASTORAKOS, P.; ZHANG, C.; HAHN, S. K.; JEON, O.-C.; BYUN, Y.; KIM, K.; HANES, J.; LEE, K. C.; POMPER, M. G.; GAO, B.; LEE, S. Systemic PEGylated TRAIL treatment ameliorates liver cirrhosis in rats by eliminating activated hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 209–223, 2016.
- PANEBIANCO, C.; OBEN, J. A.; VINCIGUERRA, M.; PAZIENZA, V. Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signalings, **Springer International Publishing**, 2016.
- PANEBIANCO, C.; OBEN, J. A.; VINCIGUERRA, M.; PAZIENZA, V. Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signalings. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 17, n. 3, p. 269–280, 2017.
- PINZANI, M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1720–1726, 2002.
- POISSON, J.; LEMOINNE, S.; BOULANGER, C.; DURAND, F.; MOREAU, R.; VALLA, D.; RAUTOU, P. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 212–227, 2017.
- POTTER, B. J. Components of the Hepatic System. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2018.
- REEVES, H. L. Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, n. 1–3, p. 808–826, 2002.
- SAKAI, H.; SHIMIZU, M.; MORIWAKI, H. A role for acyclic retinoid in the chemoprevention of hepatocellular carcinoma: therapeutic strategy targeting phosphorylated Retinoid X Receptor- α . **Diseases**, v. 2, n. 3, p. 226–242, 2014.
- SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 452–468, 2016.
- SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 123, p. 59–110, 2014.

- SHE, H.; XIONG, S.; HAZRA, S.; TSUKAMOTO, H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4959–4967, 2005.
- STENVALL, A.; LARSSON, E.; STRAND, S. E.; JÖNSSON, B. A. A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. **Physics in Medicine and Biology**, v. 59, n. 13, p. 3353–3371, 2014.
- SUN, M.; KISSELEVA, T. Reversibility of liver fibrosis, Elsevier Masson SAS, 2015.
- SVEGLIATI-BARONI, G.; DE MINICIS, S.; MARZIONI, M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: Novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver International*, v. 28, p. 1052–1064, 2008.
- TALBOT, G. Trans fatty acids. Oxford, UK: Blackwell publishing Ltd, 2008.
- TANG, Y. Curcumin targets multiple pathways to halt hepatic stellate cell activation: updated mechanisms in vitro and in vivo. **Digestive diseases and sciences**, v. 60, n. 6, p. 1554–1564, 2015.
- TESSARI, P.; CORACINA, A.; COSMA, A.; TIENGO, A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 19, n. 4, p. 291–302, 2009.
- TESTERINK, N.; AJAT, M.; HOUWELING, M.; BROUWERS, J. F.; PULLY, V. V.; VAN MANEN, H. J.; OTTO, C.; HELMS, J. B.; VAANDRAGER, A. B. Replacement of retinyl esters by polyunsaturated triacylglycerol species in lipid droplets of hepatic stellate cells during activation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
- THERET, N.; MUSSO, O.; HELGOUALC, A. L.; CLEMENT, B. Activation of Matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. **American journal of pathology**, v. 150, n. 1, p. 51–58, 1997.
- TRAPPOLIERE, M.; CALIGIURI, A.; SCHMID, M.; BERTOLANI, C.; FAILLI, P.; VIZZUTTI, F.; NOVO, E.; MANZANO, C. Di; MARRA, F.; LOGUERCIO, C.; PINZANI, M. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1102–1111, 2009.
- TRAUTWEIN, C.; FRIEDMAN, S. L.; SCHUPPAN, D.; PINZANI, M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. S1, p. S15–S24, 2015.
- TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 397–411, 2017.
- TSUKAMOTO, H. Adipogenic phenotype of hepatic stellate cells. **Alcoholism: clinical & experimental research**, v. 29, p. 132S–133S, 2005.
- TZENG, J. I.; CHEN, M. F.; CHUNG, H. H.; CHENG, J. T. Silymarin decreases connective tissue growth factor to improve liver fibrosis in rats treated with carbon tetrachloride. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 7, p. 1023–1028, 2013.
- VANCE, D. E.; VANCE, J. E. Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes. **Elsevier**, 2002.
- VECCHIONE, G.; GRASSELLI, E.; VOCI, A.; BALDINI, F.; GRATTAGLIANO, I.; WANG, D. Q.; PORTINCASA, P.; VERGANI, L. Silybin counteracts lipid excess and oxidative stress in cultured steatotic hepatic cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 26, p. 6016–6026, 2016.
- WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 351–363, 2012.

- WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis and the microenvironment: Fertile soil for hepatocellular carcinoma development. **Gene Expression**, v. 16, p. 77–84, 2014.
- WANG, Y.; LIU, N.; SU, X.; ZHOU, G.; SUN, G.; DU, F.; BIAN, X.; WANG, B. Epigallocatechin-3-gallate attenuates transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition via Nrf2 regulation in renal tubular epithelial cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, n. C, p. 260–267, 2015.
- WEI, L.; CHEN, Q.; GUO, A.; FAN, J.; WANG, R.; ZHANG, H. Asiatic acid attenuates CCl₄ - induced liver fibrosis in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR and Bcl-2/Bax signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 60, n. April, p. 1–8, 2018.
- WISECAVER, J. H.; BOROWSKY, A. T.; TZIN, V.; JANDER, G.; KLIEBENSTEIN, D. J. A global coexpression network approach for connecting genes to specialized metabolic pathways in plants. **The Plant Cell**, v. 29, n. May, p. 944–959, 2017.
- WU, Y.; LIU, X.; ZHOU, Q.; HUANG, C.; MENG, X.; XU, F.; LI, J. Silent information regulator 1 (SIRT1) ameliorates liver fibrosis via promoting activated stellate cell apoptosis and reversion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 2, p. 163–176, 2015.
- WURIE, H. R.; BUCKETT, L.; ZAMMIT, V. A. Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells. **FEBS Journal**, v. 279, n. 17, p. 3033–3047, 2012.
- XU, D.; LI, X.; LI, Y.; LIU, Y.; HUANG, C.; MENG, X.; LI, J. TIPE2 attenuates liver fibrosis by reversing the activated hepatic stellate cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 1, p. 199–206, 2018.
- XU, L.; HUI, A. Y.; ALBANIS, E.; ARTHUR, M. J.; O'BYRNE, S. M.; BLANER, W. S.; MUKHERJEE, P.; FRIEDMAN, S. L.; ENG, F. J. 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.
- YAO, H.; QIAO, Y. J.; ZHAO, Y. L.; TAO, X. F.; XU, L. N.; YIN, L. H.; QI, Y.; PENG, J. Y. Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 30, p. 6890–6905, 2016.
- YIN, L.; GUO, X.; ZHANG, C.; CAI, Z.; XU, C. In silico analysis of expression data during the early priming stage of liver regeneration after partial hepatectomy in rat. **Oncotarget**, v. 9, n. 14, p. 11794–11804, 2018.
- YONEDA, A.; SAKAI-SAWADA, K.; NIITSU, Y.; TAMURA, Y. Vitamin A and insulin are required for the maintenance of hepatic stellate cell quiescence. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 8–17, 2016.
- YOSHIDA, K.; MATSUZAKI, K. Differential regulation of TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1–7, 2012.
- YU, H.; YAO, Y.; BU, F.; CHEN, Y.; WU, Y.; YANG, Y.; CHEN, X.; ZHU, Y.; WANG, Q.; PAN, X.; MENG, X.; HUANG, C.; LI, J. Blockade of YAP alleviates hepatic fibrosis through accelerating apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells. **Molecular Immunology**, v. 107, p. 29–40, 2019.
- YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

ZHANG, S.; YANG, Y.; LIANG, Z.; DUAN, W.; YANG, J.; YAN, J.; WANG, N.; FENG, W.; DING, M.; NIE, Y.; JIN, Z. Silybin-mediated inhibition of notch signaling exerts antitumor activity in human hepatocellular carcinoma cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises em conjunto demonstram que as culturas de LX-2 cultivadas na presença de DMSO sofrem uma drástica redução nos níveis de lipídeos intracelulares e um aumento de sua oxidação. Os tratamentos com 100 μM de silimarina apresentam alterações na polimerização do citoesqueleto de actina, reduz níveis proteicos de $\alpha\text{-SMA}$ e controlam a homeostase do metabolismo lipídico. Essa concentração de silimarina, contribui para a o retorno nos níveis de gotículas de lipídeos e na restauração dos níveis de triglicerídeos em comparação as células quiescidas. Durante o tratamento das culturas de LX-2 com a concentração de 150 μM de silimarina houve um aumento nos níveis de gotículas de lipídeos, ácidos graxos de cadeia longa e triglicerídeos, além de uma sinalização mais elevada para a síntese de lipídeos. Especificamente em relação ao metabolismo lipídico, foram avaliados os efeitos dos tratamentos em modelos de co-cultivo. Nesse modelo verificou-se que o DMSO possui um efeito oposto no metabolismo de lipídeos dessas células, conduzido a co-cultura para um acúmulo de ácidos graxos e aumento na sinalização de síntese lipídica. Inversamente, a concentração de 150 μM de silimarina controla o metabolismo dessas células, trazendo os níveis lipídicos à homeostase próximos ao encontrado nas células controle.

Apesar dessas disparidades entre os resultados observados nos modelos celulares, o efeito da silimarina se apresenta positivo em um contexto de hepatoproteção, controlando alterações negativas de compostos tóxicos como o DMSO. A concentração de 100 μM de silimarina parece ter um efeito positivo no processo de transdiferenciação das células estreladas hepáticas, podendo se tornar útil para terapêuticas relacionadas a reversão da fibrose hepática. Paralelamente, evidenciou-se os efeitos negativos do DMSO em células hepáticas em relação ao metabolismo lipídico dessas células.