
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LETÍCIA DESTEFANI SCARINCI

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FÁRMACO
TRICLOSAN NA TRANSDIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS LX-2 E SEU
POTENCIAL INDUTOR TUMORAL**



Rio Claro
2018

LETÍCIA DESTEFANI SCARINCI

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FÁRMACO TRICLOSAN NA
TRANSDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS
LX-2 E SEU POTENCIAL INDUTOR TUMORAL**

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

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

Rio Claro
2018

S285a Scarinci, Letícia Destefani
Avaliação da citotoxicidade do fármaco triclosan na transdiferenciação de células estreladas hepáticas LX-2 e seu potencial indutor tumoral / Letícia Destefani Scarinci. -- Rio Claro, 2018
61 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Hepatocarcinoma. 2. Células LX-2. 3. Triclosan. 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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UNESP Campus de Rio Claro e, em especial, ao Departamento de Biologia pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À professora e orientadora Dr.^a Karen Cristiane Martinez de Moraes pela confiança em mim depositada e por todo aprendizado que levarei pela vida inteira.

Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo a cada dia, apoio e experiências compartilhadas.

À FAPESP (Processo 2013/21186-5) e PIBIC pelo financiamento que possibilitou a continuidade dessa pesquisa.

Às pessoas especiais que tive o privilégio de conhecer ao longo desses anos e que hoje posso chamá-las de amigos.

Deixo e levo os resultados deste maravilhoso ciclo que passei com todos vocês.

*“Pergunte a si mesmo o que é realmente importante.
Então, tenha coragem e sabedoria para construir a sua vida
dentro da sua resposta.”*

(Lee Jampolsky)

RESUMO

Buscando-se avaliar o potencial do fármaco triclosan (TCS) para sua utilização segura no processo de reversão do quadro fibrosante hepático, novas pesquisas a seu respeito tornam-se relevantes. O TCS é caracterizado por ser um agente antimicrobiano utilizado em uma ampla variedade de produtos rotineiros e por atuar como um dos inibidores do complexo enzimático ácido graxo sintase tipo I (*Fatty Acid Synthase* - FASN), responsável pela síntese do ácido graxo *de novo*. Os lipídeos, compostos principalmente por ácidos graxos, apresentam metabolismo correlacionado com a transdiferenciação de células estreladas hepáticas (CEHs) do estado quiescente (saudáveis) para o estado ativado (fibrosadas). A ativação celular pode evoluir para uma inflamação ou até mesmo para um quadro fibrosante hepático considerado grave e, caso não tratada adequadamente, pode contribuir para o estabelecimento de hepatocarcinomas, como ocorre em 90% dos casos clínicos registrados. Estudos prévios em nosso laboratório sugerem que o efeito do TCS causa a transdiferenciação das CEHs crescidas em condições ativadas, porém, seus efeitos deletérios ainda precisam ser avaliados. Nesse contexto, o potencial citotóxico do fármaco TCS na transdiferenciação de CEHs LX-2 tornou-se alvo do estudo, sendo investigados aspectos celulares e moleculares que contribuem para o estabelecimento de características tumorais. Os resultados obtidos com culturas celulares LX-2 crescidas em condições ativadas e tratadas com TCS 50 μ M, inferiram que o fármaco nessa concentração é possivelmente genotóxico, mas não é potencialmente mutagênico. Ou seja, o dano celular causado pelo fármaco pode ser considerado reversível. Entretanto, também foi demonstrado que o fármaco promove a modulação do ambiente celular, altera as funções biológicas das proteínas, regula negativamente a produção de danos oxidativos e dano ao DNA e, conseqüentemente, também regula o surgimento de mutações que levam ao estabelecimento do hepatocarcinoma. Sendo assim, o TCS na concentração 50 μ M possivelmente promove uma ação anticarcinogênica e hepatoprotetora, colaborando favoravelmente com a reversão do fenótipo ativado.

Palavras-chave: Hepatocarcinoma; células LX-2; Triclosan;

ABSTRACT

To evaluate the potential of the triclosan drug (TCS) for its safe use in the process of reversion of the hepatic fibrosis, new research on becomes relevant. TCS is characterized as being an antimicrobial agent used in a wide variety of routine products and for acting as one of the inhibitors of the enzymatic complex Fatty Acid Synthase (FASN), responsible for *de novo* fatty acid synthesis. Lipids, composed mainly of fatty acids, have metabolism correlated with the transdifferentiation of hepatic stellate cells (HSCs) from the quiescent state (healthy) to the activated state (fibrosed). Cellular activation may progress to inflammation or even to a serious fibrosing liver disease and, if not treated properly, may contribute to the establishment of hepatocellular carcinoma, as occurs in 90% of reported clinical cases. Previous studies in our laboratory suggest that the effect of TCS causes transdifferentiation of HSCs grown under activated conditions, however, its deleterious effects still need to be evaluated. In this context, the cytotoxic potential of the TCS drug in transdifferentiation of HSCs LX-2 became the target of the study, investigating cellular and molecular aspects that contribute to the establishment of tumor characteristics. The results obtained with LX-2 cell cultures grown under activated conditions and treated with 50 μ M TCS, inferred that the drug at this concentration is possibly genotoxic but not potentially mutagenic. So, the cellular damage caused by the drug can be considered reversible. However, it has also been shown that the drug promotes the modulation of the cellular environment, alters the biological functions of proteins, negatively regulates the production of oxidative damage and DNA damage, and consequently also regulates the appearance of mutations that lead to the establishment of hepatocarcinoma. Thus, the TCS at 50 μ M concentration possibly promotes an anticarcinogenic and hepatoprotective action, collaborating favorably with the reversion of the activated phenotype.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; LX-2 cells; Triclosan;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 As doenças hepáticas e as atuais dificuldades em seu tratamento.....	9
1.2 A fibrose hepática e o estabelecimento do hepatocarcinoma.....	11
1.3 Células estreladas hepáticas (CEHs) e a linhagem celular LX-2.....	13
1.4 Metabolismo lipídico e o ácido graxo sintase (FASN).....	16
1.5 O fármaco Triclosan.....	17
1.6 A toxicidade do fármaco Triclosan e o hepatocarcinoma.....	18
2. OBJETIVO GERAL.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Preparo da solução TCS.....	22
3.2 Cultura de Células.....	22
3.3 Teste de Viabilidade Celular.....	22
3.4 Ensaio de Toxicidade.....	23
3.4.1 Ensaio do cometa.....	23
3.4.2 Teste do Micronúcleo (MN).....	24
3.5 Análises de Expressão de Genes.....	25
3.5.1 Extração de RNA.....	25
3.5.2 Transcrição Reversa.....	26
3.5.3 Reações de Polimerização em Cadeia.....	26
3.6 Análises Estatísticas.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29

4.1	Cultura de células e ensaios de viabilidade celular.....	29
4.2	Ensaio de Toxicidade.....	31
4.2.1	Ensaio do Cometa.....	31
4.2.2	Teste do Micronúcleo.....	34
4.3	Análises de expressão gênica: PCR semiquantitativa (RT-PCR) e PCR em tempo real (qPCR).....	37
4.3.1	Análise molecular da transdiferenciação epitélio-mesenquimal (TEM).....	38
4.3.2	Análise molecular do estresse oxidativo.....	43
4.3.3	Análise molecular do metabolismo de xenobióticos.....	47
4.3.4	Análise molecular dos mecanismos de dano/reparo de DNA.....	48
5.	CONCLUSÕES.....	50
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 As doenças hepáticas e as atuais dificuldades em seu tratamento

As doenças hepáticas crônicas são consideradas um grave problema relacionado à saúde pública, sendo responsáveis pela morte de mais de 1,5 milhões de pessoas por ano (WHO, 2012). No Brasil, estima-se que aproximadamente 10% de toda morbidade e mortalidade esteja relacionada a doenças hepáticas alcoólicas (BECKER et al., 2013). No geral, essas patologias podem ser desencadeadas pela ação de diversos fatores, como alimentação, ingestão excessiva de álcool e infecções virais, podendo promover patologias como hepatite, cirrose, esteatoses e até hepatocarcinoma (SHU et al., 2004; PADOIN et al., 2008).

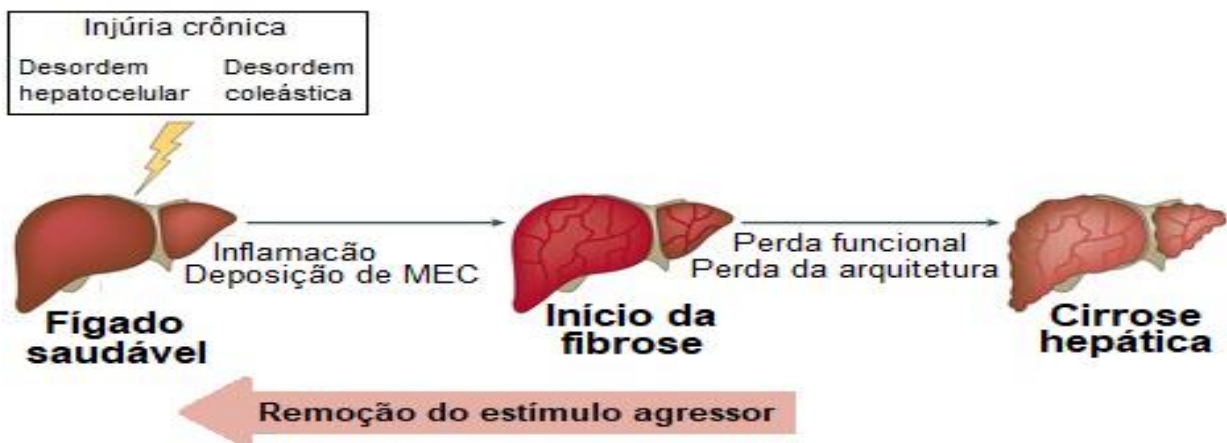
As doenças hepáticas recebem duas classificações: colestáticas e hepatocelulares. As doenças colestáticas são caracterizadas pela diminuição ou ausência do fluxo biliar e seus componentes, enquanto que as doenças hepatocelulares são aquelas desencadeadas por danos causados nas células do tecido hepático (ANDRADE, 2005; BATTOCHIO et al, 2004; BECKER et al., 2013). Este, por sua vez, é organizado em células parenquimatosas (hepatócitos) e células não parenquimatosas (SENOO et al., 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). Essas células trabalham de maneira sincronizada frente aos casos de injúria, de modo a modificar seu metabolismo e desencadear o aumento da síntese dos componentes da matriz extracelular (MEC) na tentativa de cicatrizar e reparar o tecido hepático lesionado, caracterizando um quadro fibrosante (Figura 01) (ANDRADE, 2005; BECKER et al, 2013; PELLICORO et al., 2014).

Para que seja configurada a existência de uma doença hepática é necessário que 80% a 90% do parênquima hepático esteja modificado. Como o período entre o início da doença e sua detecção é longo, o prognóstico do paciente acaba sendo bastante desfavorável, fazendo com que o início de seu tratamento ocorra apenas quando a doença já está em um estágio avançado (BECKER et al., 2013). Além disso, as patologias hepáticas podem ser caracterizadas de acordo com suas diferentes intensidades. Quando ocorre a perda da arquitetura do parênquima hepático de maneira transitória, essa lesão é considerada aguda e há a

possibilidade de reversão do fenótipo do órgão e das células. Entretanto, quando essa lesão ocorre de maneira contínua (crônica) é estabelecido um quadro inflamatório que permanecerá e levará a substituição do parênquima hepático por tecido cicatricial. Tal substituição favorece a progressão da patologia para os estágios mais avançados, como a cirrose e o câncer (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; PELLICORO et al., 2014).

Atualmente várias pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de possíveis curas para as patologias hepáticas, mas, infelizmente, ainda são escassos os tratamentos. Outra dificuldade não só para o paciente, como também para o avanço da medicina, é a inexistência de terapias anti-inflamatórias, imunossupressivas e antivirais eficientes (FRIEDMAN, 2000; GUO et. al., 2009). Essas dificuldades ocorrem devido às causas multifatoriais das doenças hepáticas, o que impede a existência de drogas eficientes contra suas diferentes etiologias (ANDRADE, 2005). Com isso, fica ainda mais evidente a necessidade urgente do desenvolvimento de tratamentos suplementares para os pacientes, considerando-se que o principal tratamento adotado tem sido retirar o estímulo agressor.

Figura 01: Processo de transição hepática de um fenótipo saudável para um estágio de cirrose após sua exposição à uma injúria crônica.



Fonte: Adaptado de Pellicoro et al., 2014.

1.2 A fibrose hepática e o estabelecimento do hepatocarcinoma

O quadro clínico conhecido como fibrose hepática é uma condição patológica presente em todas as lesões e doenças relacionadas ao fígado que são desencadeadas durante um período considerável de tempo. É caracterizado como um mecanismo reversível de resposta às feridas por meio da cicatrização, na qual ocorre acúmulo de MEC (ANDRADE, 2005; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

Logo após ocorrer uma lesão no fígado, uma resposta inicial é ativada mediada por estímulos pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos, onde uma sinalização parácrina é efetuada pelo recrutamento de células parenquimais e células inflamatórias, sendo estas últimas responsáveis pela secreção de citocinas (SENOO et al., 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; LEE; FRIEDMAN, 2011). Além disso, existem muitos fatores de crescimento com importantes funções na fibrogênese hepática, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), entre outros, uma vez que são responsáveis por estimular desde a proliferação e migração, até a ativação de células produtoras de MEC (SENOO et al., 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; LEE; FRIEDMAN, 2011), que é constituída por diferentes tipos de colágeno (tipos I, III, IV e VI), ácido hialurônico, elastina, e glicoproteínas estruturais (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

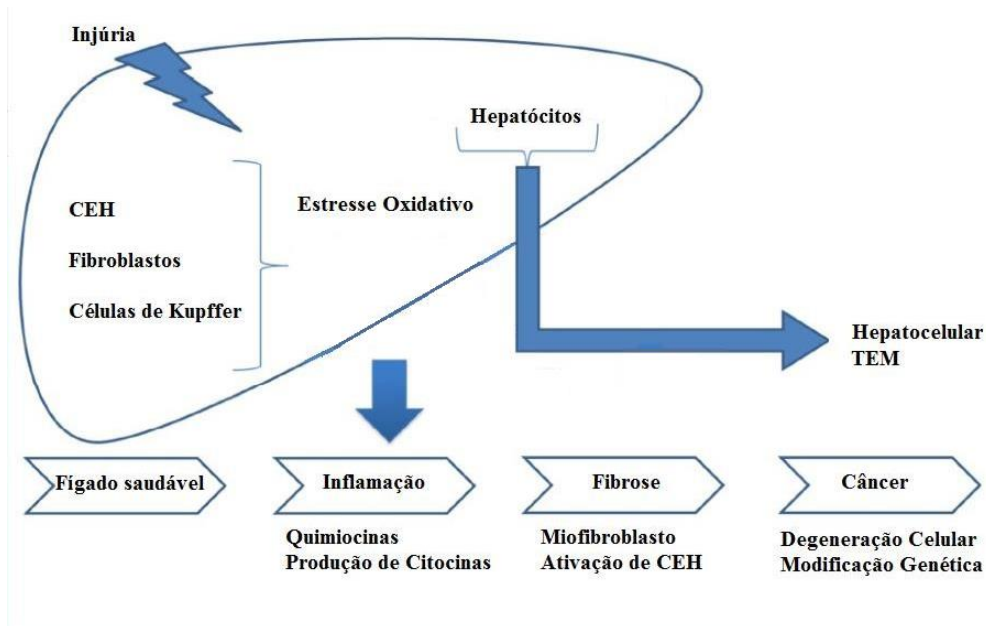
Em lesões crônicas, o fígado pode aumentar em até aproximadamente seis vezes os componentes da MEC (BATALLER; BRENNER, 2005), o que ressalta o alto risco do paciente em perder a funcionalidade de seu órgão se não for tratado. Dentre as células produtoras de MEC, pode-se destacar as células estreladas hepáticas (CEHs) (SENOO et al., 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; LEE; FRIEDMAN, 2011), as quais são as principais responsáveis pelo processo fibrosante (SENOO et al., 2010). Independentemente do agente etiológico, o estágio final de uma lesão hepática crônica é a fibrose hepática, a qual pode favorecer o aparecimento e o desenvolvimento de um hepatocarcinoma quando em níveis elevados. Em 90% dos casos de hepatocarcinoma, o mesmo foi estabelecido devido a inflamação não resolvida ou um quadro fibrosante considerado grave no fígado, também denominado cirrose (MINICIS, 2012). Esse processo patológico pode ser

definido como sendo um eixo inflamação-fibrose-câncer (Figura 02), cujos reguladores moleculares ainda requerem maiores estudos (MINICIS, 2012; PELLICORO et al., 2014).

De acordo com Minicis e colaboradores (2012), estudos clássicos utilizando modelos experimentais de lesão hepática crônica em ratos revelaram que as citocinas e os fatores de crescimento são críticos tanto no processo de fibrose celular, quanto no desenvolvimento de câncer. Assim como no processo fibrótico, no estabelecimento do hepatocarcinoma também há aumento dos níveis de TGF- β devido à deposição de colágeno e a redução da degradação proteolítica. Nesse sentido, o fator CTGF promove o crescimento tumoral, a angiogênese, a migração e a invasão. O bloqueio da via de sinalização de TGF- β inibe a produção de CTGF e o crescimento de tumores. Sabendo-se disso, os fibroblastos associados ao cancro podem ser considerados como uma possível fonte de CTGF em resposta à sinais parácrinos de células cancerosas, podendo originar células endoteliais e ser uma fonte de transdiferenciação epitélio-mesenquimal (TEM). No fígado, essa transdiferenciação ocorre obrigatoriamente sob estresse ou lesão no órgão (WANG et al., 2008).

Após um agente agressor ocasionar uma lesão no fígado, inicia-se o processo de estresse oxidativo nas células, sendo esse um dos mecanismos que mais contribuem para o eixo inflamação-fibrose-câncer (MINICIS et al., 2012). O estresse oxidativo é comumente induzido em todas as doenças hepáticas e desempenha um papel crucial na fibrose hepática, sendo um dos grandes responsáveis pelo processo de ativação das CEHs (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017) e para o estabelecimento do câncer. Quando as células parenquimatosas são danificadas por algum agente agressor, ocorre liberação direta de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que contribui para o processo de degeneração celular e ativação das vias intracelulares das CEHs, induzindo assim sua ativação e aumento da síntese de colágeno (AOYAMA et al, 2010; TANAKA et al., 2011). Além disso, uma importante fonte de EROs durante a fibrogênese e a carcinogênese são as CEHs, os fibroblastos e as células de Kupffer, que colaboram para o processo inflamatório, transdiferenciação epitélio-mesenquimal e apoptose celular (SVEGLIATI-BARONI et al., 2008; MINICIS et al., 2012).

Figura 02: Mecanismos para o estabelecimento da fibrose hepática e do hepatocarcinoma.



Fonte: Adaptado de Minicis et al., 2012.

1.3 Células estreladas hepáticas (CEHs) e a linhagem celular LX-2

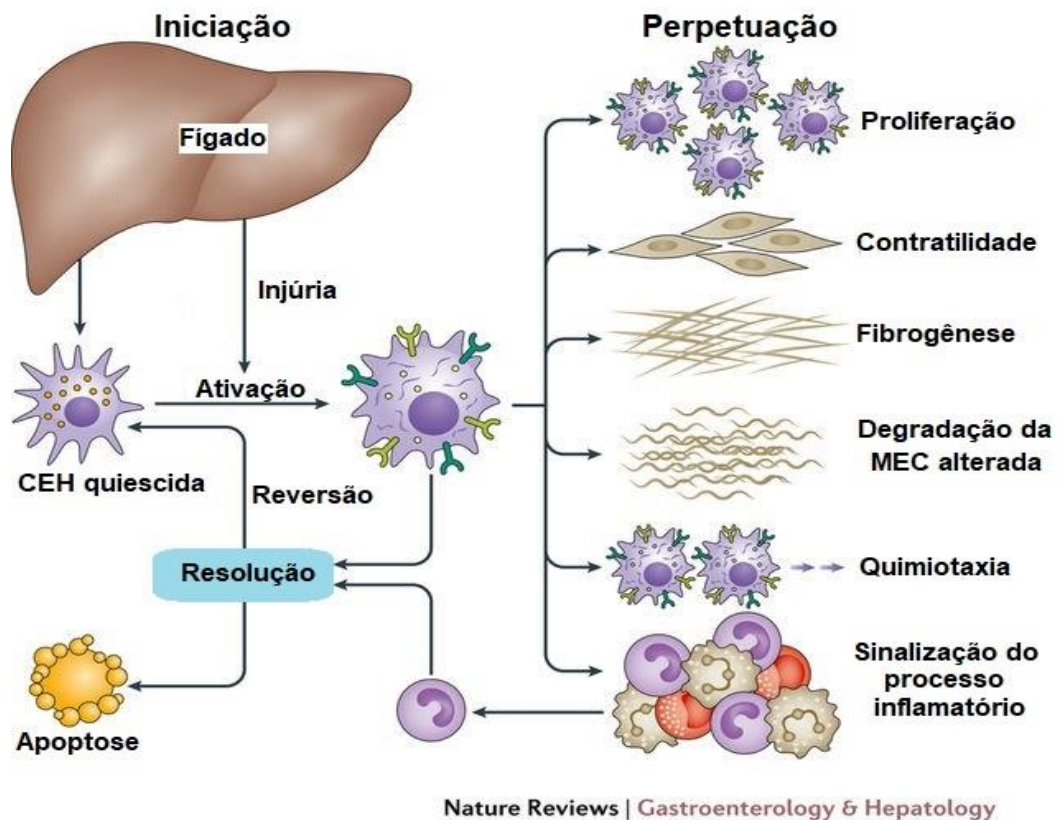
As CEHs foram descritas no século XIX por Kupffer (FRIEDMAN, 2008) e são conhecidas também como células de Ito e como células perisinusoidais (HENDERSON; FORBES, 2008). Essas células se localizam no espaço de Disse do parênquima hepático, na região entre os hepatócitos e os capilares sinusoidais e representam aproximadamente 15% do número total de células em um fígado normal, além de um terço do número total de células não-parenquimais (FRIEDMAN, 2008).

Em fígados saudáveis, as CEHs são encontradas em seu estado quiescente, em que elas apresentam morfologia do corpo celular em forma de estrela, baixas taxas de divisão mitótica e de síntese de proteínas da matriz extracelular, e grande acúmulo de gotículas de gordura contendo retinóide em seu citoplasma (IREDALE, 2007). Essas gotículas de gordura são compostas por lipídeos, principalmente triglicerídeos e ésteres de colesterol envolvidos por uma monocamada fosfolipídica. Quando há uma lesão no fígado ocorre a transição do fenótipo das CEHs do estado quiescente para o estado ativado (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007; TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017), sendo este último caracterizado pela perda da

morfologia celular em forma de estrela e das gotículas de lipídeos presentes no citoplasma das CEHs, além do aumento na síntese dos compostos da MEC, como por exemplo, proteínas estruturais, proteínas de adesão e de colágeno (IREDALE, 2007; FRIEDMAN, 2008; TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017).

Entretanto, essa mudança no fenótipo das CEHs é dividida em duas fases: a iniciação e a perpetuação (Figura 03). A fase de iniciação é resultado do aumento da expressão dos receptores membranares, o que torna as células mais propícias à estimulação parácrina dos hepatócitos, lipopolissacarídeos e espécies reativas de oxigênio. Enquanto que na fase de perpetuação as CEH assumem o fenótipo de miofibroblasto, passando a liberar substâncias que contribuem para a permanência de seu estado ativado, como citocinas e quimiocinas (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007). Essa transição entre os fenótipos das CEHs acontece por meio da ação de estímulos pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos produzidos por células inflamatórias (ANDRADE, 2005), como já citados. Além disso, para que ocorra a perpetuação, remodelação e deposição de MEC nos sítios de injúria das CEHs, estas sofrem mudanças em seu comportamento, tais como: aumento da proliferação, contratilidade, quimiotaxia, fibrogênese, degradação da matriz, liberação de citocinas e perda de vitamina A. Todavia, as CEHs são capazes de também desencadear diversos mecanismos correlatos como tentativa de minimizar a fibrose, como a apoptose, a senescência e a reversão (FRIEDMAN, 2008; TSUCHID; FRIEDMAN, 2017). Curiosamente, essa tentativa das CEHs minimizarem o quadro clínico de fibrose e reverterem seu fenótipo foi demonstrada em estudos *in vitro* por Sun e colaboradores (2008), através da combinação da terapia celular com a terapia gênica. Porém, o mesmo resultado *in vivo* ainda não foi comprovado e, em consequência, ainda não há o conhecimento de que a reversão ocorre quando as células sofrem apoptose ou quando reverterem seu fenótipo ativado para quiescente (OLIVEIRA, 2009).

Figura 03: Fases de iniciação e perpetuação durante a mudança de fenótipo das CEHs.



Fonte: Adaptado de Tsuchida; Friedman, 2017.

Visando a maior compreensão do processo de ativação das CEHs e do processo fibrosante hepático, a necessidade de utilizar um modelo de cultivo celular tornou-se cada vez mais importante. Assim, no ano de 2005 Xu e colaboradores desenvolveram uma linhagem celular a partir de CEHs de fígado humano, denominada LX-2. Essas células foram imortalizadas espontaneamente, por meio de seu cultivo em baixas condições de soro bovino fetal (SBF), e apresentaram a capacidade de transdiferenciação de seus fenótipos de quiescente à ativado e vice e versa. O estabelecimento da linhagem celular LX-2 viabilizou estudos dos mecanismos da fibrogênese, bem como possibilitou maior exploração de novos agentes que apresentem potencial terapêutico.

1.4 Metabolismo lipídico e o ácido graxo sintase (FASN)

Estudos apontam que a transdiferenciação das CEHs para o fenótipo ativado durante o processo fibrosante está intimamente relacionada ao metabolismo de lipídeos (FRIEDMAN, 2008; LIU et al., 2010, JI et al, 2014). Em mamíferos os principais componentes dos lipídeos são os ácidos graxos, que podem ser obtidos por meio da alimentação do indivíduo ou pela síntese do ácido graxo *de novo* (LIU et al., 2010; CURRIE et al., 2013), sendo o fígado um dos principais locais dessa síntese (LIU et al., 2010). O ácido graxo *de novo* é sintetizado a partir de um complexo enzimático denominado ácido graxo sintase (*Fatty Acid Synthase* - FASN). Essa síntese é regulada por fatores hormonais, nutricionais e genéticos e, caso ocorra qualquer alteração em um desses processos, diversas doenças podem surgir (LEHNINGER, 2017).

FASN é uma proteína cuja estrutura é composta por um homodímero entrelaçado em forma de “x” constituído por dois polipeptídios de 272 kDa, o que viabiliza múltiplas interações entre seus domínios. Além disso, 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) (LIU et al., 2010; LEHNINGER, 2017). A enzima pode ser encontrada em dois subtipos: FASN tipo I e FASN tipo II. A FASN tipo I está presente nos mamíferos e se caracteriza por ser uma enzima citosólica codificada pelo gene FASN que, por sua vez, é responsável por catalisar diferentes etapas da biossíntese de lipídeos e armazenar energia. Outra característica é o fato desta enzima possuir sete domínios funcionais conectados entre si. A FASN tipo II, por sua vez, está presente em plantas e bactérias e, diferentemente da FASN tipo I, apresenta sete domínios funcionais independente entre si, formando assim um sistema multicatalítico (CHENG; WANG; CHEN, 2014; LEHNINGER, 2017).

A enzima FASN tipo I também é responsável por catalisar a síntese do ácido graxo *de novo*, em que os substratos são transmitidos a partir de um domínio catalítico para o seguinte, formando uma cadeia de 16 carbonos de ácido graxo saturado (CHENG; WANG; CHEN, 2014; LIU et al., 2010; LEHNINGER, 2017). Além disso, evidências apontam que a síntese de ácido graxo *de novo* e a FASN tipo I

está relacionada aos processos carcinogênicos e a sua inibição pode resultar em apoptose celular em decorrência do ambiente citotóxico criado pelo acúmulo do substrato malonil-CoA (JIANG et al., 2014).

Amplas pesquisas em tecido tumoral humano têm sido feitas para se compreender melhor a regulação da expressão da FASN tipo I e suas funções desempenhadas. Tais pesquisas indicam a FASN tipo I como sendo uma proteína mediadora de processos biológicos. Entretanto, maiores estudos sobre essa proteína deverão ser feitos, pois pouco se conhece a seu respeito (JIANG et al., 2014), principalmente em relação aos seus mecanismos moleculares nas doenças hepáticas.

1.5 O fármaco Triclosan

A análise de inibidores da proteína FASN é de grande importância para a melhor compreensão da atividade dessa proteína, bem como seu efeito no metabolismo celular. Dentre os diversos inibidores da FASN destaca-se o Triclosan (SADOWSKI et al., 2014), o qual se mostrou pertinente para o início das pesquisas a respeito da transdiferenciação epitélio-mesenquimal das CEHs LX-2. Essa escolha do Triclosan foi realizada com objetivo de se investigar sua potencialidade em compor terapias alternativas para as doenças hepáticas, uma vez que ainda não possuem tratamentos eficazes disponíveis.

O Triclosan [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxiacético) fenol – TCS, C₁₂H₇Cl₃O₂] foi originalmente desenvolvido pela empresa *Ciba-Geigy* no ano de 1972. É considerado um agente antimicrobiano, pois realiza a difusão pela parede celular bacteriana, acarretando perturbações na membrana, no RNA, e na síntese proteica (JONES et al., 2000). Devido a essa ação antimicrobiana, o fármaco é utilizado em uma ampla gama de produtos, como por exemplo, plásticos, cosméticos, produtos de limpeza, de higiene pessoal, de consumo em geral e até mesmo produtos têxteis. Como o TCS está presente nessa grande variedade de produtos, a população mundial é diariamente exposta a ele (JONES et al., 2000; YUEH et al., 2014).

Nos Estados Unidos o TCS está classificado entre os sete compostos mais frequentemente detectados nos córregos e, mundialmente, aproximadamente 1500

toneladas continuam a ser produzidas por ano (YUEH et al., 2014). Tais estatísticas levaram à necessidade de maiores estudos sobre a toxicidade do fármaco, pois sua utilização é cada vez mais ampla e sua conseqüente acumulação no corpo humano caracteriza-se por ser um problema sério, principalmente para as populações de países industrializados (TEPLOVA et al., 2017; ZHANG et al., 2017). No Brasil, no ano de 2016, o Ministério Público Federal publicou uma ação civil pública solicitando a proibição do uso do TCS no país. Tal proibição, sob responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), teria como intuito impedir a fabricação, distribuição, comercialização e exportação de qualquer produto que utilize TCS em sua fórmula dentro do território brasileiro. Entretanto, atualmente essa ação ainda permanece em estudo pela Anvisa e o fármaco segue legalizado (MPF, 2016).

1.6 A toxicidade do fármaco Triclosan e o hepatocarcinoma

Pesquisas recentes realizadas por Zhang e colaboradores (2017) relataram que o contato do fármaco com os seres humanos pode ocorrer por meios diretos através de produtos domésticos, exposição à água, exposição ao solo, ingestão de outros organismos que contenham o TCS, etc. Com isso, tem sido demonstrada a associação desse fármaco com várias patologias e distúrbios, dentre elas destaca-se a obesidade, a disfunção da tireoide e a alteração das células mamárias. Além disso, foi detectada também a presença do fármaco no leite humano, no plasma sanguíneo e na urina. Ainda, um estudo realizado por Paul e colaboradores (2010) descreveu que ratas prenhas expostas ao TCS geram filhotes prematuros e portadores de hipotiroxinemia, acarretando défices no neurodesenvolvimento e aumento da morbimortalidade. Em Axelstad e colaboradores (2013), o estudo com ratos também demonstrou que a exposição ao TCS ocasiona a redução dos níveis de tiroxina em ratas prenhas, bem como em ratas em fase de lactação e em seus descendentes. No entanto, ainda não são bem elucidados os mecanismos subjacentes responsáveis por tais doenças e patologias observadas.

Em relação ao nematódeo *C. elegans*, um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2017), concluiu que o TCS claramente induziu toxicidade nesses animais, uma vez que foi constatado que os mesmos apresentaram uma significativa alteração em seu comportamento locomotor, bem como em sua

capacidade reprodutiva quando expostos ao fármaco. Além disso, foi observado que a exposição pré-natal ao fármaco em diferentes concentrações provocou a desregulação de diversos genes responsáveis por funções críticas no organismo, como regulação da proliferação celular, meiose e morfogênese, o que explica a consequente redução do número de ninhadas e do tempo de geração da progênie do animal em estudo.

Em humanos, foi demonstrado em diversos estudos que o TCS prejudica o acoplamento excitação-contração nos músculos esqueléticos e cardíacos (AHN et al., 2008; CHEREDNICHENKO et al., 2012; FRITSCH et al., 2013), atua fortemente como um disruptor endócrino, devido à sua semelhança estrutural com alguns hormônios (SCHUG et al., 2011); interfere na produção e ação do hormônio da tireoide (PAUL et al., 2012); produz alterações da secreção de estradiol e progesterona durante a gravidez (HONKISZ et al., 2012); e age como promotor de tumores em células de câncer de mama e de próstata, devido à sua grande semelhança aos hormônios estrógeno e androgênio (KIM et al., 2015).

Segundo Teplova e colaboradores (2017), além desses efeitos negativos, o TCS também tem a potencialidade de induzir a morte apoptótica em células gengivais de ratos, suprimir o crescimento de células do sistema imune inato humano, de modo a promover alterações no sistema de defesa contra distúrbios imunológicos como a asma, as alergias e até mesmo o câncer. Com isso, é possível observar que o fármaco produz todos esses efeitos prejudiciais por interferir em processos bioquímicos básicos nas células dos organismos. Outras pesquisas recentes realizadas pelo grupo de Teplova e colaboradores (2017) revelaram que a exposição humana à baixas concentrações micromolares de TCS causa a disfunção mitocondrial, o que acarreta na perda de motilidade de espermatozoides, morte necrótica de células pancreáticas produtoras de insulina, acidose metabólica em outras células somáticas, interrupção de produção de ATP em vários tipos de células humanas e diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias de células de hepatocarcinoma humano (HepG2).

Estudos correlatos a investigação dos eventos moleculares e bioquímicos sobre a fibrose hepática mediada pelo TCS foram realizados por Yueh e colaboradores (2014), onde foi observado que, à longo prazo, em ratos tratados

com TCS ocorre a proliferação de hepatócitos, estresse oxidativo e finalmente o estabelecimento da fibrose hepática. Além disso, as análises prévias realizadas em nosso laboratório sugeriram que o TCS possa ser potencialmente hepatotóxico, devido sua ação negativa em CEH crescidas em condições ativadas (fibrosadas) (MIRANDA, 2016).

Atualmente, a busca por terapias alternativas na reversão de doenças hepáticas torna necessária a análise dos efeitos de alguns fármacos conhecidos. Porém, para que o TCS possa também ser utilizado de maneira segura, é necessário que sua atuação nas células do tecido hepático seja melhor avaliada. Assim, é possível investigar a correlação dos possíveis efeitos deletérios do fármaco com a transdiferenciação tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico do fármaco Triclosan (TCS) na transdiferenciação de células estreladas hepáticas LX-2, investigando aspectos celulares e moleculares que potencialmente contribuem para o estabelecimento de características tumorais.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar a proliferação da linhagem celular LX-2 tratada e não tratada com o fármaco Triclosan, por meio de ensaios de MTT;
2. Analisar o potencial genotóxico e mutagênico do fármaco em ensaios celulares do cometa e pela quantificação do aparecimento de micronúcleos;
3. Avaliar a modulação da expressão de genes correlatos aos processos de transdiferenciação epitélio-mesenquimal, estresse oxidativo, metabolismo de xenobióticos e danos no DNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo da solução TCS

A solução estoque de TCS foi preparada na concentração de 10 mM, adicionando-se 0.028954g de TCS e completando até 10 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO). A partir deste primeiro estoque foram realizadas as respectivas diluições necessárias para a experimentação biológica.

3.2 Cultura de Células

Células da linhagem LX-2, estabelecidas por XU et al. (2005), foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM – *Thermo Fisher Scientific*) contendo diferentes concentrações de soro bovino fetal (SBF) a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. As células cultivadas na presença de 2% de SBF foram consideradas como controle experimental por apresentarem características quiescentes. As células cultivadas na presença de 10% de SBF, por sua vez, apresentam características ativadas. Quando necessário, as células LX-2 ativadas foram cultivadas na presença do fármaco TCS nas concentrações de 10 µM ou 50 µM ou na presença dos seus respectivos eluentes (DMSO 0,5% v/v e DMSO 1% v/v) (MIRANDA, 2016). As concentrações de DMSO equivalentes a 70,4 mM (0,5% v/v) e 140,8 mM (1% v/v) foram utilizadas por corresponderem ao montante usado na eluição do TCS testado nas culturas. Além disso, as análises comparativas entre as culturas foram sempre processadas para se avaliar o real efeito da droga nas culturas ativadas. Para a realização dos ensaios celulares, as linhagens foram cultivadas regularmente em garrafas de 25 ou 75 cm², removidas por tripsinização e contadas em câmara de Neubauer.

3.3 Teste de Viabilidade Celular

O clássico ensaio de MTT foi realizado adaptando-se a metodologia descrita por MONSMAN (1983). Para isso, células LX-2 crescidas em 10% de SBF foram cultivadas e incubadas com diferentes concentrações de DMSO ou TCS para se avaliar a viabilidade celular após essa incubação com as drogas. Ambos os ensaios

foram realizados em microplacas de 96 poços contendo 8×10^3 células em 100 μ l de meio de cultura (DMEM), sendo as células cultivadas até atingirem a confluência igual a 80%. Em seguida, diferentes concentrações do solvente DMSO foram adicionadas nas culturas para se avaliar o potencial citotóxico e a viabilidade do eluente (0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7%, 10% e 40% v/v). Em relação ao TCS, diferentes concentrações também foram escolhidas para os ensaios, tendo-se como base o descrito na literatura (GUO et al., 2012), sendo as concentrações de TCS utilizadas nos ensaios subsequentes iguais a 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 e 200 μ M. Em ambos os testes, foi acrescentado ao meio de cultura DMEM o DMSO ou TCS, sendo os procedimentos metodológicos realizados nos testes de viabilidade celular semelhantes para as duas drogas. As diferentes drogas adicionadas às culturas celulares foram então incubadas em estufa a 37 °C em 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, em cada poço da microplaca foi adicionado meio de cultura contendo 0,5 mg/ml de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-difeniltetrazólio), seguido de nova incubação das culturas a 37 °C em 5% de CO₂ por 4 horas. Durante esse período ocorreu a ação da enzima desidrogenase succínica, que reduz os sais amarelos de tetrazólio MTT em sais azuis arroxeados de formazan por meio da atividade mitocondrial celular. Após essa reação, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μ l de DMSO e a placa incubada durante 12h. Os resultados foram avaliados através do leitor de absorvância *Spectra Count* no comprimento de onda de 570 nm. O controle experimental foi o grupo de células LX-2 cultivadas em 10% de SBF e não tratadas com o fármaco e/ou com o eluente. Nesse grupo experimental a viabilidade celular foi considerada 100%. Para os tratamentos com DMSO ou TCS em diferentes concentrações, a viabilidade celular foi calculada a partir do valor do comprimento de onda do grupo controle.

3.4 Ensaios de Toxicidade

3.4.1 Ensaio do cometa

Para a realização do ensaio do cometa foram utilizadas 5×10^5 células por condição de cultura, as quais foram contadas por meio da câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram adicionadas em detergente para a lise de suas

membranas e suas proteínas nucleares foram extraídas por meio de altas concentrações de sais. Após a lise das membranas celulares, foi possível confeccionar as lâminas através da mistura de 20 µL de suspensão celular com 120 µL de agarose LMP. Posteriormente, este volume (140 µL) foi pingado sobre as lâminas previamente identificadas e pré-gelatinizadas com agarose e foi submetido à uma corrida de eletroforese à 40 V, 300 mA por 20 minutos, seguido de neutralização com solução de neutralização 3 vezes por 5 minutos, secagem e fixação em etanol P.A. por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente secadas e coradas com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain/Biotium* para serem imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 51-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Os tratamentos foram realizados em triplicatas, sendo analisados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por tratamento com o fármaco em estudo.

3.4.2 Teste do Micronúcleo (MN)

Para investigar o efeito do TCS na formação de MNs nas células LX-2 e seu consequente potencial mutagênico, foram realizadas análises utilizando-se microscopia de fluorescência, onde foram adotados os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 3.1. Para tais análises, 5×10^5 células foram crescidas sobre lamínulas circulares, de 13 mm de diâmetro, em placas de 24 poços e estas foram utilizadas em cada condição experimental. Os tratamentos foram realizados em triplicatas e as células foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 3.8% por um intervalo de 5 minutos a 37 °C e, em seguida, coradas com uma solução de 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) a 3,33 ng/ mL por 3 minutos, seguido de extensa lavagem com PBS 0.5 X (1 x PBS = 0,13 M de NaCl, 2,69 mM de KCl, 2,09 mM de Na₂HPO₄.12H₂O, 1,46 mM de KH₂PO₄ e 1000 mL de H₂O destilada). As lamínulas foram então montadas em lâminas apropriadas na presença de solução de N-propil galato e analisadas com o auxílio de um microscópio de fase modelo BX51 *OLYMPUS* acoplado a um sistema fotográfico.

3.5 Análises de Expressão de Genes

3.5.1 Extração de RNA

Para realizar a análise da expressão gênica, foram coletados extratos das células LX-2 estudadas para se extrair o RNA mensageiro (mRNA). Para isso, as células LX-2, tratadas ou não com o fármaco e seus respectivos solventes, foram coletadas por meio do processo de tripsinização após atingirem 90% de confluência. Em seguida, essas células foram lavadas com PBS 1 X e armazenadas em freezer - 80 °C.

Posteriormente, para a extração do mRNA, os extratos celulares foram ressuspensos em 500 µl de TRIZOL® *Reagent* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos, de acordo com as recomendações do fornecedor. Em seguida, para cada 1,0 mL de TRIZOL® foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio seguido de agitação intensa do microtubo por 15 segundos e 2 minutos de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm durante 15 minutos à 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico (100%) para cada 1,0 mL de TRIZOL®, e posterior incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de mRNA lavado com 1,0 mL de etanol 75% para cada 1,0 mL de TRIZOL®. Em seguida, os microtubos foram invertidos 5 vezes e centrifugados à 8000 rpm por 5 minutos à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o RNA de interesse foram colocados em um fluxo laminar durante 5 minutos, para que ocorresse a secagem do precipitado, o qual foi ressuspensado em 32,0 µL de água livre de RNase. Por último, foi averiguada a qualidade e quantidade do material extraído em aparelho espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (*GE Healthcare*), considerando-se a razão A260/A280 e A260/A230. Para as reações de transcrição reversa foram utilizados 200 ng do mRNA extraído.

3.5.2 Transcrição Reversa

Para a transcrição reversa, ou seja, sintetização do DNA complementar (cDNA), foram utilizados 200 ng de RNA, enzima transcriptase reversa do vírus de mioblastoma aviária (AMV Reverse Transcriptase) e reagentes contidos no produto comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific)*, seguindo as recomendações do fornecedor. Reações independentes de transcrição reversa foram processadas com os RNAs extraídos e previamente descritos no item 3.5.1. As reações foram processadas por meio do termociclador *Mastercycler® ep (Eppendorf)* e os ciclos de temperatura seguiram a recomendação do fornecedor: 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos para que ocorresse a inativação enzimática.

O cDNA foi então diluído na proporção 1:10 e estocado à -20 °C até sua utilização como molde em reações de polimerização em cadeia (PCR) semi-quantitativa (RT-PCR) e/ou quantitativa em tempo real (qPCR), enquanto que o excedente da amostra de RNA total extraído foi armazenado à -80 °C.

3.5.3 Reações de Polimerização em Cadeia

Para se avaliar o padrão transcricional de genes, reações de RT-PCRs e/ou qPCRs foram realizadas utilizando oligonucleotídeos dos genes alvo, previamente desenhados por meio do programa computacional *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Os genes avaliados são correlatos ao processo de transdiferenciação epitélio-mesenquimal (*ECAD*, *NCAD*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAIL*, *VIM* e *CS*), ao estresse oxidativo (*SOD1*, *CAT*, *GPx1* e *GSR*), ao metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*) e aos danos no DNA (*ERCC1* e *APEX1*). Tais genes selecionados foram utilizados para diferentes grupos celulares investigados. Como normalizador foi utilizada a expressão transcricional do gene *β -actina*.

Nas reações de PCR semiquantitativa foram utilizados os oligonucleotídeos listados na tabela 01. As reações foram processadas utilizando tampão de reação PCR, 0,4 mM de oligonucleotídeos direto e reverso específicos para o gene em estudo, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1,5 mM de MgCl₂, enzima *Taq*

DNA polimerase (0,025 U/ μ l) e 2,0 μ l de cDNA (diluído na proporção de 1:10 a partir dos mRNAs transcritos), totalizando um volume final de 15,0 μ l. As reações foram processadas em termociclador *Mastercycler® ep* (*Eppendorf*), onde foram realizados 33 ciclos de amplificação, os quais equivaleram a uma desnaturação (95 °C por 1 minuto), um anelamento (seguindo a temperatura específica de anelamento dos oligonucleotídeos por 1 minuto), e extensão (72 °C por 3 minutos). Após concluído os ciclos, as amostras amplificadas foram submetidas à uma eletroforese em gel de agarose 0,9% corada com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (*Biotium*). O resultado foi então fotografado por meio do equipamento *MiniBIS Pro* (*DNR BioImaging System*) e quantificado com o software *Image-J* (programa de domínio público desenvolvido pelo *National Institute of Health, USA*). Como referencial, foi utilizado o valor das análises realizadas com as células LX-2 2%, ou seja, células quiescentes crescidas em 2% de SBF e isentas de qualquer tipo de tratamento farmacológico.

Tabela 01. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR semiquantitativa e suas respectivas temperaturas de anelamento (T_m).

Gene	Sequência (5'-3')		T_m (°C)
	Direto	Reverso	
<i>β-actina</i>	GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	55
<i>NCAD</i>	CACAGATTCGGGTAATCCTC	CTTCTCCTCCACCTTCTTCA	47
<i>VIM</i>	GCTCAGATTCAGGAACAGCA	TTCCAGGGACTCATTGGTTC	49

Além das reações de PCR convencional, reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas. Para isso, oligonucleotídeos (Tabela 02) e reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems®– Thermo Fisher Scientific*) foram utilizados. As reações foram processadas em placas de 96 poços, vedadas com selo óptico (*Applied Biosystems®Micro Amp Optical Adhesive Film - Thermo Fisher Scientific*). As reações de qPCR foram processadas utilizando-se 1 μ L de cDNA (na diluição 1:10 dos RNAs transcritos), 1,5 μ L de oligonucleotídeos específicos e 2,5 μ L de *SYBR® Green PCR Master Mix*, totalizando um volume final igual a 5 μ L. Em seguida, as reações foram submetidas ao aparelho *Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR* utilizando-se o modo de análise baseado no Ct

(ΔC_t) para uma comparação de quantificação relativa, sendo a β -actina utilizada como gene normalizador.

Tabela 02: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Sequência (5'-3')	
	Direto	Reverso
<i>β-actina</i>	GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC	CTCCTTAATGTCACGCAC
<i>ECAD</i>	GATCACAGTCACTGACACCA	GTGACGAATGTGGTACCTTT
<i>ZEB1</i>	GATGATGAATGCGAGTCAGATGC	CTGGTCCTCTTCAGGTGCC
<i>ZEB2</i>	AATGGACTGCAAGGCTGAAG	CGACAGGCGGAATATTAGGA
<i>SNAIL</i>	CCTCCCTGTCAGATGAGGAC	GCCTCCAAGGAAGAGACTGA
<i>SOD1</i>	AGGGCATCATCAATTTGAG	GTGAGGACCTGCACTGGTAC
<i>CAT</i>	CGTGCTGAATGAGGAACAGA	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG
<i>GPx1</i>	TTGACATCGAGCCTGACATC	ACTGGGATCAACAGGACCAG
<i>GSR</i>	ATCCATATGCAGGGACTTGG	GTAGGGTGAATGGCGACTGT
<i>CYP1A1</i>	TTCCCTGATCCTTGTGATCC	GGAGATTGGAAAAGCATGA
<i>ERCC1</i>	CTACAGCCAGTGCATCTCCA	CTCCTGAAACAAGGCACCTC
<i>APEX1</i>	ATATTGCTTCGGTGGGTGAC	GCTCTGTCCTGAGCTATCC

3.6 Análises Estatísticas

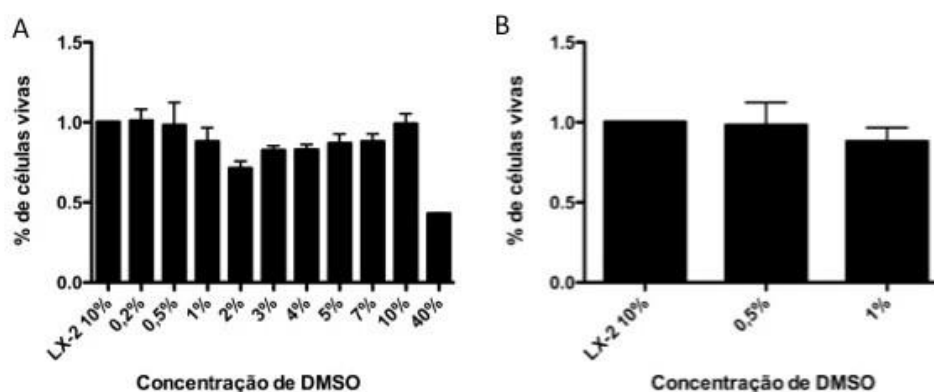
Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do programa computacional *GraphPad*, versão 5.0 (*Prism Inc.*) utilizando cálculos de variância simples (*ANOVA One- Way*), seguidos pelo teste de *Dunnet* e pelo teste de *Tukey*. Para significância estatística, foi adotado o valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Cultura de células e ensaios de viabilidade celular

Para se avaliar o potencial citotóxico de dez concentrações diferentes do solvente DMSO em células LX-2 ativadas, o clássico ensaio de MTT foi realizado (MONSMAN, 1983). Inicialmente, a citotoxicidade do solvente DMSO foi analisada. Para isso, as culturas celulares foram crescidas e incubadas com DMSO nas condições descritas no item 3.2 por 24 horas. Os resultados obtidos demonstraram que, em comparação com a cultura celular sem adição de DMSO (controle experimental do ensaio), a concentração de 40% v/v de DMSO limitou em 50% a viabilidade celular, enquanto que as demais concentrações investigadas apresentaram uma boa porcentagem de células vivas (acima de 70%), assegurando assim a viabilidade do experimento realizado com o TCS (Figura 04 A). A partir dos resultados obtidos, as concentrações de 0,5% v/v (70,4 mM) e 1% v/v (140,8 mM) de DMSO foram selecionadas considerando-se a concentração de TCS a ser utilizada nos ensaios subsequentes (Figura 04 B).

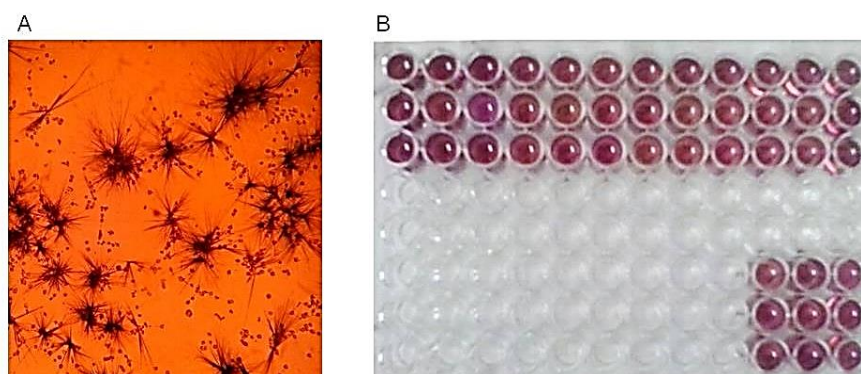
Figura 04: Ensaio de MTT. Células LX-2 crescidas em 10% de SBF foram tratadas com DMSO ou não (controle) em diferentes concentrações, durante um intervalo de 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Dunnet*, com significância estatística $p < 0.05$. **A:** Grupo controle e as dez concentrações de DMSO investigadas. **B:** Grupo controle e as duas concentrações escolhidas para serem utilizadas nos ensaios subsequentes.



Após as padronizações iniciais, ensaios de viabilidade celular foram realizados utilizando-se diferentes concentrações do fármaco TCS, variando de 0,1 μM a 200 μM . O ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita no item 3.3. Após a incubação com o fármaco durante um intervalo de 24 horas, foi adicionado

meio de cultura contendo MTT, seguindo-se de nova incubação durante um novo intervalo de 4 horas. Nos ensaios foram produzidos cristais de formazan (Figura 05 A), os quais indicaram a atividade mitocondrial celular e de maneira indireta demonstraram o número de células vivas, o que viabiliza a mensuração da viabilidade e proliferação celular. Quando esses cristais são dissolvidos em DMSO sua coloração torna-se púrpura, indicando a viabilidade celular dos tratamentos (Figura 05 B).

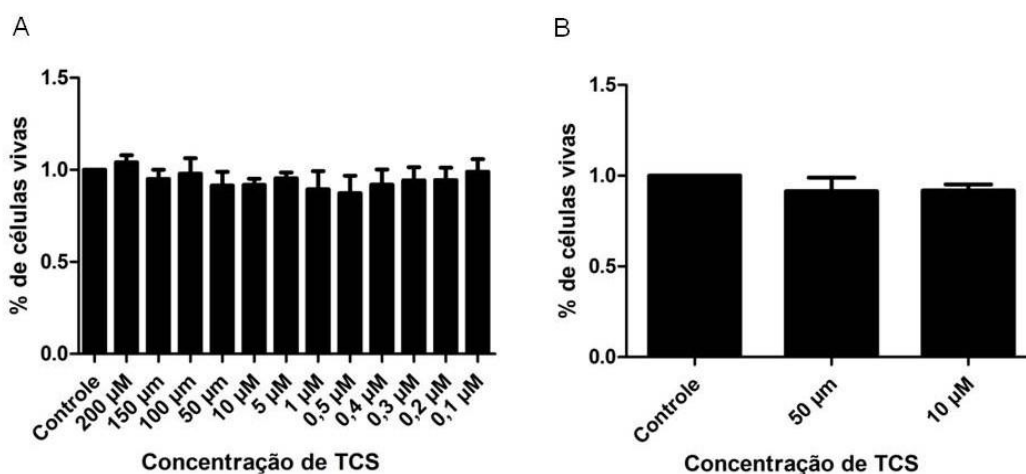
Figura 05: Viabilidade das células LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas com TCS ou não (controle) em diferentes concentrações durante 24 horas. **A:** Cristais de formazan produzidos em células tratadas com TCS 50 μM após 4 horas de incubação em solução contendo 0,5 mg/ mL de MTT. **B:** Dissolução dos cristais de formazan em microplacas de 96 poços, tornando a coloração dos tratamentos púrpura. Os cristais de formazan indicam a viabilidade celular em todos os tratamentos.



Utilizando-se o leitor de absorvância *Spectra Count* os resultados obtidos nos ensaios foram mensurados e demonstraram que não houve alteração significativa na viabilidade das células LX-2 ativadas em nenhuma das doze concentrações de TCS investigadas, em comparação às células não tratadas com o fármaco (grupo controle) (Figura 06 A). Porém, no intervalo de 24 horas, as concentrações de TCS 10 μM e TCS 50 μM apresentaram um início de variação morfológica em relação ao grupo controle (dados não mostrados), sem afetar a viabilidade celular (Figura 06 B). Assim, as concentrações de TCS 10 μM e TCS 50 μM foram escolhidas para serem utilizadas nos ensaios subsequentes, sendo as concentrações de DMSO equivalentes iguais a 0,5% e 1,0%, respectivamente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e as análises foram feitas utilizando-se *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Dunnet*, com significância estatística $p < 0.05$.

Figura 06: Ensaio de MTT. Células LX-2 cultivadas em 10% de SBF foram tratadas com TCS ou não (controle) em diferentes concentrações por um intervalo de 24 horas e a citotoxicidade foi avaliada. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Dunnet*, tomando-se como significância estatística $p < 0.05$. **A:** Grupo controle e as doze concentrações de TCS selecionadas a partir da literatura. **B:** Grupo controle e as duas concentrações com início de variação morfológica celular (dados não mostrados).



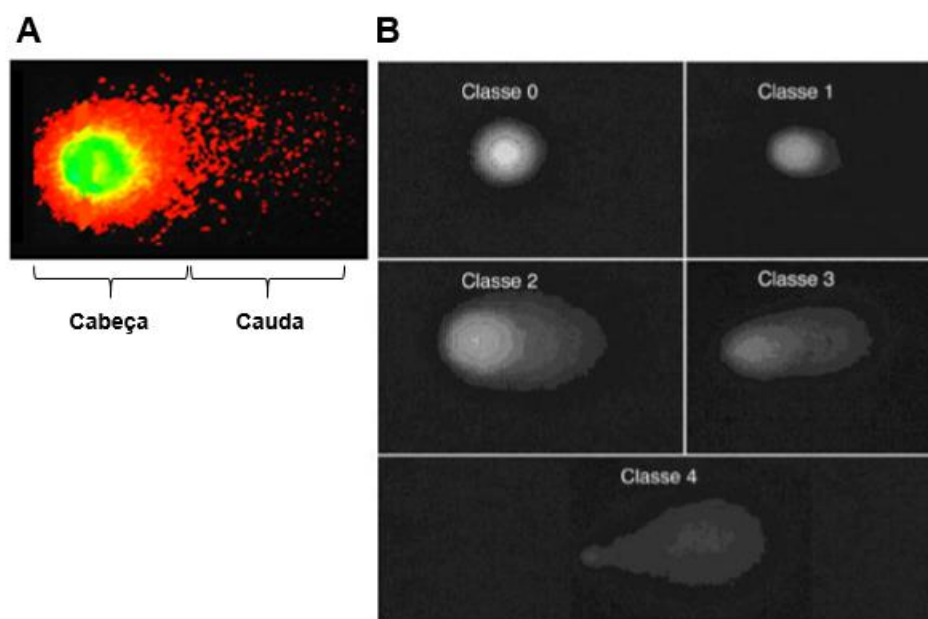
4.2 Ensaios de Toxicidade

4.2.1 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa, também conhecido como eletroforese alcalina em gel de célula única (*Single-Cell Gel*), foi realizado com objetivo de se investigar o potencial genotóxico do fármaco Triclosan nas células LX-2 cultivadas em diferentes condições. Por meio do ensaio foi possível analisar a presença ou não de lesões genômicas nas células, sendo tais lesões passíveis de correção e responsáveis por ocasionarem mutações após serem processadas (GALUCIO, 2014). A técnica resultou no DNA ocupando todo o espaço das células no gel, gerando uma estrutura que se assemelha ao núcleo, sendo denominada nucleóide. O nucleóide consiste em alças superenoveladas de DNA aderidas à matriz nuclear residual. A lesão genômica causada na célula se caracteriza pela quebra dessas moléculas de DNA, o que ocasiona o desenovelamento das alças. Com isso, ocorre a formação de um halo, o que indica a ocorrência de mudanças no nucleóide das células em estudo (COLLINS et al. 2008; GALUCIO, 2014).

Durante o ensaio, após a lise das membranas celulares e exposição do DNA à indução eletroforética, ocorreu o aumento na migração de DNA cromossomal do nucleóide em direção ao polo negativo (ânodo). Essa migração fez com que o DNA adquirisse um formato de cometa, uma vez que foi possível observar a presença de uma região nuclear que se assemelha à uma cabeça, seguida de uma cauda (Figura 07 A) (BRIANEZI et al. 2009). A avaliação dos cometas gerados foi realizada através da medição do comprimento da cabeça e da cauda por meio de microfotografia. Assim, por meio de análises visuais cinco tipos de cometas foram classificados, os quais variam em uma escala de 0 a 4 (Figura 07 B). A escala 0 (zero) representa células sem dano evidente, em que os cometas não apresentam cauda ou são pouco detectáveis, enquanto que as escalas de 1 a 4 representam um aumento significativo no comprimento das caudas (COLLINS et al. 2008). Somando-se os valores de 0 a 4 dos 300 nucleóides analisados em cada lâmina de cada tratamento com o fármaco em estudo, foi possível obter um resultado individual.

Figura 07: Ensaio do cometa. **A:** Representação do cometa e suas subdivisões em cabeça e cauda. **B:** Classificações dos cometas de acordo com intensidade de fluorescência na cauda. Classe 0 indica ausência de danos, enquanto que a classe 4 indica dano máximo.

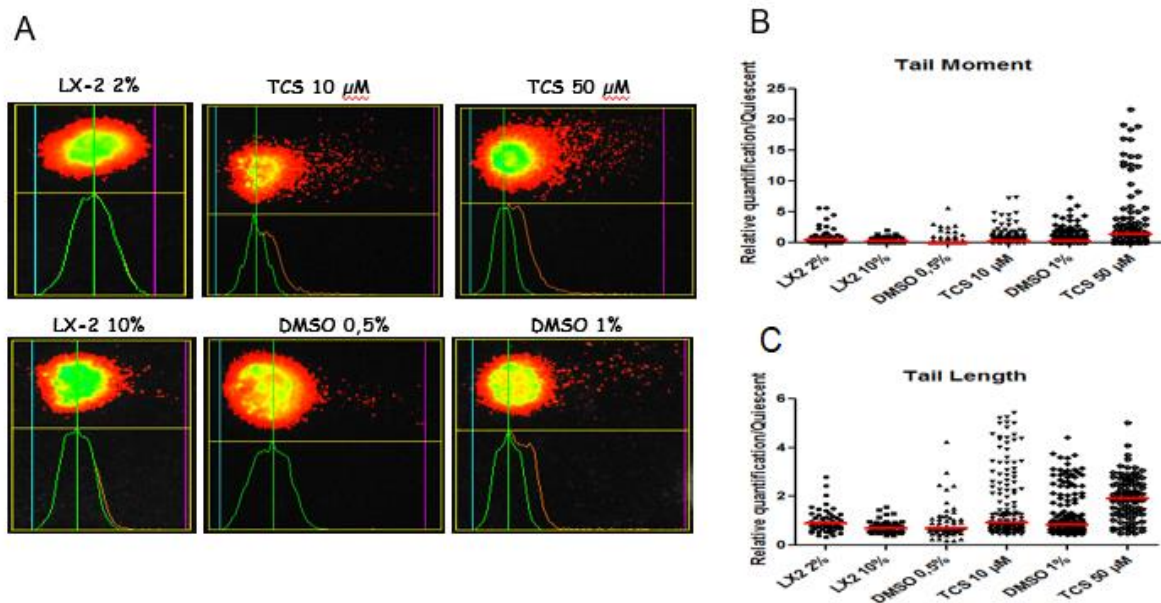


Fonte: GALUCIO, 2014.

Após as análises das lâminas preparadas no ensaio do cometa (através de microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 51-560 nm e filtro de barreira de 590 nm), observou-se que o índice de dano ocasionado nas células está relacionado à concentração do fármaco TCS utilizado. Os resultados obtidos

apontam que células LX-2 ativadas tratadas com TCS 10 μM não apresentaram taxas de genotoxicidade significativas, enquanto que LX-2 ativadas tratadas com TCS 50 μM apresentaram um ligeiro aumento no dano (Figura 08 A). Em relação às demais condições em estudo (LX-2 ativadas, LX-2 ativadas tratadas com DMSO 0,5% e LX-2 ativadas tratadas com DMSO 1%), todas apresentaram lesões genômicas próximas a zero em relação ao comprimento da cabeça do cometa (Figura 08 B – *Tail Moment*), e próximo a 1 em relação ao tamanho da cauda (Figura 08 C – *Tail Length*). Além disso, nota-se também que todos esses demais tratamentos apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle, o que indica que não está ocorrendo genotoxicidade celular significativa, sendo que o mesmo também ocorre com as células cultivadas com a menor concentração de TCS (10 μM). Por outro lado, os resultados obtidos pelo ensaio do cometa mostraram que o dano no DNA das células tratadas com TCS 50 μM foi o dobro em comparação às demais condições em estudo, tornando os comprimentos da cabeça e da cauda do cometa maiores.

Figura 08: Ensaio do cometa em cultura celular LX-2 cultivadas em 2% de SBF, LX-2 cultivadas em 10% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% e 1% v/v) e TCS (10 μM e 50 μM). **A:** Imagens de microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 51-560 nm e filtro de barreira de 590 nm) dos cometas formados. Os tratamentos foram realizados em triplicatas e as células foram coradas com *GeiRed*. **B e C:** Quantificação do comprimento da cabeça (*Tail Moment* – **B**) e da cauda do cometa (*Tail Length* – **C**) para mensuração das lesões genômicas de células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF sem ou com adição de DMSO (0,5% e 1% v/v) e TCS (10 μM e 50 μM). As análises foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.



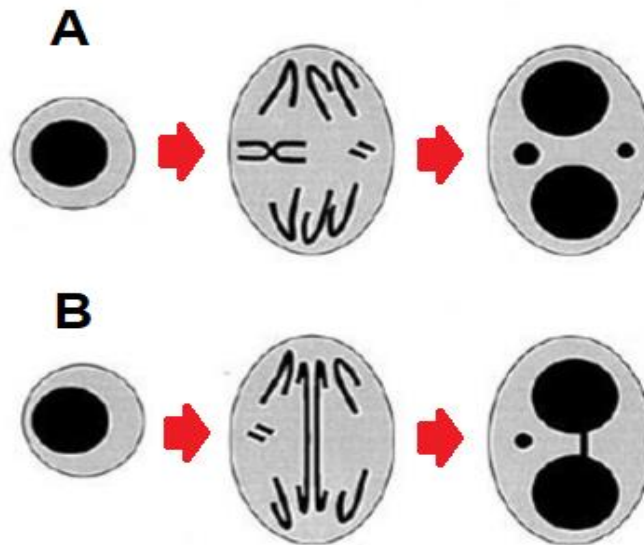
Conjuntamente, a partir dos resultados obtidos pelo ensaio do cometa e os resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT), infere-se que o início das variações morfológicas apresentadas no MTT em células tratadas com TCS 50 μM (dados não mostrados) não afetaram a viabilidade celular, porém, possam ser um indicativo de toxicidade celular do fármaco. A possível genotoxicidade do TCS em maior concentração (50 μM) pode estar relacionada, segundo Bolton e colaboradores (2000), à produção de espécies reativas de oxigênio, os quais são responsáveis por ocasionar estresse oxidativo grave no interior das células, devido às alterações nas macromoléculas celulares (lipídeos, proteínas e DNA). Sendo assim, análises da expressão de genes correlatos ao metabolismo celular também foram realizados para se compreender melhor o potencial genotóxico do TCS.

Além dessas análises, o teste do micronúcleo também foi realizado para se investigar o potencial mutagênico gerado pelas lesões genômicas ocasionadas pelo tratamento celular com TCS 50 μM . Os resultados obtidos por esses ensaios são discutidos a seguir.

4.2.2 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético que identifica danos presentes em cromossomos e visualiza a presença ou ausência de micronúcleos (MNs) formados. Os MNs são definidos como massas nucleares pequenas delimitadas por membrana e separadas do núcleo principal, sendo formados a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos ou inteiros que não foram incluídos no núcleo principal após o ciclo de divisão celular (Figura 09). Por conta dessas características, o teste do MN é comumente utilizado para o rastreamento de produtos químicos com potencial genotóxico (FENECH, 2000; FLORES, 2008; SANTOS; NARDIN, 2014), como no caso do fármaco TCS, foco do presente estudo.

Figura 09: Representação esquemática da origem da formação dos micronúcleos (MNs). **A:** Representação de dois MNs, sendo um de origem do fragmento de um cromossomo acêntrico e o outro proveniente de cromossomo inteiro. **B:** Representação da formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir do fragmento de um cromossomo.



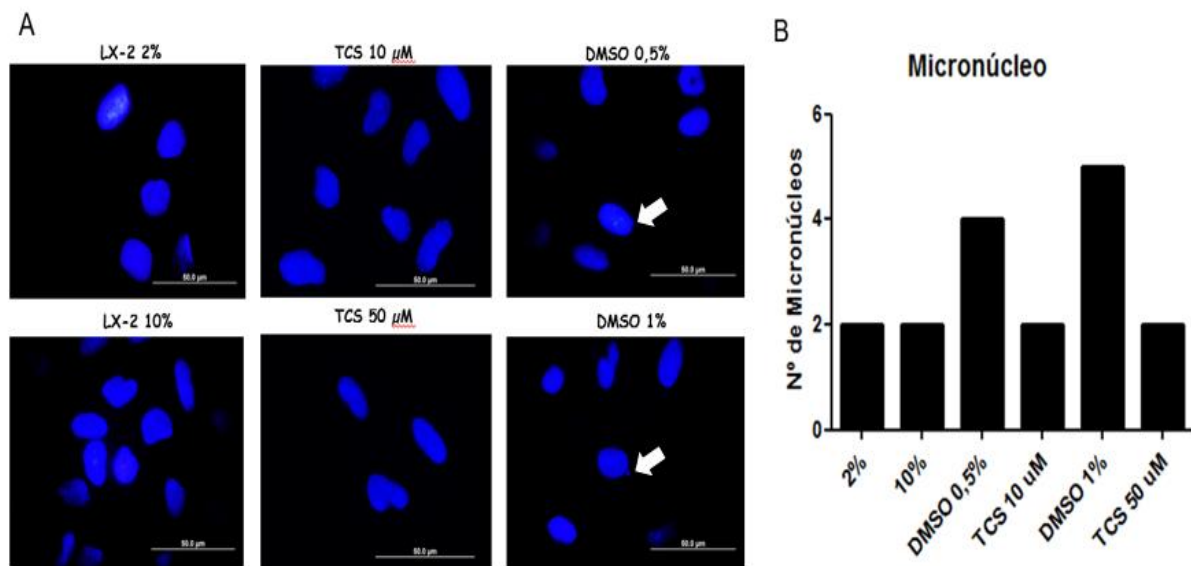
Fonte: Adaptado de Fenech, 2000.

Assim, foi analisado o potencial mutagênico do TCS pela quantificação da formação de MNs em culturas celulares LX-2 tratadas ou não com o fármaco. Para isso, foram realizadas análises de microscopia de fluorescência e as diferentes condições celulares em estudo foram coradas com DAPI. A Figura 10 apresenta os resultados das análises do núcleo celular de LX-2 quiescentes, LX-2 ativadas, LX-2 ativadas tratadas com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e LX-2 ativadas tratadas com TCS (10 μ M e 50 μ M), sendo analisadas no total 100 células para cada condição em estudo.

Os resultados demonstraram que tanto as células LX-2 quiescentes, quanto as LX-2 ativadas apresentaram baixa quantidade de MNs, o que já era esperado, uma vez que ambas as células não entraram em contato com agentes potencialmente mutagênicos. Ainda na Figura 10 pode-se observar que ambas as concentrações de DMSO (0,5% v/v e 1,0% v/v) induziram a formação de MN. Os resultados demonstraram aumento significativo na quantidade de MNs, enquanto que o mesmo não ocorreu em ambas concentrações de TCS (10 μ M e 50 μ M). Ou

seja, o fármaco TCS em suas duas concentrações estudadas não apresenta potencial mutagênico, pois não houve fragmentação cromossômica significativa e, conseqüentemente, as alterações no material genético das células não foram desencadeadas. Contrariamente ao TCS, os resultados tanto para DMSO 0,5% (v/v) quanto para DMSO 1% (v/v) sugerem que a presença do DMSO, em cultura celular, seja possivelmente responsável pelo surgimento de aberrações cromossômicas e conseqüente mutagenicidade. Isso se deve ao fato do DMSO ser um composto químico tóxico que possui alta capacidade de interagir com ácidos nucléicos, lipídeos, proteínas e muitas drogas, o que o leva a apresentar alta penetração e difusão celular (FLORÃO et al, 2007). Tais características intensificam a capacidade do DMSO de carrear muitas substâncias pelas membranas celulares (FLORÃO et al, 2007; Yi et al., 2017), dentre elas o TCS. Sabendo-se disso, pode-se inferir que nos resultados obtidos o fármaco TCS está potencialmente agindo como um protetor celular dos danos mutagênicos do DMSO.

Figura 10: Teste do Micronúcleo. **A:** Microscopia de fluorescência de cultura celular LX-2 cultivadas em 2% de SBF, LX-2 cultivada em 10% de SBF e LX-2 cultivada em 10% de SBF tratada ou não com DMSO (0,5% e 1% v/v) e TCS (10 μ M e 50 μ M). O núcleo celular foi corado com DAPI, apresentando coloração azul. Setas brancas: micronúcleos. **B:** Quantificação dos micronúcleos presentes nas culturas celulares estudadas. As análises estatísticas foram realizadas aplicando-se *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.



Comparativamente, o ensaio do cometa demonstrou que culturas celulares LX-2 ativadas tratadas com TCS 50 μ M apresentaram maior potencial citotóxico,

enquanto que o ensaio do MN para essa mesma condição celular mostrou citotoxicidade baixa e semelhante às células controle. Em relação às células tratadas com ambas as concentrações de DMSO ocorreu o oposto, pois a alta citotoxicidade foi demonstrada apenas no teste do MN. Com isso, pode-se inferir que o TCS 50 μM é possivelmente genotóxico, mas não é potencialmente mutagênico. Ou seja, o dano celular causado pelo fármaco pode ser considerado reversível.

4.3 Análises de expressão gênica: PCR semiquantitativa (RT-PCR) e PCR em tempo real (qPCR)

Após a extração do mRNA das células LX-2 cultivadas nas diferentes condições em estudo, o mesmo foi convertido em cDNA e reações de PCR foram realizadas para se avaliar a modulação da expressão de genes ocasionada pelos efeitos do TCS. Para isso, o mRNA foi transcrito e em seguida a qualidade das amostras foi verificada pela amplificação do gene normalizados β -actina em reações de PCR semiquantitativa (Figura 11).

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do gene β -actina, para a verificação da qualidade dos mRNAs extraídos e a transcrição reversa.



Após a verificação da qualidade dos cDNAs das amostras, reações de PCR semiquantitativa e de PCR em tempo real foram realizadas para avaliar a expressão de genes relevantes nos processos de transdiferenciação epitélio-mesenquimal (*ECAD*, *NCAD*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAIL* e *VIM*), estresse oxidativo (*SOD1*, *CAT*, *GPx1* e *GSR*) e metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*), além de genes correlatos aos mecanismos de dano/reparo de DNA (*ERCC1* e *APEX1*). Para todas as análises de expressão de genes foram adotadas as células LX-2 quiescentes como controle experimental. Os resultados são apresentados a seguir.

4.3.1 Análise molecular da transdiferenciação epitélio-mesenquimal (TEM):

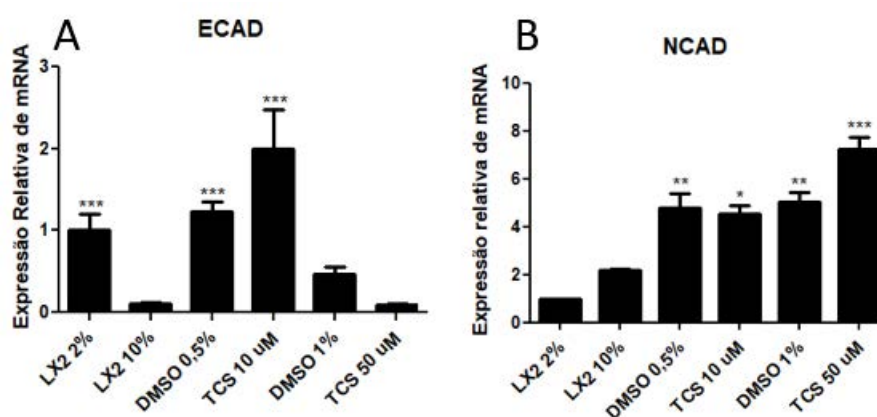
A Figura 12 apresenta os resultados das análises de expressão transcricional dos genes das caderinas (*ECAD* e *NCAD*). Caderinas são moléculas de adesão caracterizadas por serem dependentes de cálcio e capazes de se aderirem em células vizinhas (BERX; ROY, 2009). Por conta dessa dependência, as variações nas quantidades e proporções de *ECAD* e *NCAD* nas junções aderentes são responsáveis por desencadear mudanças nas células (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009). Um exemplo dessas mudanças é a transdiferenciação de um fenótipo epitelial para maligno devido à ocorrência de dominância de adesão baseada apenas em *NCAD* (STRAUB et al., 2011).

A maioria dos carcinomas humanos são derivados dos tecidos epiteliais e a *ECAD* é uma das caderinas mais diretamente relacionadas. À medida que as células se transdiferenciam para estabelecimento de um carcinoma, muitas vezes ocorre a ausência parcial ou completa da expressão da *ECAD*, o que facilita a progressão à malignidade. Vários genes estão relacionados com a regulação da expressão da *ECAD*, dentre eles destacam-se *ZEB* e *SNAIL*. Durante o evento de TEM, ocorre a atuação desses genes na repressão da *ECAD* e, em consequência, a alta expressão da *NCAD* é induzida. A superexpressão da *NCAD* em quadros tumorais, mesmo quando a *ECAD* ainda é expressa, acarreta mudanças na morfologia das células, bem como aumento da motilidade, dispersão, invasividade e capacidade metastática das células, o que colabora ainda mais para o avanço da malignidade (BERX; ROY, 2009).

Os resultados encontrados com a análise do gene *ECAD* (Figura 12 A) mostraram que houve diferença significativa para células LX-2 quiescentes e LX-2 ativadas. Sabendo-se que através das culturas de LX-2 ativadas é possível analisar o efeito da droga utilizada nas demais culturas, pode-se observar que nessa condição de estudo houve uma expressão gênica bastante baixa. O tratamento com DMSO 0,5% v/v, por sua vez, aumentou significativamente o nível de expressão da cultura ativada, aproximando-se do valor de referência obtido na cultura quiescente. No tratamento com DMSO 1,0% v/v também houve aumento da expressão da cultura ativada, porém esse aumento foi mais ligeiro e não estatisticamente significativo. Em relação aos tratamentos com TCS, nota-se que em baixa

concentração (TCS 10 μM) ocorreu aumento do nível de expressão da cultura ativada de modo a essa expressão ser aproximadamente o dobro da encontrada nas culturas quiescentes. Entretanto, em alta concentração (TCS 50 μM) não houve alteração na expressão da cultura ativada, permanecendo próxima a zero. Em contrapartida, o resultado para o gene *NCAD* (Figura 12 B) não apresentou diferença significativa entre as células LX-2 quiescentes e LX-2 ativadas. No entanto, diferentemente da *ECAD*, o gene *NCAD* apresentou aumento de sua expressão em todas as condições de estudo em culturas ativadas (Figura 12 B).

Figura 12: Níveis de expressão relativa dos mRNA *ECAD* e *NCAD* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μM e 50 μM). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real e PCR convencional, respectivamente. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde *** $p < 0,0005$ e * $p < 0,05$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.

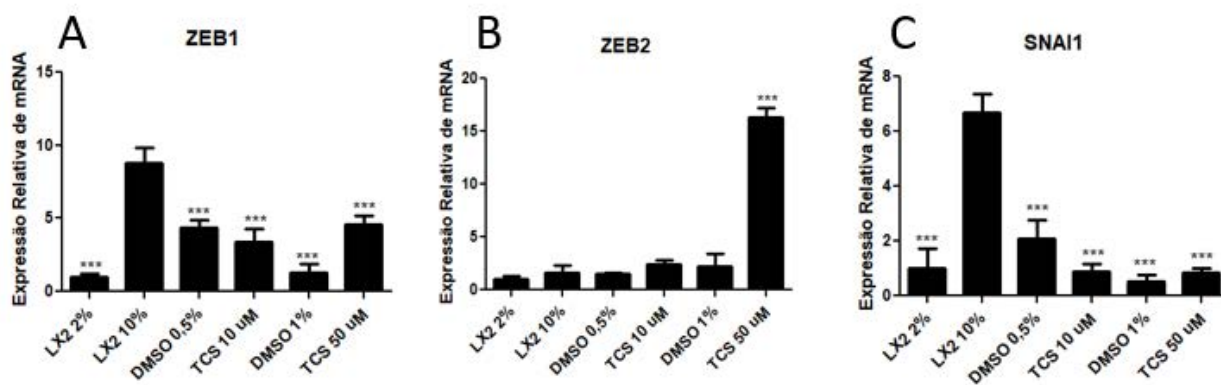


Tais resultados demonstraram que a expressão baixa e/ou quase ausente da *ECAD* nas células ativadas indica a existência de um processo de TEM, além de alteração do metabolismo celular e mesmo uma possível progressão celular para uma malignidade. O mesmo ocorreu com células tratadas com TCS 50 μM . Inversamente, a análise da expressão do gene *NCAD* apresentou aumento dos níveis de expressão em todos os tratamentos realizados. Sendo assim, os resultados combinados reforçam a criação de um ambiente hepatotóxico pelo fármaco em alta concentração (TCS 50 μM), sendo passível de maiores análises investigativas.

Segundo Jia e colaboradores (2016), a inibição da *ECAD* por *ZEB* ou *SNAIL* é considerada como sendo marcadora da TEM e diretamente relacionada com a intensificação da metástase, pois resulta na perda das junções célula-célula e ganho

na capacidade migratória e invasiva. Com isso, *ZEB1*, *ZEB2* e *SNAIL* foram alguns dos genes selecionados para investigar a relação do TCS com a criação do ambiente hepatotóxico (Figura 13). *ZEB1* e *ZEB2* são fatores de transcrição pertencentes à família *ZEB* que se ligam ao DNA promotor de genes alvos e juntos formam um ciclo de *feedback* duplo negativo que regula todo o equilíbrio da TEM. As interações entre *ZEB* e componentes de diferentes complexos co-repressores e co-ativadores são essenciais para que ocorra a repressão e a ativação transcricional. Além disso, *ZEB1* e *ZEB2* apresentam um nível alto de similaridade de sequência, sendo considerados homólogos, o que sugere que as proteínas atuam nos mesmos alvos gênicos. No entanto, estudos sugerem que ambos os *ZEBs* talvez realizem funções diferentes e possivelmente opostas em diferentes tipos de câncer (MAKHTAR et al., 2017). *ZEB1*, em especial, é considerado um dos marcadores moleculares da progressão tumoral, sendo mediador da proliferação, migração e invasão celular (EUSKIRCHEN,2017). E, assim como *ZEB1*, a alta expressão de *ZEB2* é um indicativo direto de associação com o fenótipo mesenquimal em células cancerígenas de tumor primário (KURAHARA et al., 2012). O gene *SNAIL*, por sua vez, é outro fator de transcrição que desempenha um importante papel na TEM e principalmente na regulação da *ECAD*. Isto é, a superexpressão de *SNAIL* acarreta a inibição de *ECAD* e a indução do processo de transdiferenciação. Tal fato explica a baixa expressão de *ECAD* em células ativadas, indicando que nas mesmas não está ocorrendo necessariamente uma progressão celular a tumorigênese, mas sim uma inferência que esteja colaborando para uma transdiferenciação do fenótipo celular para o estágio fibrosado. Outra característica da superexpressão de *SNAIL* é o aumento da expressão do marcador mesenquimal *VIM* e ainda ganho nas propriedades invasivas e migratórias, bem como morfologia fibroblastoide nas células (ZHU et al., 2012).

Figura 13: Níveis de expressão relativa dos mRNA *ZEB1*, *ZEB2* e *SNAI1* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde *** $p < 0,0005$ e * $p < 0,05$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.



Observando-se o gráfico A da Figura 13, nota-se que *ZEB1* apresentou uma alta expressão em células ativadas e, contrariamente, uma baixa expressão em células quiescentes. Isso ocorre devido à regulação do equilíbrio da TEM ser realizada por esse gene, ou seja, sua alta expressão nas LX-2 ativadas é em decorrência da mudança de fenótipo dessas células frente a uma injúria e, em nosso modelo, frente a ativação da cultura celular. Nas culturas ativadas tratadas com DMSO 1% v/v ocorreu uma baixa expressão gênica de *ZEB1*, enquanto que as culturas ativadas tratadas com TCS 50 μ M apresentaram essa expressão elevada, indicando que nesse caso o solvente DMSO possivelmente está regulando o nível transcricional das células ativadas de modo a diminuir a expressão do gene. Esse efeito não foi observado quando as culturas foram tratadas com concentrações mais baixas de DMSO (0,5% v/v) e do fármaco (10 μ M).

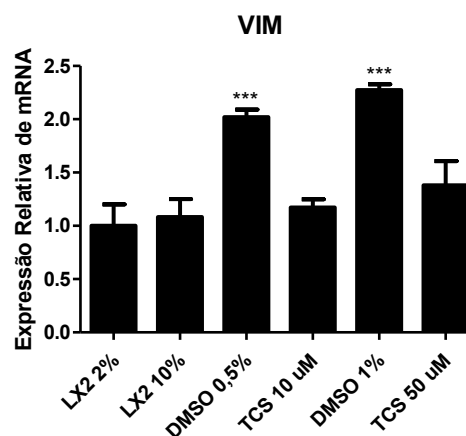
A análise conjunta dos resultados da expressão de *ZEB2* (Figura 13 B) mostrou que somente as culturas tratadas com TCS 50 μ M do fármaco apresentaram aumento ou alterações significativas no nível de expressão desse gene. Esses resultados reforçam a observação de que a concentração de 50 μ M do TCS atua na TEM, considerando-se que *ZEB2* é um marcador direto desse fenômeno biológico. Os resultados novamente reforçam que o fármaco em concentração mais alta colabora para a criação de um ambiente hepatotóxico. Comparando-se a expressão de *ECAD* nessa mesma condição de estudo com a expressão de *ZEB2*, observa-se a existência de uma provável sinalização cruzada

entre essas moléculas, uma vez que os níveis transcricionais de *ECAD* apresentaram-se baixos nas células tratadas com TCS 50 μ M e uma expressão extremamente alta de *ZEB2* aparece na mesma condição. Tal observação reforça a toxicidade do TCS e sua ação de induzir a perda das junções célula-célula, ganho na capacidade migratória e invasiva e até mesmo alterações fenotípicas das células estreladas. Após os genes *ZEBs*, o gene *SNAI1* foi analisado (Figura 13 C) e sua expressão quantificada. Para esse gene, somente células ativadas apresentaram aumento exacerbado dos níveis transcricionais do gene. Para as demais condições avaliadas, foi observada em todas uma diminuição da expressão gênica, inclusive nas culturas tratadas com 50 μ M de TCS, contrariando o que era esperado (alta expressão de *SNAI1* e baixa de *ECAD*).

Para complementar as análises do processo de TEM, o gene Vimentina (*VIM*) foi avaliado. De acordo com Stinson e colaboradores (2011), altos níveis de expressão de *ZEB2* estimulam a expressão de outro gene denominado *VIM*. (Figura 14 A). *VIM* é um dos componentes dos filamentos do citoesqueleto e está relacionada tanto ao aumento da invasão celular, como também tumorigênese e metástase (CASTILHO, 2003). Além disso, *VIM* é considerado um marcador de TEM, pois quando há o remodelamento do citoesqueleto, é gerada uma mudança do filamento intermediário de citoqueratina para vimentina (THOMPSON; NEWGREEN; TARIN. 2005).

Analisando o gráfico referente à expressão de *VIM*, nota-se que somente o solvente DMSO (em ambas as concentrações) causou aumento na expressão do gene. Em relação ao fármaco TCS, nenhuma das concentrações utilizadas alteraram a expressão do gene *VIM*, sugerindo a existência de um mecanismo de proteção celular. Assim, com a análise do gene *VIM* foi possível observar que o efeito do solvente DMSO demonstra ser deletério em muitas situações e corrobora com os dados descritos na literatura. Por outro lado, o efeito do TCS induz alterações que levam a TEM, uma vez que o fármaco quebra a homeostasia celular. Sendo assim, o conjunto das observações leva a maiores investigações sobre os reais mecanismos celulares envolvidos em resposta a maior concentração de TCS. Com isso, busca-se elucidar se o TCS 50 μ M acarreta a modulação do ambiente celular a fim de ocasionar uma indução tumoral, ou se possivelmente colabora para a criação de condições favoráveis para a reversão do fenótipo ativado.

Figura 14: Níveis de expressão relativa dos mRNA *VIM* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR convencional. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde *** $p < 0,0005$ e * $p < 0,05$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.



Após a análise conjunta dos genes de TEM, ficou evidente que novas investigações seriam necessárias para complementar os resultados obtidos. Outros mecanismos celulares relacionados ao estabelecimento do hepatocarcinoma também foram estudados, buscando-se comprovar se o fármaco é verdadeiramente hepatotóxico, ou se ele atua como um hepatoprotetor. Sendo assim, os mecanismos de estresse oxidativo também foram explorados, uma vez que em quadros tumorais as células produzem superóxidos extracelulares para se protegerem contra a indução de apoptose (BAUER 2015).

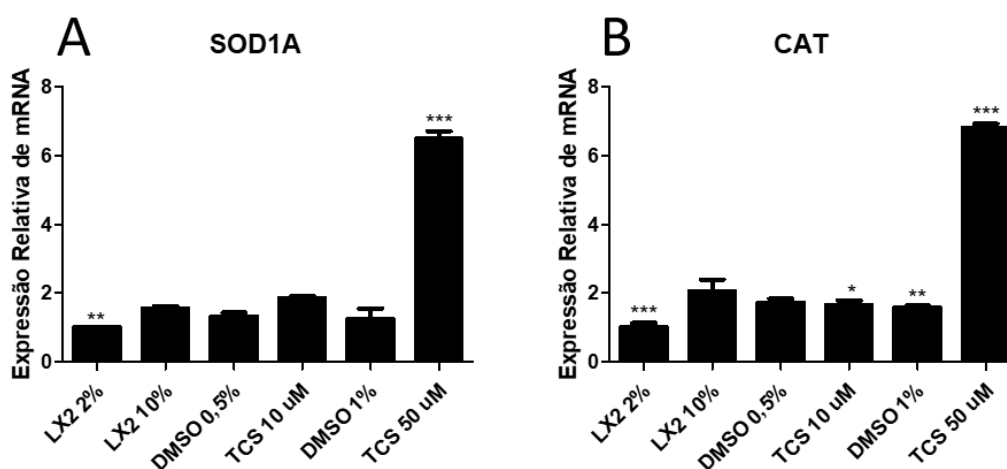
4.3.2 Análise molecular do estresse oxidativo:

O estresse oxidativo se caracteriza por ser uma condição biológica em que ocorre ou produção excessiva de agentes oxidantes, ou produção baixa de agentes antioxidantes (YANG et al, 2015). Na transdiferenciação epitélio-mesenquimal de células tumorais é comum a ocorrência de estresse causado, por exemplo, devido à hipóxia, perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (SILVA; JASIULIONIS, 2014). Com isso, a expressão de quatro genes relacionados ao estresse oxidativo foram avaliadas (Figuras 15 e 16). O primeiro deles foi o gene que transcreve a enzima superóxido dismutase (*SOD1*) que, juntamente com *CAT* e *GPx1*, constitui uma defesa primária contra estresse oxidativo, funcionando como reguladora importante do metabolismo de peróxido de hidrogênio (LABIÓS et al.,

2009). Sabe-se que o aumento da expressão de *SOD1* está diretamente relacionado à diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, relaciona-se também à diminuição da toxicidade causada por essas espécies (SILVA; JASIULIONIS, 2014). A Catalase (*CAT*) foi outro gene investigado, pois representa uma das principais enzimas antioxidantes citoplasmática, desempenhando assim um importante papel na degradação de EROs. Tal característica se deve ao potencial regulatório da *CAT* na biologia química dos EROs, bem como sua alta concentração na região externa da membrana celular das células tumorais, o que permite o estabelecimento de um controle rigoroso na sinalização intercelular e, portanto, evita a apoptose dessas células cancerígenas. Sendo assim, a inibição da *CAT* acarreta em apoptose intercelular (BAUER, 2015).

Os resultados são apresentados na Figura 15 A, onde se observa que o gene *SOD1* apresentou alta expressão apenas em células ativadas tratadas com TCS 50 μ M, enquanto que nas demais culturas celulares a expressão gênica manteve-se baixa e semelhante às células ativadas. Semelhantemente, o gene *CAT* (Figura 15 B) também se expressou em maior porcentagem apenas em células ativadas tratadas com TCS 50 μ M, enquanto que as demais culturas celulares apresentaram níveis de expressão gênica ligeiramente mais baixos que as células ativadas.

Figura 15: Níveis de expressão relativa dos mRNA *SOD1* e *CAT* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde $***p < 0,0005$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.



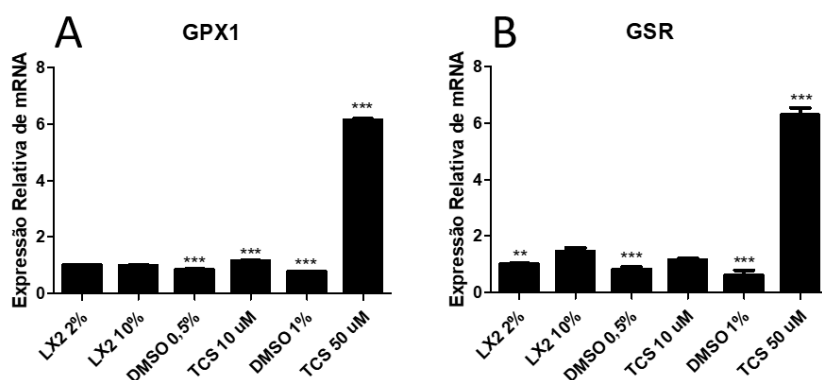
Os resultados encontrados para ambos os genes, *SOD1* e *CAT*, indicam que o fármaco TCS 50 μM está regulando positivamente o estresse oxidativo nas células, uma vez que sua alta expressão indica que está atuando diretamente na diminuição dos níveis de EROs e na toxicidade causada por essas espécies. Conseqüentemente, também está possivelmente diminuindo a taxa de apoptose celular e a criação de um ambiente hepatotóxico. Sendo assim, a partir da análise desses genes infere-se que o TCS 50 μM possa estar atuando como um hepatoprotetor. Entretanto, para investigar tal hipótese os genes *GPx1* e *GSR* também foram analisados.

A enzima citosólica GPx1 (Glutathione Peroxidase 1) se caracteriza pela sua importância na defesa primária contra o estresse oxidativo (Figura 16), pois assim como *CAT*, GPx1 apresenta a função de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Essa ação conjunta de ambas as enzimas é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa (mediante a participação de outras substâncias) acarreta na geração do radical OH, contra o qual não há sistema enzimático de defesa eficiente. Isso ocorre devido à característica desse radical livre de ser altamente reativo e apresentar extrema instabilidade, o que facilita a produção de danos oxidativos, alteração das funções biológicas das membranas celulares, alteração na estrutura e/ou função biológica das proteínas e conseqüente dano ao DNA, levando ao aparecimento de mutações (BARBOSA et al., 2010). Além disso, na literatura é descrito que baixos níveis de expressão de *GPx1* são comumente encontrados em tecidos cancerígenos, enquanto que a superexpressão do gene está relacionada à proteção contra o dano no DNA causado por agentes externos e à ação anticarcinogênica (ALMONDES et al., 2010). Outro gene investigado foi o *GSR* que codifica a enzima Glutathione Redutase, pois está descrito que a mesma se relaciona com a regulação dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, sendo responsável pela amplificação da sensibilidade aos oxidantes (GALLO et al., 2009). Além disso, a *GSR* é essencial para a integridade do sistema de proteção celular, tendo como função impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione, a qual atua no metabolismo e proteção celular. Por conta disso, a *GSR* é encontrada em altas concentrações no organismo, sendo a redução de

sua atividade um indicativo de mudanças clínicas (FERREIRA; ABREU, 2007; DERESZ et al., 2007).

Assim, continuando as análises, observou-se que a expressão de *GPx1* (Figura 16 A) também foi alta em células ativadas tratadas com TCS 50 μ M, enquanto que a expressão gênica nas demais culturas foi semelhante as células ativadas. O mesmo resultado foi encontrado para a expressão do gene *GSR* (Figura 16 B), entretanto observou-se uma pequena redução nos níveis transcritos nas células quiescentes e nas células ativadas tratadas com ambas as concentrações de DMSO em comparação as células ativadas.

Figura 16: Níveis de expressão relativa dos mRNA *GPx1* e *GSR* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde *** $p < 0,0005$ e ** $p < 0,005$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.

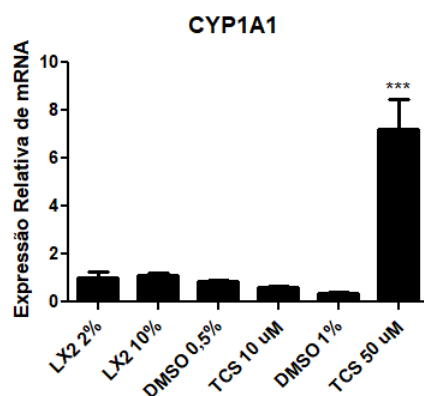


Com esses resultados encontrados para os genes *GPx1* e *GSR*, é possível observar que o efeito hepatoprotetor do fármaco em concentração 50 μ M se torna novamente evidente, indicando que o mesmo está regulando negativamente a produção de danos oxidativos, bem como as alterações das funções biológicas das proteínas, dano ao DNA e conseqüente aparecimento de mutações que levam ao estabelecimento do hepatocarcinoma. Dessa maneira, na concentração de 50 μ M pode-se inferir que o fármaco está possivelmente promovendo uma ação anticarcinogênica e hepatoprotetora.

4.3.3 Análise molecular do metabolismo de xenobióticos:

Com objetivo de se investigar de maneira mais detalhada a nova hipótese de hepatoproteção do TCS, tornou-se importante estudar também o metabolismo de xenobióticos. Estes se caracterizam como compostos químicos que são estranhos ao corpo humano, uma vez que são principalmente metabolizados no fígado, como o próprio TCS (MAURICE et al., 2013). Nessa análise, genes relevantes foram escolhidos para terem seus níveis transcricionais mensurados. Entre eles, o gene *CYP1A1* foi escolhido para investigar melhor o metabolismo deste fármaco pelas células LX-2 estudadas. O gene *CYP1A1* (Figura 17) é um dos genes que se relacionam à detoxificação de xenobióticos e é considerado um dos biomarcadores para a suscetibilidade a certas malignidades, em especial o câncer. Além disso, a expressão do gene indica aumento na formação de metabólitos carcinogênicos devido a hiperatividade das enzimas envolvidas no processo de estabelecimento do carcinoma (HONMA et al., 2009). A partir do resultado obtido por meio da análise da expressão de *CYP1A1*, observa-se que novamente as células ativadas tratadas com o fármaco TCS 50 μM apresentaram um nível de expressão gênica bastante elevado, enquanto que em todas as demais condições de estudo apresentaram expressão gênica semelhante as células controle. Com isso, infere-se que o TCS 50 μM possa estar hiperativando enzimas importantes para o estabelecimento do hepatocarcinoma.

Figura 17: Níveis de expressão relativa do mRNA *CYP1A1* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μM e 50 μM). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde $***p < 0,0005$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.

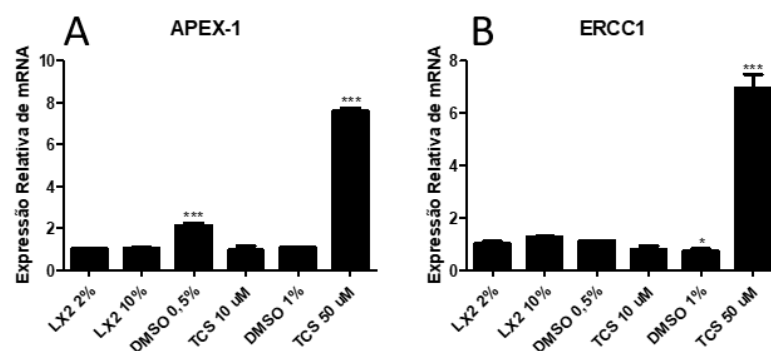


4.3.4 Análise molecular dos mecanismos de dano/reparo de DNA:

O aumento do estresse oxidativo devido às alterações dos estados antioxidantes de enzimas pode implicar em lesões no DNA, gerando processos pré-mutagênicos que podem progredir, em alguns casos, para o estabelecimento do carcinoma. Sabendo-se disso, os genes *APEX-1* e *ERCC1* (Figura 18) foram investigados a fim de se elucidar melhor o potencial citotóxico e mutagênico do TCS nas células LX-2. *APEX-1* é um gene caracterizado por traduzir uma importante endonuclease de reparo, podendo também apresentar funções celulares mais amplas que vão além do reparo do DNA (FUNG; DEMPLE, 2005; SARMENTO, 2016). A atuação desse gene nas células pode ser algo tecido-específico, podendo participar de vários outros processos bioquímicos, o que faz com que suas funções possam estar diretamente moduladas em diversos outros mecanismos que não se correlacionam propriamente com o dano no DNA (SARMENTO, 2016). Segundo Di Maso e colaboradores (2015), um exemplo é o que ocorre em casos de hepatocarcinoma humano, onde é observado o aumento da expressão de *APEX-1*, sendo esse aumento proporcional à progressão e gravidade do estabelecimento da doença hepática (MELIS et al, 2013). O gene *ERCC1*, por sua vez, é um gene importante no mecanismo de reparo de diferentes danos no DNA, podendo realizar tal reparo por excisão de nucleotídeos. Além disso, é considerado um potencial marcador de estabelecimento de carcinomas, sendo a baixa expressão de *ERCC1* associada ao risco aumentado de câncer (WANG et al, 2007) e a alta expressão relacionada com a resposta do organismo ao cancro e a conseqüente maior taxa de apoptose celular (OTA et al., 2009; LIMA, 2011).

Os resultados indicam que houve um aumento significativo da expressão de *APEX-1* em células ativadas tratadas com DMSO 0,5% v/v e um aumento ainda maior em células ativadas tratadas com TCS 50 μ M (Figura 18 A). Paralelamente, a análise transcricional do gene *ERCC1* (Figura 18 B) também revelou alta expressão nas células tratadas com TCS 50 μ M.

Figura 18: Níveis de expressão relativa do mRNA *APEX-1* e *ERCC1* em células LX-2 cultivadas em 2% de SBF e LX-2 cultivadas em 10% de SBF tratadas ou não com DMSO (0,5% v/v e 1% v/v) e com TCS (10 μ M e 50 μ M). As análises foram realizadas em triplicatas por PCR em tempo real. O nível de expressão de mRNA foi obtido através de análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, onde $***p < 0,0005$, utilizando-se o programa *GraphPad* versão 5.



Em conjunto, as análises apontam que os altos níveis de expressão de *APEX-1* e *ERCC1* nas células ativadas tratadas com TCS 50 μ M ressaltam a existência de mecanismos de reparo atuantes, o que reforça as análises de micronúcleos realizadas previamente.

5. CONCLUSÕES

Independentemente do agente etiológico agressor, o estágio final de uma lesão hepática crônica é a fibrose hepática e, quando em níveis avançados, pode favorecer o aparecimento e o desenvolvimento do hepatocarcinoma (MINICIS, 2012). Devido a isso, as doenças hepáticas são consideradas um grave problema relacionado à saúde pública, sendo responsáveis pela morte de milhares de pessoas todos os anos ao redor do mundo (WHO, 2012). Dentro desse contexto, a busca por terapias alternativas na reversão de doenças hepáticas torna necessária a investigação dos efeitos de alguns fármacos conhecidos, como o TCS. Entretanto, para que esse fármaco possa também ser utilizado de maneira segura, é necessário que sua atuação nas células do tecido hepático seja melhor avaliada. Com isso, o potencial citotóxico do TCS na transdiferenciação de CEHs LX-2 tornou-se alvo do estudo, sendo investigados aspectos celulares e moleculares que contribuem para o estabelecimento de características tumorais.

Os resultados obtidos pelo clássico ensaio de MTT demonstraram que as concentrações de TCS 10 μ M e TCS 50 μ M não afetaram a viabilidade celular, embora tenham induzido uma variação morfológica sutil em relação ao grupo controle (dados não mostrados). Essas concentrações de TCS foram escolhidas para os ensaios subsequentes. Posteriormente, foi investigado também o potencial genotóxico do fármaco pelo ensaio do cometa, onde foi observado que o dano no DNA das células tratadas com TCS 50 μ M foi o dobro em comparação às demais condições em estudo. A combinação de resultados sugere que o início das variações morfológicas apresentadas no MTT em células tratadas com TCS 50 μ M (dados não mostrados) não afetaram a viabilidade celular, porém, sugeriram um indicativo de toxicidade celular do fármaco.

Outro ensaio realizado foi o teste do micronúcleo, no qual foi demonstrado que o fármaco TCS em suas duas concentrações estudadas não apresenta potencial mutagênico. Sabendo-se disso, pôde-se inferir que o fármaco TCS potencialmente age como um protetor celular dos danos mutagênicos do DMSO. Comparativamente, os ensaios demonstraram que o TCS 50 μ M é possivelmente

genotóxico, mas não é potencialmente mutagênico. Ou seja, o dano celular causado pelo fármaco pode ser considerado reversível.

Posteriormente, análises da expressão de genes correlatos ao metabolismo celular também foram realizadas. Nas análises moleculares da TEM, o resultado combinado da expressão dos genes *ECAD*, *NCAD*, *ZEB1* e *ZEB2* reforçou a criação de um ambiente hepatotóxico pelo fármaco em alta concentração (TCS 50 μ M) e sua consequente ação de induzir a perda das junções célula-célula, ganho na capacidade migratória e invasiva, e alterações fenotípicas das células estreladas. O gene *VIM*, por sua vez, não apresentou expressão alterada em nenhuma das concentrações de TCS, sugerindo a existência de um mecanismo de proteção celular. Além disso, o resultado para o gene *VIM* sugeriu ainda que o efeito do solvente DMSO demonstra ser deletério em muitas situações e corrobora com os dados descritos na literatura. Sendo assim, com o conjunto das observações foi possível inferir que o efeito do TCS induz alterações que levam a TEM, uma vez que o fármaco quebra a homeostasia celular. Entretanto, maiores investigações foram necessárias para se elucidar se o TCS 50 μ M acarreta a modulação do ambiente celular a fim de ocasionar uma indução tumoral, ou se possivelmente colabora para a criação de condições favoráveis para a reversão do fenótipo ativado.

As análises moleculares do estresse oxidativo para os genes *SOD1* e *CAT* indicaram que o fármaco TCS 50 μ M regula positivamente o estresse oxidativo nas células, através da diminuição dos níveis de EROs e da toxicidade causada por essas espécies. Além disso, pôde-se também inferir que o fármaco nessa concentração possivelmente diminui a taxa de apoptose celular e a criação de um ambiente hepatotóxico, atuando assim como um hepatoprotetor. Os resultados encontrados com a análise dos genes *GPx1* e *GSR* novamente ressaltaram o efeito hepatoprotetor do fármaco em concentração 50 μ M, bem como sua ação anticarcinogênica. Foi demonstrado que tal ação ocorre através da regulação negativa da produção de danos oxidativos, bem como alterações das funções biológicas das proteínas, dano ao DNA e consequente aparecimento de mutações que levam ao estabelecimento do hepatocarcinoma. Com a análise molecular do metabolismo de xenobióticos, o gene *CYP1A1* demonstrou que o TCS 50 μ M possa hiperativar enzimas importantes para o estabelecimento do hepatocarcinoma. Por

último, com a análise molecular dos mecanismos de dano/reparo de DNA, a expressão dos genes *APEX-1* e *ERCC1* em células ativadas tratadas com TCS 50 μM ressaltou a existência de mecanismos de reparo atuantes, o que reforçou ainda mais as análises de micronúcleos realizadas previamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, K. C. et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. **Environ. Health Perspect.** v.116, n.09, p. 1203–1210, 2008.

ALMONDES, K. et al. O papel das selenoproteínas no câncer. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 04, p. 484-8, 2010.

AOYAMA, T. et al. CX3CL1-CX3CR1 interaction prevents carbon tetrachloride-induced liver inflammation and fibrosis in mice. **Hepatology.** v. 52, p. 1390-1400, 2010.

ANDRADE, Z. A. Regressão da Fibrose Hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, 2005.

AXELSTAD, M. et al. Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. **Food Chem Toxicol** 59: 534-540, 2013.

BARBOSA, K. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 04, p. 629-643, 2010.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, 115: 209-218, 2005.

BATTOCHIO, A. P. R. Adaptação do modelo experimental de colestase extra-hepática em ratos jovens. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 19; n. 01, 2004.

BECKER, C. E. 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, 2013.

BAUER, G. Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. **Redox Biology**, v. 06, p. 353–371, 2015.

BERX, G.; ROY, F. V. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Biol.** 2009

BRIANEZI, G. et al. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J. Bras. Patol**, v. 45, n. 04, p. 325-334, 2009.

CASTILHO, R. M. **EMT em carcinomas epidermóides bucais. Análise através da expressão das proteínas CTBP, Vimentina e BCatenina e da identificação gênica de larga escala.** 2003. Doutorado em Patologia Bucal FOU SP.

CHENG, C.; WANG, Z.; CHEN, J. 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.

CHEREDNICHENKO, G. et al. Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca₂₊ dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, n. 35, p. 14158–14163, 2008.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 03, p.143-151, 2008.

CURRIE, E. et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **J Cell Mol Med**. V. 18, n. 02, p. 153-161, 2013.

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

DERESZ, L. F. et al. O estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 4, 2007.

DI MASO, V. et al. Transcriptional Up-Regulation of APE1/Ref-1 in hepatic tumor: Role in hepatocytes resistance to oxidative stress and apoptosis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

EUSKIRCHEN, P. et al. Cellular heterogeneity contributes to subtypespecific expression of ZEB1 in human glioblastoma. **PLOS ONE**, v. 12, n. 09, 2017.

- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000.
- FERREIRA, I. C.; ABREU, R. M. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**. n. 02, 2007.
- FLORÃO, A. et al. Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a Proliferação de Linfócitos Humanos *in vitro*. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26; n. 02; p. 215-223, 2007.
- FLORES, M. et al. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**. v. 01, n. 03, 2008.
- FRIEDMAN, S. 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.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.
- FRITSCH, E. B. et al. Triclosan impairs swimming behavior and alters expression of excitation-contraction coupling proteins in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environ Sci Technol**. 47, p. 2008-2017. 2013.
- FUNG, H.; DEMPSEY, B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. **Molecular cell**, v. 17, n. 03, p. 463–470, 2005.
- GALLO, V. et al. Inherited Glutathione Reductase Deficiency and *Plasmodium falciparum* Malaria—A Case Study. **Plos One**, v. 04, n. 10, 2009.
- GALUCIO, N. C. R. **Estudos de Citotoxicidade e genotoxicidade de *Eleutherine plicata* Herb.** 2014. 95 folhas. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará.
- GRESSNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. **J Cell Mol Med**. V. 11, n. 5, pág. 1031-51, 2007.
- GUO, G. et al. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX2. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 8, n. 1, p. 59-64, 2009.

GUO, L. 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.

HENDERSON, N. C; FORBES, S. J. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. **Toxicology**. 254(3):130-5. 2008.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 6, n. 1, p.425-456, 2011.

HONKISC, E. et al. The effect of Triclosan on Hormone Secretion and Viability of Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells. **Reproductive Toxicology**, 34, p. 385–392, 2012.

HONMA, H. N. et al. O polimorfismo do gene CYP1A1*2A e a suscetibilidade ao câncer de pulmão na população brasileira. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 08, p. 767-772, 2009.

IREDALE, J. 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.

JIA, X. et al. Upregulation of LncRNA-HIT promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by association with ZEB1. **Cancer Medicine**. v. 05, n. 12, p. 3555–3563, 2016.

JIANG, L. 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, 2014.

JI, Y. et al. Functional Study of miR-27a in Human Hepatic Stellate Cells by Proteomic Analysis: Comprehensive View and a Role in Myogenic Trans-Differentiation. **Plos One**, v. 09, n. 9, 2014.

JONES, R. 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.

KIM, S. H. et al. Growth and migration of LNCaP prostate cancer cells are promoted by triclosan and benzophenone-1 via an androgen receptor signaling pathway. **Toxicol. Pharmacol.** 39, p. 568-576., 2015.

KURAHARA, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 105, n. 7, p. 655–661, 2012.

LABIÓS, M. et al. Superoxide dismutase and catalase anti-oxidant activity in leucocyte lysates from hypertensive patients: effects of eprosartan treatment. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 10, p. 24-30, 2009.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best Pract Res ClinGastroenterol.** 25(2):195-206. 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, Michael. **Princípios de Bioquímica**, 6 ed. São Paulo: Sarvier, 2017.

LIMA, L. M. C. **Imunolocalização, metilação e polimorfismo do gene ERCC1 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: correlação com parâmetros clínicos, controle locorregional e sobrevida.** 2011. 143 f. Tese (Doutorado) - Programa de Radiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LIU, H. 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.

MAKHTAR, W. R. W. et al. Short stretches of rare codons regulate translation of the transcription factor ZEB2 in cancer cells. **Oncogene.** v. 36, p. 6640–6648, 2017.

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

MAURICE, C. F. et al. Xenobiotics Shape the Phisiology and Gene Expression of Active Human Gut Microbiome. **Elsevier Inc**, p. 39-50, 2013.

MELIS, J. P. M. et al. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 18, p. 2409–2419, 2013.

MINICIS, S. et al. Cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis leading to liver cancer. **Transl Gastrointest Cancer**. v. 01, n. 01, p. 88-94, 2012.

MIRANDA, J. F. **Análise celular e molecular da ação do fármaco triclosan na reversão do processo fibrosante em células hepáticas LX-2**. 2016. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2016.

MONSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 12, p. 55-63, 1983.

MPF, BRASIL. **Ação do MPF/MG pede que Anvisa proíba uso do triclosan no Brasil**. Brasília: MPF, 2016.

OLIVEIRA, F. S. **A contribuição do fator transformador de crescimento beta-1 - TGFbeta-1 na fibrose hepática: estudos in vivo e in vitro**. 2009. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Médicas: Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

OTA, S. et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. **Lung Cancer**. v. 94, p. 98-104, 2009.

PADOIN, A. V. Doença hepática não-alcoólica gordurosa e risco de cirrose. **Scientia Medica**. v. 18, n. 4, p. 172-176, 2008.

PAUL, K. B. et al. Developmental triclosan exposure decreases maternal and neonatal thyroxine in rats. **Environ Toxicol Chem** 29: 2840-2844, 2010.

PAUL, K. B. et al. Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. **Toxicology**, 300, p. 31– 45, 2012.

PELLICORO, A. 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.

SADOWSKI, M. 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.

SARMENTO, A. S. C. **Perfil de expressão dos genes APEX1, OGG1 e PARP1 em células do sangue periférico de pessoas com a síndrome de Berardinelli-Seip do nordeste do Brasil**. 2016. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SANTOS, T. M.; NARDIN, J. M. Estudo piloto da ocorrência de micronúcleos em linfócitos de profissionais de saúde atuantes em oncologia. **Saúde**, v. 02, p. 128-141, 2014.

SCHUG, T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 127, p. 204–211, 2011.

SENOO, H. 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.

SILVA, C.; JASIULIONIS, M. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Cienc. Cult*, v. **66**, n. **01**, **2014**.

SINGER, H. et al. Triclosan: Occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: Field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. **Environ Sci Technol**, 2002.

SHU, S. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 10, n. 19, 2004.

STINSON, S. et al. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. **Science signaling**, v. 4, n. 177, p. ra41, 2011.

STRAUB, B. K. et al. E–N-cadherin heterodimers define novel adherens junctions connecting endoderm-derived cells. **JCB**, v. 195, n. 05, 2011.

SUN, C. et al. Transplantation of urokinase-type plasminogen activator gene-modified bone marrow-derived liver stem cells reduces liver fibrosis in rats. **J Gene Med**, v. 10, p. 855-866, 2008.

SVEGLIATI-BARONI, G. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. **Liver Int.** v. 28, p. 1052-1064, 2008.

Tanaka S. et al. Oxidative stress pathways in noncancerous human liver tissue to predict hepatocellular carcinoma recurrence: a prospective, multicenter study. **Hepatology.** v. 54, p. 1273-1281, 2011.

TEPLOVA, V. et al. Mechanism of Triclosan Toxicity: Mitochondrial Dysfunction Including Complex II Inhibition, Superoxide Release and Uncoupling of Oxidative Phosphorylation. **Toxicology Letters.** (17) 30172-8, 2017.

THOMPSON, E. W.; NEWGREEN, D. F.; TARIN, D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? **Cancer Research.** v, 65, n. 14, p. 5991-5995, 2008.

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 397–411, 2017.

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.

WANG, Y. et al. Nucleotide excision repair pathway genes and oral premalignant lesions. **Clin Cancer Res.**, v. 13, p. 3753-3758, 2007.

WANG, B. et al. The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, n.02, p. 193-197, 2008.

WHO, World Health Organization. Brazil Health Profile. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/countries/bra.pdf?ua=1>>. Acessado em: 14 Mar. 2017.

YANG, J. et al. Original Article Identification of functional tag single nucleotide polymorphisms within the entire CAT gene and their clinical relevance in patients with noise-induced hearing loss. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 08, n. 03, p. 2852-2863, 2015.

Yi, X. et al. Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. **FEBS Open Bio**. v. 07, p. 485–494, 2017.

YILMAZ, M; CHRISTOFORI, R. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Rev**. v. 28, pág. 15–33, 2009.

YUEH, M. et al. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 48, p. 17200- 17205, 2014.

ZHANG, A. et al. Potential genetic damage to nematode offspring following exposure to triclosan during pregnancy. **Molecular Medicine Reports**. 16: 1321-1327, 2017.

ZHU, L. F. et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. **Lab Invest**, v. 92, n. 05, p. 744-752, 2012.

LETÍCIA DESTEFANI SCARINCI

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FÁRMACO TRICLOSAN NA TRANSDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS LX-2 E SEU POTENCIAL INDUTOR TUMORAL

Prof.^a Dr.^a Karen Cristiane Martinez de Moraes (Orientadora).
Departamento de Biologia - UNESP - Rio Claro.

Letícia Destefani Scarinci (Aluna).
UNESP - Rio Claro

Rio Claro, SP ____ de _____ de 2018.