

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/09/2024.

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

INDYANARA INACIO BARRETO

**Análises celulares e moleculares do efeito do óleo essencial de *Artemisia  
absinthium* em modelo celular de fibrose hepática**

Araraquara

2022

INDYANARA INACIO BARRETO

**Análises celulares e moleculares do efeito do óleo essencial de *Artemisia  
absinthium* em modelo celular de fibrose hepática**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Cristiane  
Martinez de Moraes

Araraquara

2022

B273a

Barreto, Indyanara Inacio

Análises celulares e moleculares do efeito do óleo essencial de *Artemisia absinthium* em modelo celular de fibrose hepática / Indyanara Inacio Barreto. -- Araraquara, 2022

69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara  
Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Fígado - Doenças. 2. Artemísia. 3. Cultura de células. 4. Estresse oxidativo. 5. Toxicidade. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análises celulares e moleculares do efeito do óleo essencial de *Artemisia absinthium* em modelo celular de fibrose hepática"

AUTORA: INDYANARA INACIO BARRETO

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Profa. Dra. FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica / Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS - Porto Alegre

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 28 de setembro de 2022

Norival Alves Santos  
Assinado de forma digital por Norival  
Alves Santos Filho:06617965663  
Dados: 2022.09.28 16:30:43 -03'00'

Fátima Theresinha  
Costa Rodrigues  
Guma  
Assinado de forma digital por  
Fátima Theresinha Costa  
Rodrigues Guma  
Dados: 2022.09.28 16:34:24 -03'00'



Karen Cristiane Martinez de Moraes

## **DADOS CURRICULARES**

### **IDENTIFICAÇÃO**

**Nome:** Indyanara Inacio Barreto.

**Nome em citações bibliográficas:** Barreto, I. I.

### **ENDEREÇO PROFISSIONAL**

UNESP - Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Quitandinha - Araraquara/SP; 2 UNESP - Avenida 24-A, 1515 - Bairro Bela Vista - Rio Claro/SP.

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

2019 – 2020 Especialização em Direito Ambiental e Sustentabilidade. (Carga Horária: 420h).

Faculdade Educacional da Lapa, FAEL, Brasil.

Título: Derramamento de petróleo no Nordeste - uma análise do desastre e as carências da legislação atual.

Orientadora: Kelly Pauline Baran.

2013 – 2017 Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Brasil.

Título: Diabetes e extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei Murrill* não alteram a morfologia do colo proximal.

Orientador: João Paulo Ferreira Schoffen.

### **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

2020 – 2020 Biochemical Principles of Energy Metabolism (11 h).

Korea Advanced Institute of Science and Technology, KAIST, Coréia do Sul.

2020 – 2020 Understanding Medical Research: Your Facebook Friend is Wrong (18h).

Yale University, YALE, Estados Unidos.

2020 – 2020 Drug Development (10 h).

University of California San Diego, UCSAN DIEGO, Estados Unidos.

2020 – 2020 Drug Discovery (10 h).

University of California San Diego, UCSAN DIEGO, Estados Unidos.

2020– 2021 Introdução à Computação para Bioinformática (linguagem de programação Python) (40 h).

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

**2022 – Atual** Confederação Nacional das Cooperativas Médicas, UNIMED, Brasil.

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de Gestão e Valor em Saúde, Carga horária: 220 h, Regime: Dedicação exclusiva.

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

MOLICA, L. R.; BARRETO, I. I.; MORAES, K. C. M. Fitossanitários e doenças hepáticas: Um desafio à saúde pública no Brasil. Research, Society and Development, v. 10, n. 9, p. e15910917835, 2021.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos científicos**

Barreto, I. I., Karen, K. C. M. *Artemisia absinthium* essential oil demonstrates anti-fibrogenic and antioxidant potential in LX2 hepatic stellate cells. In: 66th Brazilian Congress of Genetics, 2021.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

66th Brazilian Congress of Genetics. 2021. (Congresso).

II Congresso Online Nacional de Química - II CONDEQUI. 2020. (Congresso).

Web Conferência de Análises Instrumentais - WEBCONAI. 2020. (Congresso).

Dedico este trabalho à Deus, que se fez presente durante todo o caminho. Aos meus pais, Marco Barreto e Lúcia Angela Inacio Barreto, que me incentivaram e apoiaram desde o início e deram o exemplo, durante toda a vida, de dispor do seu melhor em tudo o que realizaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos se iniciam à Deus e aos meus pais, por serem a base da minha vida, meu apoio, direcionamento, meu incentivo e minha força a cada dia. E a minha madrinha, Márcia, por todo carinho e confiança sempre.

Agradeço à professora e orientadora Karen por ter aceitado o desafio de iniciar esta parceria, mesmo sem nos conhecermos pessoalmente, ter confiado e entregue este projeto aos meus cuidados. Agradeço pela parceria, ensinamentos, conselhos e direcionamentos, sempre valorizando o crescimento pessoal e profissional de seus alunos.

Acrescento ainda um agradecimento especial à Camila, companheira no laboratório desde o início, ensinando com muita paciência, auxiliando e acompanhando diversos ensaios, desenvolvendo discussões sobre os problemas e resultados; bem como a parceria como amiga, sempre se fazendo presente, apoiando e aconselhando com muito carinho. Aos colegas de laboratório: Victória, Letícia Molica, Ana Caroline e Fabi, deixo meus agradecimentos pela parceria no laboratório e por todos os momentos de apoio e descontração. Vocês tornaram o período de mestrado mais leve e prazeroso. À Letícia Rocha, que mesmo em laboratórios diferentes sempre se fez disponível, agradeço pelos ensinamentos e apoio com trabalho, e pelo carinho.

Ao meu companheiro, Wesley Maciel, agradeço por todo o apoio, carinho, compreensão e o incentivo nos momentos mais difíceis, assim, contribuindo para o meu crescimento pessoal.

Agradeço ainda ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química de Araraquara pela oportunidade, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida GM/GD 131816/2020-9, que me permitiu dedicar este período à pesquisa, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao projeto 2018/05286-3, que possibilitou o desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

## RESUMO

A fibrose hepática é uma resposta anormal de regeneração, em que as células lesadas são substituídas por um excesso de material extracelular rico em colágenos, produzido pelas células estreladas hepáticas ativadas após a lesão, que contribuem para o início e progressão da fibrose. Até o momento, não há terapia aprovada para a doença. A planta *Artemisia absinthium* é utilizada na medicina tradicional de forma expressiva para problemas hepáticos, dentre seus compostos ativos, o óleo essencial possui propriedades terapêuticas diversas ainda não investigadas em doenças hepáticas. Assim, utilizamos a linhagem de células estreladas hepáticas LX-2 para avaliar o potencial modulador do óleo essencial em vias relacionadas à fibrose hepática e ao estresse celular. Para tal, foram realizadas análises de microscopia de fluorescência, expressão gênica, análises bioquímicas e de perfil proteico, utilizando 4 grupos experimentais: 1. Células quiescidas-*like* (controle de condições não patológicas), 2. Células ativadas (controle de características pró-fibrogênicas), 3. Células ativadas + óleo essencial 0.3 µg/ µL e 4. Células ativadas + óleo essencial 0.4 µg/ µL, incubadas por 24 h. Das concentrações avaliadas, foram utilizados os resultados de 0.4 µg/ µL para discussão pela clareza das vias induzidas pelo óleo essencial nessa dosagem, a qual reduziu os marcadores pró-fibrogênicos e induziu perturbação na homeostase celular, desencadeando modulação do metabolismo lipídico, processos de estresse celular, detoxificação, elementos pró-inflamatórios e de transição epitélio mesenquimal. Assim, o tratamento demonstra potencial antifibrótico com toxicidade preditiva induzida na concentração e tempo de exposição utilizados.

**Palavras-chave:** fibrose hepática; *Artemisia absinthium*; célula estrelada hepática.

## ABSTRACT

Hepatic fibrosis is an abnormal regeneration response, in which injured cells are replaced by an excess of collagen-rich extracellular material produced by activated hepatic stellate cells after injury, which contribute to the onset and progression of the fibrosis. To date, there is no approved therapy for the disease. The *Artemisia absinthium* plant is used in traditional medicine in widely used for liver problems, among its active compounds, the essential oil has several therapeutic properties not yet investigated in liver diseases. Therefore, we used the LX-2 hepatic stellate cell line to evaluate the essential oil modulatory potential in pathways related to liver fibrosis and cellular stress. For this purpose, fluorescence microscopy, gene expression, biochemical analysis and protein profile analysis were performed, using 4 experimental groups: 1. Quiesced-like cells (control for non-pathological conditions), 2. Activated cells (control for pro-fibrogenic characteristics), 3. Activated cells + essential oil 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and 4. Activated cells + essential oil 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , incubated for 24 h. From the concentrations evaluated, the results of 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  were used to discuss for the clarity of the essential oil-induced pathways at this dosage, which reduced pro-fibrogenic markers and induced disturbance in cellular homeostasis, triggering modulation of lipid metabolism, cellular stress response, detoxification, pro-inflammatory and epithelial-mesenchymal transition elements. Therefore, the treatment demonstrates antifibrotic potential with predictive toxicity induced at the concentration and exposure time used.

**Keywords:** hepatic fibrosis; *Artemisia absinthium*; hepatic stellate cell.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**$\alpha$ SMA:**  $\alpha$  actina do músculo liso

**ACC:** acetil-CoA carboxilase

**ACLY:** ATP citrato liase

**AHR:** receptor aril-hidrocarboneto

**AKT:** proteína serina/treonina quinase

**ARE:** elementos de resposta antioxidante

**ATP:** adenosina trifosfato

**CAT:** catalase

**CPT:** carnitina palmitoil transferase

**CEH:** célula estrelada hepática

**CEHa:** célula estrelada hepática ativada

**CEHq:** célula estrelada hepática quiescida

**COL1a1:** colágeno 1  $\alpha$  1

**COX:** ciclo-oxigenase

**CTGF:** fator de crescimento do tecido conjuntivo

**CYP:** citocromo P450

**DAMPs:** moléculas denominadas padrões associados a danos

**DGAT:** diacilglicerol transferase

**DHE:** Diidroetídio

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**ECAD:** ecaderina

**ERK:** quinase regulada por sinal extra-celular

**EROs:** espécies reativas de oxigênio

**FAD:** dinucleotídeo de flavina e adenina

**FASN:** ácido graxo sintetase

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial

**GL:** gotículas lipídicas

**GPx:** glutathione peroxidase

**GSH:** glutathione reduzida

**GSR:** glutathione reductase

**GST:** glutathione S-transferase

**JNK:** c-Jun N-terminal kinase

**LRAT:** lectina-retinol acetyltransferase

**MAPK:** proteínas quinases ativadas por mitógeno

**MAPs:** proteínas associadas aos microtúbulos

**MEC:** matriz extracelular

**MLYCD:** malonil-CoA decarboxylase

**MTT:** Brometo Tiazolil Azul De Tetrazolio

**NAD:** dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**NCAMs:** moléculas de adesão entre células neurais

**NFKB:** fator de transcrição nuclear kappa B

**NRF2:** fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

**OCLN:** ocludina

**OE:** óleo essencial de *Artemisia absinthium* (losna)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PDGF:** fator de crescimento derivado de plaquetas

**PGE<sub>2</sub>**: prostaglandina E2

**PPAR**: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

**RENISUS**: Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS

**SBF**: soro bovino fetal

**SLUG**: snai2

**SMADs**: proteínas mães contra o homólogo decapentaplégico

**SNAIL**: snai1

**SOD**: superóxido dismutase

**SREBP1c**: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c

**SUS**: Sistema Único de Saúde

**TG**: triglicerídeos

**TGF-  $\beta$** : fator de crescimento transformador  $\beta$

**T $\beta$ R**: receptor de TGF $\beta$

**TWIST1**: proteína 1 relacionada à torção

**Unicef**: Fundo das Nações Unidas para a Infância

**XRE**: elementos responsivos à xenobióticos

**ZEB**: ligante do dedo de zinco ao Ebox

## SUMÁRIO

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                  | 14 |
| 1.1 O fígado e sua arquitetura .....                                                                                 | 14 |
| 1.2 Fibrose hepática .....                                                                                           | 15 |
| 1.3 Células estreladas hepáticas e a sua transativação metabólica na fibrogênese hepática.....                       | 16 |
| 1.3.1 Metabolismo lipídico em CEHs .....                                                                             | 20 |
| 1.4 Elementos moduladores da transdiferenciação das CEH: o estresse oxidativo .....                                  | 21 |
| 1.5 Plantas medicinais como uma importante ferramenta biológica no tratamento de doenças hepáticas .....             | 24 |
| 1.5 Óleo essencial de losna em doenças hepáticas.....                                                                | 27 |
| 1.6 Modelos celulares como estratégia alternativa para análise do potencial toxicológico de plantas medicinais ..... | 28 |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                    | 30 |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                                                              | 30 |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                                                                      | 30 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                         | 30 |
| 3.1 Cultura de células e tratamentos.....                                                                            | 30 |
| 3.2 Óleo essencial de <i>Artemisia absinthium</i> (losna).....                                                       | 31 |
| 3.3 Análise de viabilidade celular: os ensaios de Brometo Tiazolil Azul De Tetrazolio (MTT) .....                    | 33 |
| 3.4 Análise de Azul de Tripano .....                                                                                 | 33 |
| 3.5 Análise Genotóxica: ensaios do cometa alcalino .....                                                             | 34 |
| 3.6. Análises de expressão gênica.....                                                                               | 35 |
| 3.6.1 Extração de RNA total e transcrição reversa para síntese de DNA complementar (cDNA) .....                      | 35 |
| 3.6.2 Análise de expressão gênica em reações de PCR quantitativo (qPCR)....                                          | 36 |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7. Microscopia de fluorescência .....                                                 | 38 |
| 3.7.1 Distribuição dos filamentos de actina F.....                                      | 38 |
| 3.7.2 Rastreo da oxidação de ácidos graxos .....                                        | 38 |
| 3.8 Análises Bioquímicas .....                                                          | 39 |
| 3.8.1 Mensuração de triglicerídeos totais .....                                         | 39 |
| 3.8.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio .....                                   | 40 |
| 3.9 <i>Western blot</i> .....                                                           | 40 |
| 3.10 Análise Estatística.....                                                           | 41 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                          | 42 |
| 4.1 Óleo essencial de losna 0.4 µg/ µL .....                                            | 42 |
| 4.1.1. Análise de marcadores pró-fibrogênicos.....                                      | 42 |
| 4.1.2 Análise do metabolismo lipídico.....                                              | 43 |
| 4.1.3 Análise dos elementos correlatos às vias de toxicidade e estresse oxidativo ..... | 48 |
| 4.1.4 Fator de transcrição <i>Forkhead O1</i> – FOXO1 .....                             | 52 |
| 4.1.5 Análise de fatores relacionados à EMT.....                                        | 56 |
| 4.1.6 Análises conjuntas .....                                                          | 58 |
| 5. CONCLUSÃO .....                                                                      | 59 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                       | 59 |

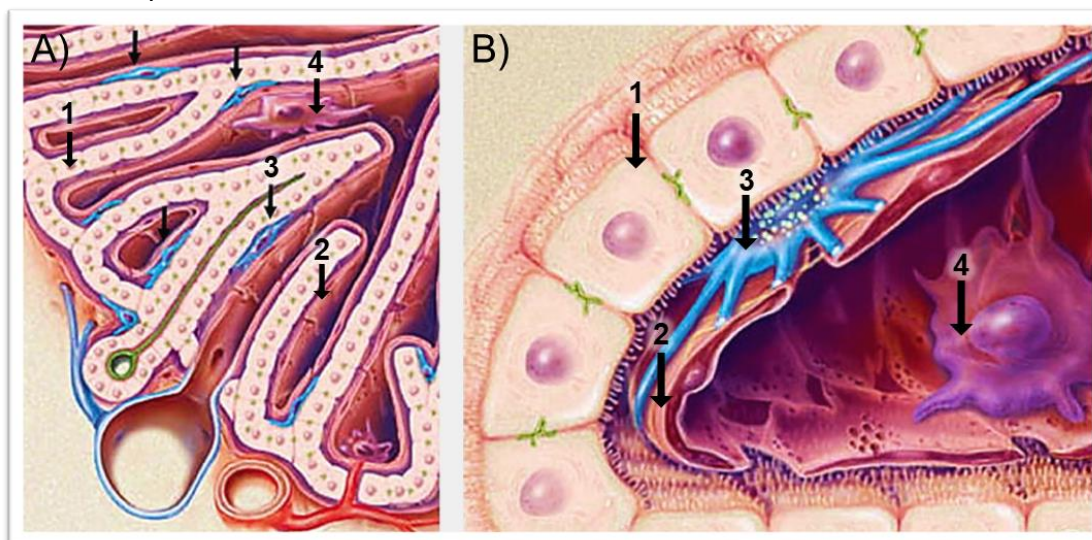
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O fígado e sua arquitetura

O fígado é considerado a maior glândula do corpo humano, realizando importantes funções como: produção e secreção da bile, metabolismo de nutrientes e da bilirrubina, detoxificação e o armazenamento de minerais e vitaminas (OZOUGWU, 2017). O suprimento sanguíneo para este órgão provém da veia porta, além de ser perfundido pela artéria hepática abrangendo, assim, as circulações esplênica-sinusoidal-sistêmica e entero-hepática que permitem a este órgão fornecer uma variedade de substâncias necessárias para o funcionamento adequado de outros importantes órgãos como cérebro, coração e rins (ISHIBASHI et al., 2009).

Para exercer suas diferentes funções, este órgão é composto por uma variedade de tipos celulares (Figura 1) divididos em células parenquimatosas (hepatócitos) e células não parenquimatosas (células endoteliais, células de *Kupffer* e células estreladas hepáticas (CEH)) (FRIEDMAN; PINZANI et al., 2022). Os hepatócitos constituem aproximadamente 80% da massa total do fígado, sendo essas altamente metabolizadoras e participam do processamento de nutrientes, produção e secreção da bile, detoxificação, e atuação em outras importantes funções fisiológicas. As células endoteliais revestem as paredes dos capilares sinusóides hepáticos e possuem função de filtração e capacidade endocítica. As células de *Kupffer* são macrófagos, removem partículas e/ou patógenos através de fagocitose e, quando ativadas, podem secretar uma vasta gama de mediadores inflamatórios (OZOUGWU, 2017; ISHIBASHI et al., 2019). As CEHs armazenam lipídeos e aproximadamente 95% dos retinóides do organismo em gotículas, além de controlarem a contratilidade dos sinusóides, homeostase da matriz extracelular (MEC) e auxiliarem na regeneração do fígado. Em condições de estresse essas células podem ser ativadas, desempenhando um papel na resposta cicatricial, fibrótica e inflamatória (PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013).

Fonte: Adaptado de Friedman, 2008.



**Figura 1** – Tipos de células hepáticas. A) Desenho representativo da arquitetura sinusoidal hepática, representando a orientação espacial das células hepáticas apontadas por setas, das quais células estreladas hepáticas estão representadas entre os hepatócitos e as células endoteliais, e as células de Kupffer junto às células endoteliais. B) Diagrama em maior aumento representando um sinusóide hepático e seu espaço subendotelial. 1. hepatócitos, 2. célula endotelial, 3. CEHs e 4 – células de Kupffer.

## 1.2 Fibrose hepática

As doenças hepáticas crônicas são uma grande problemática para a saúde pública global e suas complicações são responsáveis por aproximadamente 2 milhões de mortes por ano em todo o mundo. Atualmente, o aumento na prevalência dos fatores de risco dessas anomalias hepáticas causa bastante apreensão, dentre estes fatores: o alto consumo de álcool, o aumento da obesidade e do diabetes na população, hepatites virais e a lesão hepática induzida por drogas (ASRANI et al., 2018). Na lesão hepática aguda, os hepatócitos substituem as células necróticas e apoptóticas em um processo de regeneração. Na lesão hepática crônica, esse processo falha gradualmente, o que favorece um processo de cicatrização anormal, no qual as células lesadas passam a ser substituídas por MEC, induzindo a fibrose hepática (KHANAM; SALEEB; KOTTILIL, 2021).

Os danos aos hepatócitos levam à liberação de moléculas denominadas padrões associados a danos (*damage-associated molecular patterns* – DAMPs), que ativam as CEH levando-as a produzir altas quantidades de MEC. Paralelamente, as DAMPs induzem ainda o recrutamento e ativação de linfócitos e macrófagos, na produção de citocinas pró-inflamatórias (ROEHLEN; CROUCHET; BAUMERT, et al.

2020). Assim, a fibrose hepática é caracterizada por disfunção na homeostase da produção da MEC acompanhada por infiltrações imunes. Na fibrose hepática crônica, o elevado número de CEHs ativadas (CEHa) promove constrição dos sinusóides hepáticos, afetando a troca de nutrientes e a progressão da patologia que pode levar à angiogênese, alterações na arquitetura do fígado e redução da sua elasticidade. Consequentemente, essas características deletérias comprometem a estrutura e função do órgão (KHOMICH; IVANOV; BARTOSCH, 2020) e conduzem o aparecimento e agravamento do quadro cirrótico (PAROLA; PINZANI et al., 2019). O excesso de MEC produzido pelas CEHa não é inerte, ele armazena citocinas e fatores de crescimento que, entre outros, podem contribuir ainda para o desenvolvimento do hepatocarcinoma (ROEHLEN; CROUCHET; BAUMERT, 2020).

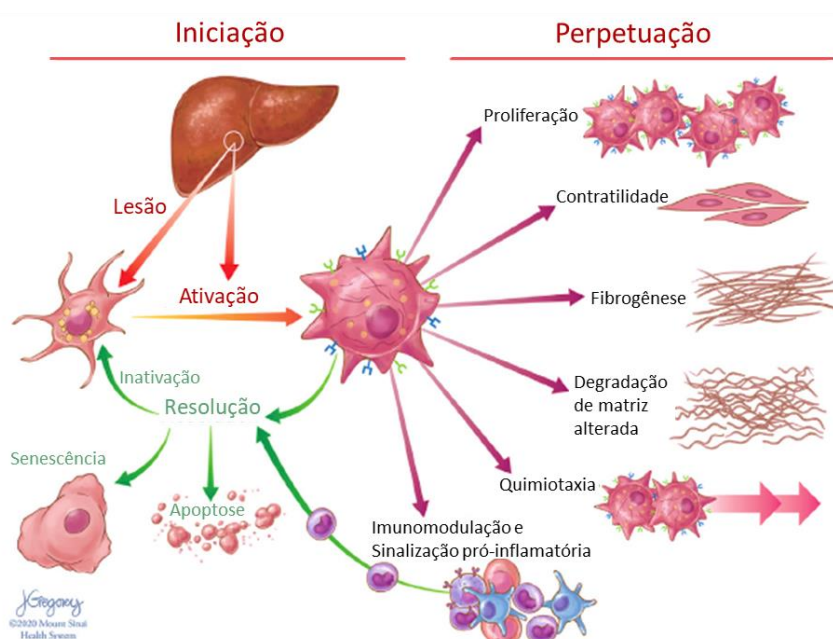
Atualmente, tem-se conhecimento da capacidade de reversão do quadro fibrótico. Quanto ao fígado, estudos apontam a alta capacidade regenerativa do órgão quando da regressão e/ou reversão de quadros fibróticos (FRIEDMAN, PINZANI, 2022). Para que ocorra essa reversão, entretanto, alguns elementos se destacam: 1. interrupção ou remoção do agente indutor do dano; 2. eliminação ou inativação de miofibroblastos; 3. inativação da resposta inflamatória e ativação de vias restauradoras da homeostase hepática; 4. degradação da matriz extracelular (CALIGURI et al., 2021).

Apesar do aumento crescente nos conhecimentos sobre a patologia e dos estudos na busca de terapias antifibróticas, os efeitos obtidos em ensaios clínicos são limitados ou ausentes, não existindo até o momento terapia aprovada pelos órgãos reguladores competentes (ROEHLEN; CROUCHET; BAUMERT, 2021). Portanto, estudar mecanismos celulares que permitem a reversão do quadro patológico nas CEHs como a inativação de vias inflamatórias e aumento da degradação da cicatriz fibrosa são de grande relevância e alvo de pesquisas da atualidade para o desenvolvimento das terapias supracitadas que se revelem realmente eficazes (FRIEDMAN; PINZANI et al., 2022).

### **1.3 Células estreladas hepáticas e a sua transativação metabólica na fibrogênese hepática**

As CEHs possuem plasticidade celular que altera seu fenótipo e fisiologia frente às alterações no tecido hepático (TRIVEDI; WANG; FRIEDMAN, 2020), com a capacidade de se transdiferenciar de uma condição quiescida à ativada, ou vice-versa (CALIGURI et al., 2021). Em quadros de lesão hepática, essas células são ativadas numa sequência coordenada de etapas (Figura 2) que podem ser divididas em fases:

**Fonte:** Adaptado de Trivedi et al., 2020.



**Figura 2** – Ativação de CEHs e resolução. Após a lesão hepática, as células estelares hepáticas iniciam a ativação, tornando-se responsivas às citocinas e sinais solúveis. Quando o agente causador da lesão é retirado, o destino das CEHs inclui a inativação, senescência ou apoptose. Quando o dano se torna crônico, ocorre a perpetuação da ativação das CEHs que adquirem características como maior proliferação, contratilidade, fibrogênese e degradação da MEC alterada, quimiotaxia, e podem contribuir ainda para a imunomodulação e sinalização pró-inflamatória.

1. Iniciação - etapa da sinalização celular modulada por hepatócitos danificados e apoptóticos que ativam as CEHs aumentando a produção de elementos da MEC, infiltração inflamatória e de mediadores pró-fibrogênicos e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FRIEDMAN; PINZANI et al., 2022) que, conjuntamente, alteram a expressão gênica das CEHs elevando sua responsividade às citocinas e demais estímulos. Esses estímulos, caso persistentes, contribuem para as etapas subsequentes da patologia. Uma vez que estímulos

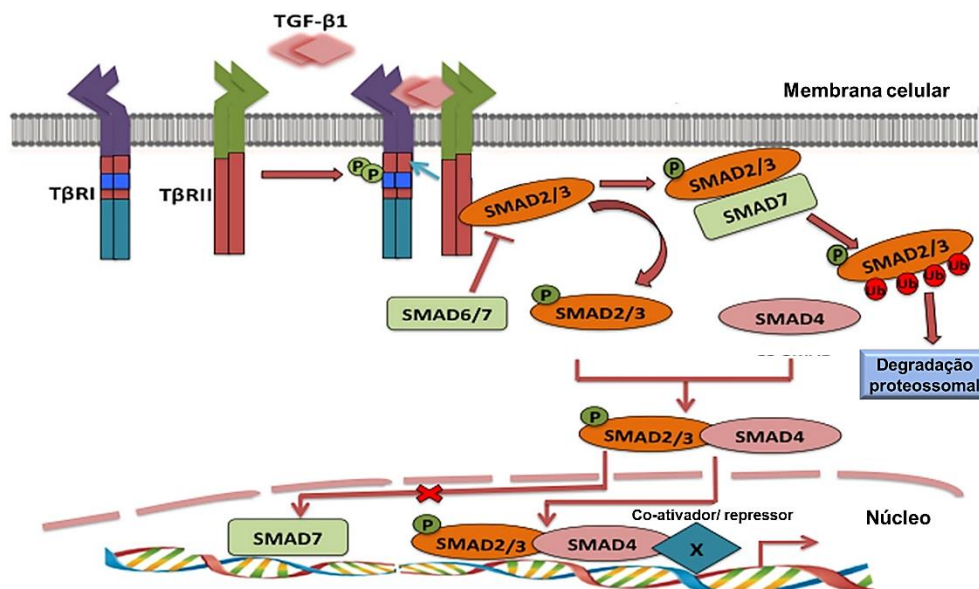
antifibróticos atuem (autofagia, senescência ou mesmo apoptose das CEHs), o quadro fibrosante tende a regredir (KISSELEVA; BRENNER et al., 2021).

2. Perpetuação – considerando-se a manutenção do fenótipo ativado, as células alteram seu fenótipo à miofibroblastos; essa alteração morfológica ocorre devido a alterações na distribuição de elementos do citoesqueleto. Consequentemente, ocorrem alterações na motilidade e a contratilidade celular, fazendo com que as CEHs percam a capacidade de armazenar retinóides, e apresentem alterações no metabolismo, proliferação, quimiotaxia, produção de citocinas e quimiocinas, degradação da matriz e produção exacerbada de componentes fibrogênicos, principalmente colágenos tipo I e III (KHOMICH; IVANOV; BARTOSCH, 2020; KISSELEVA; BRENNER, 2021).

Por sua vez, para sustentar esses mecanismos de transdiferenciação celular e o mecanismo fibrogênico, vias de sinalização interconectadas atuam no universo celular. Dentre essas vias de sinalização, as vias moduladas pelos fatores de crescimento transformador  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), derivado de plaquetas (PDGF) e do tecido conjuntivo (CTGF) (KISSELEVA; BRENNER, 2021) são relevantes. Particularmente, TGF- $\beta$  é a citocina pró-fibrogênica mais potente, sua ativação contribui com a modulação do quadro pró-inflamatório, com a migração e a contratilidade das CEHs (DEWIDAR et al., 2019). TGF $\beta$ -1 atua em diferentes vias de sinalização (canônicas e não-canônicas) que se inter relacionam e transativam as CEHs tais como: a via de proteínas mães contra o homólogo decapentaplégico (SMADs) e vias dependentes de sinalização mediadas por proteínas quinases como: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), p38 e c-JUN N-terminal quinase (JNK) (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017).

A via canônica TGF $\beta$ /SMAD (Figura 3) é considerada a mais relevante para a fibrose hepática. Nessa via, TGF $\beta$ -1 liga-se ao receptor de TGF $\beta$  II (T $\beta$ RII), se dimeriza ao receptor de TGF $\beta$  tipo I (T $\beta$ RI) resultando na sua auto-fosforilação e subsequente ativação do complexo das proteínas SMAD2 e 3. Essas proteínas fosforiladas formam um complexo com as proteínas SMAD4 e são realocadas para o núcleo, onde regulam a transcrição dos genes relevantes na fibrogênese hepática (AASHAQ et al., 2022) atuando nas mudanças no citoesqueleto e na composição da MEC. Ao mesmo tempo, SMAD6 e 7 são consideradas reguladores negativos dos efeitos induzidos por TGF $\beta$ -1 na fibrose hepática (PENG et al., 2022).

Fonte – Adaptado de Aashaq et al., 2022.



**Figura 3** – Via de sinalização TGF-β1 dependente de SMADs. A ligação da citocina TGF-β1 aos receptores da superfície celular desencadeia o recrutamento e fosforilação das SMADs 2 e 3, que formam um complexo com a SMAD 4 que atua como co-fator. Este complexo é deslocado ao núcleo onde ativam a expressão dos genes responsivos ao TGF-β1. Os SMADs 6 e 7, por sua vez, regulam negativamente a expressão dos genes-alvo da via. Ambos atuam competindo com os SMADs 2 e 3 pela ligação ao receptor, e a SMAD 7 pode interagir com as SMADs 2 e 3 fosforiladas, mediando sua degradação proteossômica, ou se ligar aos elementos responsivos às SMADs no DNA inibindo a ligação do complexo SMAD 2, 3 e 4.

Na fibrogênese hepática, as múltiplas vias de sinalização convergem na ativação das CEHs. Classicamente, observa-se o remodelamento do citoesqueleto pela alteração da disposição de feixes de actina e miosina (CUI et al., 2014). Na sequência, as CEHs passam a expressar  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) em altas quantidades, que são incorporadas às fibras de estresse, favorecendo alterações na motilidade, na contratilidade, bem como no fenótipo celular (TOJKANDER; GATEVA; LAPPALAINEN, 2012). Paralelamente, frente à ativação das CEHs, o microambiente ao redor dessas células sofre remodelação enquanto no fígado normal a MEC é composta por colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos e elastina (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Após a ativação, as CEHs passam a produzir de forma abundante colágenos tipos I, III e IV, fibronectina, laminina, proteoglicanos e mediadores inflamatórios (ROEHLEN; CROUCHET; BAUMERT, 2020), resultando em um aumento em até dez vezes dos elementos pró-fibróticos na MEC (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Resumidamente, a ativação das CEHs requer reprogramação e adaptações metabólicas nas quais o metabolismo lipídico atua significativamente (KHOMICH; IVANOV; BARTOSCH, 2020).

### 1.3.1 Metabolismo lipídico em CEHs

A capacidade de armazenar lipídios em gotículas é característico de quase todas as células eucarióticas. Entretanto, nas CEHs quiescidas (CEHq), essa capacidade metabólica se associa à capacidade de armazenamento de vitamina A, caracterizando-se como um verdadeiro depósito dessas moléculas no organismo (MOLENAAR; VAANDRAGER; HELMS, 2017). As CEHs armazenam entre 50 e 95% da vitamina A do corpo, composta por retinol e seus metabólitos, dentre os quais, mais de 95% são armazenados como ésteres de retinil e correspondem à 30 a 50% do conteúdo das GLs das CEHs (TRIVEDI; WANG; FRIEDMAN, 2020). Além disso, as CEHq são caracterizadas pela expressão de marcadores neurais e mesodérmicos, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a desmina, moléculas de adesão entre células neurais (NCAMs) e proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (PUDEWELL et al., 2022). Cabe observar que a manutenção da quiescência é decorrente de um programa transcricional que modula a expressão de vários genes, dentre os quais, os fatores transcricionais adipogênicos (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )) e a proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP1c) (ELA et al., 2005). Estes receptores controlam genes que conduzem a síntese de ácidos graxos, substrato importante para a esterificação do retinol em CEHq, e sua relevância é destacada pela reversão da ativação de CEHs quando induzidos de forma ectópica (TRIVEDI; WANG; FRIEDMAN, 2020).

Considerando-se a ativação das CEHs, faz-se necessária a rápida adaptação do organismo para sustentar a demanda energética aumentada pelas características fisiológicas adquiridas, sendo de suma importância uma reprogramação do metabolismo resultando na liberação do conteúdo das gotículas lipídicas. Estas sendo metabolizadas fornecem ácidos graxos para oxidação, gerando energia para transdiferenciação celular (WAAKER; VAANDRAGER; HELMS, 2020). Ainda, estudos apontam que, após a ativação, essas células sofrem redução nos fatores adipogênicos, o que suscita alterações na dinâmica de GL (TRIVEDI; WANG; FRIEDMAN, 2020).

Nas CEHs, as gotículas lipídicas endógenas são divididas em dois subgrupos: gotículas pré-existent (“antigas”), localizadas predominantemente ao redor do núcleo e contendo predominantemente triglicerídeos, ésteres de retinil e a enzima lectina-retinol acetiltransferase (LRAT) e gotículas dinâmicas (“novas”), que são relativamente menores e distribuídas na periferia da CEH, que contêm menor abundância de ésteres de retinil e são enriquecidas em triglicerídeos contendo um ou mais ácidos graxos poliinsaturados (MOLENNAR; VAANDRAGER; HELMS, 2017). Particularmente, no início do processo de ativação, as GLs sofrem quebra e remodelação, seus tamanhos são reduzidos e seus números aumentados (TUOHETAHUNTILA et al., 2017). Quanto ao perfil lipidômico, o conteúdo de ésteres de retinil é rapidamente reduzido junto ao aumento transitório nas quantidades de triglicerídeos (TG) (HOU; SYN, 2018) e de moléculas lipídicas bioativas não-retinóides, como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, endocanabióides e ceramidas, que também contribuem na transdiferenciação das CEHs e na sinalização parácrina (SHMARAKOV et al., 2019).

Na perpetuação da ativação, essas células reduzem a quantidade total de ácidos graxos livres e TG, consistente com a perda observada nas GLs e consequentemente, do fenótipo adipogênico (SHMARAKOV et al., 2019). Dentre as adaptações para este processo, essas células apresentam aumento na atividade e número de mitocôndrias, elevada atividade na cadeia transportadora de elétrons, processo primário gerador de EROs, que são observadas elevadas em CEHa (DELGADO et al., 2021).

#### **1.4 Elementos moduladores da transdiferenciação das CEH: o estresse oxidativo**

A fibrose hepática é caracterizada, dentre outros elementos, por uma alta produção de EROs (ZHOU; ZHENG; CHEN, 2022). Produção esta, por sua vez, que induz fissão mitocondrial nas CEHs (ZHOU et al., 2022) e favorece aumento da liberação e ativação de TGF- $\beta$ , que conjuntamente contribuem para a ativação das CEHs (DEWIAR et al., 2019), potencializando os mecanismos deletérios. Após a ativação, essas células aumentam a fosforilação oxidativa (ZHOU et al., 2022) e a

expressão de NADPH oxidases 1, 4 e 5 (ROEHLEN; CROUCHET; BAUMERT, 2020).

A homeostase da oxidação-redução (homeostase-redox) é fundamental para a vida, e permeia praticamente todos os processos fisiológicos (SIES et al., 2017). Durante as reações de oxidação de ácidos graxos e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, elétrons são transferidos para os aceptores dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e, na sequência, são utilizados na produção de energia durante sua transferência para o  $O_2$  via cadeia transportadora de elétrons. Nesse processo, um pequeno número de espécies reativas de oxigênio é inevitavelmente formado pelo vazamento de elétrons durante o transporte (DEVLIN, 2011).

As espécies reativas de oxigênio incluem radicais livres, como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e espécies reativas não radicais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Radicais livres são espécies químicas reativas que apresentam um elétron desemparelhado na órbita externa, com alto potencial reativo (PISOSCHI; POP, 2015). O  $H_2O_2$ , diferente dos radicais livres, possui meia-vida longa, atravessa membranas celulares e apresenta alto potencial tóxico por gerar o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (BARBOSA et al., 2010). Por sua vez, a produção do  $O_2^{\cdot-}$  ocorre principalmente nos Complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, após a transferência de um elétron para moléculas de oxigênio (PISOSCHI; POP, 2015), permitindo a redução direta do oxigênio molecular a  $H_2O_2$  (RADI et al., 2018). EROS podem ser produzidos nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no retículo endoplasmático (DEVLIN, 2011). Além das fontes endógenas, as EROs podem ainda ser produzidas por fontes externas a partir de radiações ionizantes e xenobióticos, que podem gerar EROs pelo metabolismo desses compostos ou pela ativação de uma fonte endógena de EROs (KLAUNING, 2019).

No processo pró-fibrosante e na fibrose, o desbalanço da produção de EROs está presente, como reportado, desencadeando alterações celulares e moleculares no fígado e nas CEHs. Entretanto, frente à presença de agentes deletérios, a sobrevivência celular é garantida por mecanismos protetores, nos quais as células desencadeiam mecanismos de defesa antioxidantes, produzindo moléculas que neutralizam os efeitos das EROs. Os antioxidantes podem ser endógenos – enzimáticos ou não enzimáticos; ou exógenos. Dentre os antioxidantes enzimáticos

estão a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e  $H_2O$  e é considerada como o primeiro elemento de defesa contra os radicais livres. Na sequência, tem-se a glutathione peroxidase (GPx) que utiliza a glutathione reduzida (GSH) como redutor e a catalase (CAT), ambas enzimas neutralizam o  $H_2O_2$  (HE et al., 2017).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido úrico, ácido lipóico, bilirrubina, melatonina e, em destaque, a glutathione. Dentre os antioxidantes exógenos estão os carotenóides, vitamina E, A, C e flavonóides (NEHA et al., 2019).

No que diz respeito aos danos às biomoléculas, os lipídeos são as mais suscetíveis à oxidação. Sua interação com EROs leva à peroxidação lipídica, que altera a função de membranas e gera compostos secundários altamente reativos (KRUMOVA; COSA, 2016) como o malondialdeído e 4-hidroxinonenal, que podem formar adutos com proteínas e DNA (KLAUNING, 2019). A oxidação direta do DNA ocorre em baixos níveis, porém pode induzir graves alterações pela modificação das bases, as quais levam a mutações pontuais, deleções, inserções ou translocações cromossômicas (KRUMOVA; COSA, 2016; KLAUNING, 2019). Na interação com proteínas, o dano aos aminoácidos pode resultar em modificação da função destes e podem gerar graves consequências à célula (PISOSCHI; POP, 2015), sendo um fator a ser considerado nos mecanismos indutores da fibrose hepática.

Particularmente no fígado, o dano oxidativo às biomoléculas induzem apoptose e necrose de hepatócitos e amplificam a resposta inflamatória. Nas CEHs, o excesso de EROs pode gerar resultados dicotômicos; quando em níveis não tóxicos essas moléculas estimulam a o, proliferação e produção de colágeno nessas células, porém em altas concentrações, induzem a morte (PAIK et al., 2012). Assim, após ativadas, as CEHs necessitam de mecanismos adaptativos que propiciam a sobrevivência frente ao estresse oxidativo. Vários estudos nessa linha demonstraram que uma sinalização celular paralela é ativada durante a produção de EROS como o aumento da síntese do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2), que induz a expressão de enzimas antioxidantes (ZHOU; ZHENG; CHEN, 2022), e o fator de transcrição nuclear kappa B (NFKB), que contribui para a resistência da CEHa à apoptose (ZHANG et al., 2021), mas que, se sustentada a expressão desse fator, conduz a células ativadas à senescência, uma forma de parada do ciclo celular o qual em CEHa induz redução da secreção da MEC, numa

tentativa de resolver o processo fibrosante (ZHANG et al., 2021). Alterações no equilíbrio dinâmico da produção de EROS, favorecem a patologia hepática, indiscutivelmente.

### **1.5 Plantas medicinais como uma importante ferramenta biológica no tratamento de doenças hepáticas**

As plantas medicinais são aquelas utilizadas com propósito terapêutico (BRASIL, 2017). Seu uso foi estabelecido pela observação empírica das práticas animais, que consumiam plantas específicas devido a lesões, e com o passar do tempo, os seres humanos sistematizaram seu uso, conciliando com aspectos filosóficos e culturais (PATRÍCIO et al., 2022). Essas plantas são utilizadas na medicina tradicional que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2019), é a soma de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde, diagnóstico, melhora ou tratamento de doenças físicas e mentais.

Ao longo dos séculos, a medicina convencional moderna passou a ser valorizada ao mesmo tempo que o uso de plantas medicinais foi relegado (PATRÍCIO et al., 2022). Porém, nos últimos anos, o uso de plantas medicinais tem retornado ao interesse popular de forma crescente, o que pode ser atribuído a fatores diversos como a insatisfação do paciente com o tratamento médico, prevenção de comorbidades, baixo custo e fácil acesso (LÓPEZ-GIL et al., 2017; ALI et al., 2018). Com os desafios diversos e crescentes em saúde, o interesse tem se destacado não só no uso popular, mas também nos sistemas de saúde públicos (OMS, 2019), manifestado pelo crescente desenvolvimento de políticas de incentivo.

Em 1979 ocorreu o primeiro marco de incentivo da OMS junto ao Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), objetivando-se incentivar o uso da medicina tradicional. Na Conferência Internacional sobre a Atenção Primária, houve o incentivo da elaboração de políticas e regulamentações nacionais para o uso de plantas medicinais de eficácia comprovada. Em 2002 foi lançada a Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005 visando abordar questões de política, segurança, eficácia, qualidade, acesso e uso racional da medicina tradicional, complementar e alternativa. Como resultado, 25 dos 191 estados-membros

desenvolveram políticas de medicina tradicional, dentre os quais o Brasil não estava incluso (OMS, 2002). Em nosso país, o Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo geral de: “Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2006). Com esse Decreto, vislumbram-se objetivos específicos visando a ampliação de opções terapêuticas aos usuários do serviço público de saúde, garantindo acesso a plantas medicinais e fitoterápicos considerando o conhecimento tradicional associado; a construção de marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos; a promoção de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva (BRASIL, 2006).

Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde) (RENISUS), o qual consta 71 plantas medicinais que apresentam evidência para a indicação na atenção básica, com a finalidade de orientar pesquisas e estudos, atuando na promoção da segurança e eficácia do uso de plantas medicinais. Atualmente já foram publicadas 3 monografias, 51 estão sendo finalizadas e 21 elaboradas, com um investimento total de R\$2.010.226,00 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Posteriormente, a Portaria nº 886 de 2010 instituiu o programa Farmácia Viva no âmbito do SUS, considerando a necessidade de ampliação da oferta de fitoterápicos e de plantas medicinais (BRASIL, 2010), regulamentado pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 18, de 03 de abril de 2013. Esta Resolução dispõe sobre as boas práticas para todas as etapas constitutivas dos processos desempenhados pelo programa Farmácia Viva (BRASIL, 2013).

No âmbito internacional, está em progresso a Estratégia de Medicina Tradicional da OMS 2014-2023, em resposta às necessidades identificadas pelos estados-membros de 2002 a 2005. A estratégia tem como objetivos apoiar os Estados-Membros no desenvolvimento de políticas proativas e na implementação de planos de ação que fortaleçam o papel da medicina na manutenção das populações saudáveis. No relatório de 2018, 98 dos Estados-Membros apresentam política nacional para medicina tradicional complementar, projeto significativo desde a estratégia 2002-2005 (OMS, 2019).

Como resultado do aumento no interesse popular junto às políticas de incentivo, atualmente, em países desenvolvidos, o uso de medicamentos à base de plantas medicinais alcança 70-90% da população (ANAND et al., 2019). Essa mudança vem sendo acompanhada do desenvolvimento crescente da pesquisa etnofarmacológica, que objetiva fornecer evidências científicas sobre o uso das plantas medicinais e, ao mesmo tempo, garantir a preservação deste patrimônio cultural (DAS et al., 2022). Além disso, os componentes das plantas medicinais vêm sendo empregados na terapia moderna e no auxílio ao desenvolvimento de moléculas mais complexas (DUTRA et al., 2016). Dentre as propriedades terapêuticas das plantas medicinais investigadas, destaca-se a capacidade hepatoprotetora, decorrente de propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antifibróticas, antivirais, imunomodulatórias e anticancerígenas (VARGAS-POZADA; MURIEL, 2020). Os fitoconstituintes que demonstram atividades hepatoprotetoras e terapêuticas são diversos, dentre eles os flavonoides, ácidos fenólicos, monoterpenóides, diterpenóides, triptenóides, alcalóides, cromados, capsaicinóides, curcuminóides e antraquinonas (DAS et al., 2020).

Considerando-se as propriedades benéficas das plantas medicinais, deve-se explorar o potencial das mesmas para o tratamento de anomalias hepáticas. Entretanto, são necessárias investigações mais aprofundadas antes que se chegue a uma recomendação final (VARGAS-POZADA; MURIEL, 2020), envolvendo ensaios clínicos, para uma recomendação segura do uso desses produtos. Plantas produzem metabólitos secundários como parte do seu mecanismo de defesa levando-as a induzir mecanismos tóxicos; ademais, o uso das plantas medicinais pode induzir efeitos indesejáveis com o emprego excessivo ou sobredosagem, a forma de obtenção e/ou tempo do processamento (LÓPEZ-GIL et al., 2017). Um dos efeitos conhecidos é a lesão hepática induzida por ervas, considerando-se a alta atividade metabolizadora do órgão, levando a diversos casos já relatados com uma parcela deles acarretando a necessidade de transplante de fígado e outros levando à óbito (NAVARRO et al., 2014, LEE et al., 2015).

Além das plantas medicinais, o uso de fitoterápicos que incluem os medicamentos obtidos de matérias-primas vegetais (BRASIL, 2006), também demanda atenção. Esses podem ser administrados como infusões, decocções, xaropes, loções ou compressas, e são distribuídos sem a necessidade de ensaios

clínicos ou supervisão rigorosa como aquela necessária para a distribuição de medicamentos convencionais (LÓPEZ-GIL et al., 2017). Dos produtos fitoterápicos comercializados mundialmente, poucos dispõem da descrição de seus componentes ativos. Alguns possuem composição química heterogênea entre os lotes, o que pode interferir de forma direta na sua atividade biológica (LÓPEZ-GIL et al., 2017). Assim, uma das maiores preocupações, além da avaliação rigorosa sobre a eficácia e a segurança do uso do fitoterápico, é identificar e padronizar os métodos exatos de preparação de um extrato, identificação de ingredientes, além detalhes da administração (ALI et al., 2018).

Assim, observamos a importância do desenvolvimento de estudos que avaliem as plantas medicinais e seus componentes, tendo em vista que são amplamente utilizados, muitos dos quais sem informações substanciais que assegurem seu uso de forma adequada. Apesar deste ponto de atenção, seu uso demonstra grande potencial como terapêutica acessível e de baixo custo, especialmente para o desenvolvimento de medicamentos hepatoprotetores e de regeneração hepática.

### **1.5 Óleo essencial de losna em doenças hepáticas**

Considerando-se a utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças associadas ao fígado, a *Artemisia absintium* (losna) é amplamente utilizada no Brasil e em outras regiões do globo para o tratamento de problemas gastrointestinais, hepáticos e parasitário. O seu uso tradicional no país é expressivo, a espécie integra a RENISUS e é ainda disponibilizada *in natura* no programa Farmácia Viva e na assistência básica de saúde (FRAGOSO, 2014).

*A. absinthium* é uma planta perene tipo arbusto, fortemente pubescente e com odor intenso e acentuado. Seu caule e folhas são verde-acinzentado, e em suas folhas há presença de pelos secretores de óleo essencial (AMIDON et al., 2014). É uma planta originária da Europa, Ásia Ocidental e Norte da África, introduzida e aclimatada na América do Norte e América do Sul e cultivada atualmente nos países do sul da Europa, EUA e Brasil (SZOPA et al., 2020). Essa planta possui numerosos compostos responsáveis por suas atividades biológicas, dentre eles o óleo essencial.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas, que contêm uma mistura complexa de compostos orgânicos voláteis como terpenos e sesquiterpenos, álcoois, entre outros (AZIZ et al., 2018). Esses extratos possuem compostos principais em altas concentrações (20-70%), com grande relevância para sua atividade e componentes em baixas concentrações, que podem desempenhar um papel secundário, potencializando ou antagonizando os efeitos dos componentes principais (PERRICONE et al., 2015). Por ser um metabólito secundário, o teor de óleo essencial varia tanto qualitativa quanto quantitativamente, dependendo da região geográfica e condições ambientais, assim se torna importante a identificação de seus componentes. Entre os benefícios do óleo essencial de losna (OE) estão a atividade antimicrobiana, antifúngica, neuroprotetora, antimalárica, antidepressiva, analgésica anticâncer, anti-helmíntica e repelente (BEIGH; GANAI, 2017; SZOPA et al., 2020). Na literatura, porém, são escassos os estudos que avaliam os efeitos do OE de losna no fígado. Portanto, uma avaliação mais abrangente dos efeitos hepatoprotetores ou não deve ser detalhada. Alguns estudos apontam a indução de toxicidade oral em camundongos, mesmo em baixa dosagem, induzindo, em poucas horas, problemas neurológicos, musculares e gastrointestinais, não apresentando, porém, resultados deletérios quando do uso tópico do OE como repelente (Mihajilov-Krstev et al., 2014). Certamente, novas análises são necessárias, considerando-se a ampla utilização do OE de losna pela indústria cosmética, pela indústria de bebidas e em produtos de limpeza. Na indústria alimentar, a *A. absinthium* é o principal ingrediente da bebida alcoólica absinto, que apresenta alto teor de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona, componentes comuns no óleo essencial, e utilizado ainda para conferir aroma e amargor à vinhos (SZOPA et al., 2020). Percebe-se, pois, uma ampla utilização do OE da losna, em vários setores da economia, o que torna urgente a avaliação de seus efeitos na saúde hepática e no comprometimento ou não de quadros fibrosantes do órgão, embora o potencial tóxico do mesmo ainda seja pouco estudado, o que cabe ser avaliado cuidadosamente, para que possa ser explorada sua utilização terapêutica.

## **1.6 Modelos celulares como estratégia alternativa para análise do potencial toxicológico de plantas medicinais**

O princípio conhecido como 3R's, de Substituição, Redução e Refinamento na experimentação animal (*Replacement, Redua qualction and Refinement*), trouxe à luz a importância da utilização da cultura de tecidos mamíferos como uma das técnicas de substituição mais importantes (RUSSELL; BURCH, 1959). Desta forma, a preocupação com o bem-estar animal trouxe a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens para a avaliação de segurança de compostos químicos (DENT et al., 2018), junto à alta incidência de lesão hepática induzida por drogas, inclui a lesão hepática induzida por ervas, a qual demanda o desenvolvimento de modelos celulares que permitam prever a hepatotoxicidade (KAMMERER; KÜPPER, 2018).

Os hepatócitos, como visto anteriormente, são células altamente metabolizadoras que contribuem primariamente para a função de desintoxicação do fígado, apresentando enzimas de biotransformação de fase I e fase II e, consequentemente, linhagens celulares de hepatócitos são frequentemente utilizadas em estudos de hepatotoxicidade (VINKEN; HENGSTLER, 2018). Além dos hepatócitos, sabe-se que as CEHs também contribuem para o metabolismo de xenobióticos, expressando enzimas como álcool e acetaldeído desidrogenases, diversas isoformas do citocromo P450 (CYP1A1, CYPC11, CYPA2, CYP2D1, CYP2S1 e CYP3A) e glutational S-transferase (GST) (SUFLETEL et al., 2020), mas que, por sua vez, faz-se necessário que sejam elucidados os mecanismos induzidos frente ao composto tóxico que, em conjunto, levam à ativação de CEHa e, quando crônicas as lesões induzidas, contribui para o desenvolvimento de fibrose (ASRANI et al., 2018). Desta forma, estudos atuais têm objetivado elucidar os efeitos de compostos químicos em CEHs, como a exposição à altas concentrações de ácidos graxos (HETHERINGTON et al., 2016), ao arsenito de sódio (FAN et al., 2018) e ao triclosan (MIRANDA et al., 2020).

Entre as ferramentas para o estudo de toxicidade em CEHs, as linhagens celulares apresentam diversas vantagens, como vida útil ilimitada, facilidade na padronização e alta reprodutibilidade (JENNINGS et al., 2015), e destas se destaca a linhagem LX-2 estabelecida por Xu e colaboradores (2005) através de pressão de seleção de crescimento de um subconjunto de células LX-1 (linhagem desenvolvida pelo mesmo autor) por passagem precoce em soro reduzido (1%), para que a linhagem fosse viável na ausência do suporte de fator de crescimento sérico, característica presente em CEHs primárias. Essa linhagem possui alta plasticidade

celular de acordo com a concentração de soro presente no meio de cultivo. Assim, em baixas concentrações, ela apresenta características morfológicas e metabólicas semelhantes às CEHq (CEHq *like*) e, na presença de altas concentrações de soro (10%), apresenta atributos de CEHa, e representa, desta maneira, uma importante ferramenta para o estudo de mecanismos de fibrogênese hepática, incluindo aqueles induzidos por toxicidade.

## 5. CONCLUSÃO

O OE de losna na concentração 0.4 ug/ mL demonstrou potencial anti-fibrótico pela redução dos marcadores pró-fibrogênicos, porém, induziu concomitantemente alterações diversas nas CEHa, tanto morfológica quanto molecular, distintas das exibidas pelas CEHq *like*, que demonstram perturbação da homeostase celular. Mecanismos diversos de resposta ao estresse foram induzidos, demonstrando a toxicidade preditiva do OE na concentração (0.4 µg/ µL) e tempo de exposição (24 h) utilizados.

Estudos adicionais serão importantes para compreender os efeitos do OE de losna no contexto de doenças hepáticas e avaliar seu potencial toxicológico, demonstrado no presente trabalho em CEHs, de forma a direcionar sua utilização segura, e estabelecer regulamentações quanto ao seu uso.

## REFERÊNCIAS

AASHAQ et al. TGF-β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. **J Cell Physiol.**, v. 237, n. 1, p. 59-85, july 2021.

ANAND, U. et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 258–271, nov. 2019.

ANTHONY, B. et al. Schistosoma mansoni: Egg-induced downregulation of hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. **Exp Parasitol.**, v. 124, n. 4, p. 409–420, apr. 2010.

ASRANI, S. K. et al. Burden of liver diseases in the world. **J Hepatol.**, v. 70, n. 1, p. 151–171, jan. 2019.

AYDIN, M. M.; AKCALI, K. C. Liver fibrosis. **Turk J Gastroenterol.**, v. 29, n. 1, p. 14–21, jan. 2018.

AZIZ, Z. A. A. et al. Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - A review. **Curr Drug Metab.**, v. 19, n. 13, p. 1100–1110, nov. 2018.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev de Nut.**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARRY, A. E. et al. Hepatic stellate cells and hepatocarcinogenesis. **Front Cell and Dev Biol.**, v. 8, p. 709, aug. 2020.

BEIGH, Y. A.; GANAI, A. M. Potential of Wormwood (Artemisia absinthium Linn.) herb for use as additive in livestock feeding: A review. **Pharma innov.**, v. 6, n. 8, p. 176–187, july 2017.

BONNEFONT J. P. et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. **Mol Aspects Med.**, v. 25, n. 5-6, p. 495-520, dez. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília, p. 2, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. **Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).** Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 18, de 3 de abril de 2013. **Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).** Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** Brasília, 2014.

BRACKEN, C. P.; GOODALL, G. J. The many regulators of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 23, n. 2, p. 89-90, feb. 2022.

BUCHHEIT, C. L.; WEIGEL, K. J.; SCHAFER, Z. T. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 9, p. 632–641, sept. 2014.

BURRIDGE, K.; GUILLUY, C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. **Exp Cell Res.**, v. 343, n. 1, p. 14–20, apr. 2016.

CAJA, L. et al. TGF- $\beta$  and the tissue microenvironment: Relevance in fibrosis and cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 19, n. 5, p. 1294, apr. 2018.

CALIGIURI, A. et al. Cellular and molecular mechanisms underlying liver fibrosis regression. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2759, oct. 2021.

CHEN, Z. et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radic Biol Med.**, v. 152, p. 116–141, may 2020.

CHEN, L. et al. Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1. **Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.** v. 309, n. 6, p. G491–G499, sept. 2015.

CHITRAJU, C.; WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. The triglyceride synthesis enzymes DGAT1 and DGAT2 have distinct and overlapping functions in adipocytes. **J Lipid Res.**, v. 60, n. 6, p. 1112–1120, june 2019.

COOK, D. et al. Cellular network modeling and single cell gene expression analysis reveals novel hepatic stellate cell phenotypes controlling liver regeneration dynamics. **BMC Syst Biol.**, v. 12, n. 1, p. 86–115, dec. 2018.

CUI, X. et al. F-actin cytoskeleton reorganization is associated with hepatic stellate cell activation. **Mol Med Rep.**, v. 9, n. 5, p. 1641–1647, may 2014.

CURRIE, E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell Metab.**, v. 18, n. 2, p. 153–161, aug. 2013.

DA SILVA, W.; DOS SANTOS, R. A. S.; MORAES, K. C. M. Mir-351-5p contributes to the establishment of a pro-inflammatory environment in the H9c2 cell line by repressing PTEN expression. **Mol Cell Biochem.**, v. 411, n. 1–2, p. 363–371, 2016.

DAS, R. et al. Medicinal plants used against hepatic disorders in Bangladesh: A comprehensive review. **J Ethnopharmacol.**, v. 282, p. 114588, jan. 2022.

DELGADO, M. E. et al. Metabolic reprogramming of liver fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3604–3626, dec. 2021.

DA SILVA, B. O.; RAMOS, L. F.; MORAES, K. C. M. Molecular interplays in hepatic stellate cells: apoptosis, senescence, and phenotype reversion as cellular connections that modulate liver fibrosis: Cellular interplays in liver fibrosis. **Cell Biol Int.**, v. 41, n. 9, p. 946–959, sep. 2017.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas**. [s.l.] Editora Blucher, 2011.

DEWIDAR et al. TGF- $\beta$  in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—Updated 2019. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1419–1454, nov. 2019.

DROPMANN, A. et al. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 abundance in liver diseases of mice and men. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19499–19518, apr. 2016.

DUNNING, S. et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. **Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis.**, v. 1832, n. 12, p. 2027–2034, dec. 2013.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res.**, v. 112, p. 4–29, oct. 2016.

EIJKELENBOOM, A.; BURGERING, B. M. T. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 2, p. 83-97, feb. 2013.

FAN, L. L. et al. Effects of sodium arsenite exposure on activation and extracellular matrix secretion of human hepatic stellate cells. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.**, v. 52, n. 10, p. 983-987, oct. 2018.

FABREGAT, I.; CABALLERO-DÍAZ, D. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. **Front Oncol.**, v. 8, p. 357–375, sept. 2018.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 20, n. 9, p. 689-709, sep. 2021.

FRAGOSO, T. P. **Análise do uso medicinal do gênero Artemisia no Brasil com base em fatores tradicionais, científicos, políticos e patentários para subsidiar o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Orientador: Fabiana dos Santos e Souza Frickmann. 2014. Monografia (Especialização em Gestão da Inovação em Fitomedicamentos) – Instituto de Tecnologia em Fármacos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2014.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. **Physiol Rev.**, v. 88, n. 1, p. 125–172, jan. 2008.

FRIEDMAN, S. L.; PINZANI, M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future. **Hepatology**, v. 75, n. 2, p. 473-488, fev. 2022.

GANDHI, S.; APRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2012, p. 1–11, may 2012.

GENG, Y. et al. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? **Hepatol Int.**, v. 15, n. 1, p. 21-35, feb. 2021.

HAAKER, M. W.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B. Retinoids in health and disease: A role for hepatic stellate cells in affecting retinoid levels. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.**, v. 1865, n. 6, p. 158674, jun. 2020.

HE, L. et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cell Physiol Biochem.**, v. 44, n. 2, p. 532-553, nov. 2017.

HETHERINGTON, A. M. et al. Differential lipotoxic effects of palmitate and oleate in activated human hepatic stellate cells and epithelial hepatoma cells. **Cell Physiol Biochem.**, v. 39, n. 4, p. 1648–1662, 2016.

HOU, W.; SYN, W. Role of metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. **Front Cell Dev Biol.**, v. 6, p. 150, nov. 2018.

HUANG, Q. et al. Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFKB and TP53 pathways. **Autophagy**, v. 12, n. 6, p. 999-1014, jun. 2016.

HUANG, W. H. et al. The role of hepatic stellate cells in promoting liver metastasis of colorectal carcinoma. **Onco Targets Ther.**, v. 12, p. 7573–7580, sept. 2019.

HUANG, Z. et al. Epithelial-mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. **MedComm.**, v. 3, n. 2, jun. 2022.

JENNINGS, P. “The future of in vitro toxicology”. **Toxicol in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1217–1221, sept. 2015.

JI, Y. et al. A high-throughput comet assay approach for assessing cellular dna damage. **J Vis Exp.**, vol. 10, p.63559, may 2022.

JIANG, L. et al. PDRG1, a novel tumor marker for multiple malignancies that is selectively regulated by genotoxic stress. **Cancer Biol Ther.**, v. 11, n. 6, p. 567–573, mar. 2011.

KAMMERER, S.; KÜPPER, J.-H. Human hepatocyte systems for in vitro toxicology analysis. **J Cell Biotechnol.**, v. 3, n. 2, p. 85–93, 21 sep. 2018.

KHANAM, A.; SALEEB, P. G.; KOTTILIL, S. Pathophysiology and treatment options for hepatic fibrosis: Can it be completely cured? **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1097, may 2021.

KHOMICH, O.; IVANOV, A. V.; BARTOSCH, B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 24–46, 20 dec. 2019.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 18, n. 3, p. 151–166, mar. 2021.

KLAUNIG, J. E. Oxidative stress and cancer. **Curr Pharm Des.**, v. 24, n. 40, p. 4771–4778, mar. 2019.

KODANI, N.; NAKAE, J. Tissue-specific metabolic regulation of FOXO-binding protein: FOXO does not act alone. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 702–721, mar. 2020.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. Em: NONELL, S.; FLORS, C. (Eds.). **Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 1, p. 1–21, jun. 2016.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 15, n. 3, p. 178-196, mar. 2014.

LEE, W.-J. et al. Systematic review on herb-induced liver injury in Korea. **Food Chem Toxicol.**, v. 84, p. 47–54, out. 2015.

LEONARD, M. O.; LIMONCIEL, A.; JENNINGS, P. Stress response pathways. In: BAL-PRICE, A.; JENNINGS, P. (Eds.). **In Vitro Toxicology Systems**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 433–458.

LI, J. et al. Extracellular vesicles-derived OncomiRs mediate communication between cancer cells and cancer-associated hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 2, p. 223–234, apr. 2020.

LIPSON, K. E. et al. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 5, n. S1, p. S24–S32, dec. 2012.

LÓPEZ-GIL, S. et al. Liver toxicity mechanisms of herbs commonly used in Latin America. **Drug Metab Rev.**, v. 49, n. 3, p. 338–356, 3 jul. 2017.

LUO, X.; HUANG, Y.; SHEIKH, M. S. Cloning and characterization of a novel gene PDRG that is differentially regulated by p53 and ultraviolet radiation. **Oncogene**, v. 22, n. 46, p. 7247–7257, 16 oct. 2003.

MALAUGBADAN, S.; NAUGOR, N. H. Anoikis. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 75-84.

MARCONI, G. D. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The type-2 emt in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1587–1601, june 2021.

MIHAJLOV-KRSTEV, T. et al. Antimicrobial, antioxidative, and insect repellent effects of *Artemisia absinthium* essential oil. **Plant Med**, v. 80, n. 18, p. 1698–1705, oct. 2014.

MIRANDA, J. F. et al. The modulatory effect of triclosan on the reversion of the activated phenotype of LX-2 hepatic stellate cells. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 34, n. 1, p. e22413, jan. 2020.

MOLENAAR, M. R.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B. Some lipid droplets are more equal than others: different metabolic lipid droplet pools in hepatic stellate cells. **Lipid insights.**, v. 10, p. 117863531774728, jan. 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dec. 1983.

MOLLER, P. Measurement of oxidatively damaged DNA in mammalian cells using the comet assay: Reflections on validity, reliability and variability. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 873, p. 503423, jan. 2022.

NAVARRO, V. J. et al. Liver injury from herbals and dietary supplements in the U.S. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1399–1408, oct. 2014.

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **Eur J Med Chem.**, v. 15, n. 178, p. 687-704, sep. 2019.

NGUYEN, L. P.; BRADFIELD, C. A. The search for endogenous activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Chem Res Toxicol.**, v. 21, n. 1, p. 102–116, jan. 2008.

OZOUGWU, J. C. Physiology of the liver. **Int J Pharma Bio Sci.**, v. 4, n. 8, p. 13-24, oct. 2017.

PAIK, J. K. et al. Circulating and PBMC Lp-PLA2 associate differently with oxidative stress and subclinical inflammation in nonobese women (menopausal status). **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e29675, fev. 2012.

PAROLA, M.; PINZANI, M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. **Mol Aspects Med.**, v. 65, p. 37-55, feb. 2019.

PATRÍCIO, K. P. et al. O uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde: revisão integrativa. **Cien Saúde Colet.**, v. 27, n. 2, p. 677–686, fev. 2022.

PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol.**, v. 62, n. 3, p. 720–733, mar. 2015.

PÉREZ, C. et al. The oncogene PDRG1 is an interaction target of methionine adenosyltransferases. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161672, 22 aug. 2016.

PERRICONE, M. et al. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 76, p. 1–7, feb. 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 5, n. 97, p. 55-74, jun. 2015.

Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/pnpmpf/ppnmpf/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-2013-renisus>>. Acesso em: 3 jul. 2022.

POTTER, T. M.; NEUN, B. W.; STERN, S. T. Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. In: MCNEIL, S. E. (Ed.). **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 697, p. 181–189.

PUCHE, J. E.; SAIMAN, Y.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1473–1492.

PUDEWELL, S. et al. Physical interaction between embryonic stem cell – expressed Ras (Eras) and Arginase in quiescent hepatic stellate cells. **Cells**, v. 11, n. 2, p. 508, feb. 2022.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 5 jun. 2018.

RAMBOLD, A. S.; COHEN, S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. **Dev Cell**, v. 32, n. 6, p. 678–692, mar. 2015.

REN, S. et al. Transforming growth factor- $\beta$ 2 upregulates sphingosine kinase-1 activity, which in turn attenuates the fibrotic response to TGF- $\beta$ 2 by impeding CTGF expression. **Kidney Int.**, v. 76, n. 8, p. 857–867, oct. 2009.

RIVES, C. et al. Oxidative stress in NAFLD: Role of nutrients and food contaminants. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1702, 21 dec. 2020.

ROEHLEN, N.; CROUCHET, E.; BAUMERT, T. F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 875–918, apr. 2020.

RUSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. **Med J Aust.**, v. 1, n. 13, p. 500–500, mar. 1960.

SAHEBNASAGH, A. et al. Aromatic Hydrocarbon Receptors in mitochondrial biogenesis and function. **Mitochondrion.**, v. 61, p. 85-101, nov. 2021.

SARI, T.; GATEVA, G.; LAPPALAINEN, P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. **J Cell Sci.**, v. 15, n. 8, p. 1855-1864, apr. 2012.

SCHINAGL, M. et al. Proteomic changes of activated hepatic stellate cells. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 23, p. 12782–12799, nov. 2021.

SHAW, P.; CHATTOPADHYAY, A. Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. **J Cell Physiol.**, v. 235, n. 4, p. 3119–3130, apr. 2020.

SHE et al. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. **J Biol Chem.**, v. 289, n.6, p. 4959-4967, feb. 2005.

SHMARAKOV, I. O. et al. Hepatic stellate cell activation: A source for bioactive lipids. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.**, v. 1864, n. 5, p. 629-642, may 2019.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annu Rev Biochem.**, v. 20, n. 86, p. 715-748, jun. 2017.

SIMMONS, S. O.; FAN, C. Y.; RAMABHADHAN, R. Cellular stress response pathway system as a sentinela ensemble in toxicological screening. **Toxicol Sci.**, v. 111, n. 2, p. 202-225, oct. 2009.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr Protoc Immunol.**, v. 2, n. 111, n. 1, p. A3.B1–A3.B3, nov. 2015.

SUFLETEL, R. T. et al. Hepatic stellate cells - from past till present: morphology, human markers, human cell lines, behavior in normal and liver pathology. **Rom J Morphol Embryol.**, V. 61, N. 3, P. 615-642, july 2020.

SUZUKI, T. et al. PKC $\eta$  regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 106, n. 1, p. 61–66, jan. 2009.

SZOPA, A. et al. *Artemisia absinthium* L.— Importance in the history of medicine, the latest advances in phytochemistry and therapeutical, cosmetological and culinary uses. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1063, 19 aug. 2020.

TRIVEDI, P.; WANG, S.; FRIEDMAN, S. L. The power of plasticity—Metabolic regulation of hepatic stellate cells. **Cell Metab.**, v. 33, n. 2, p. 242–257, feb. 2021.

TSENG, H. C. et al. Lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial fission contributes to collagen production in human cardiac fibroblasts. **J Lipid Res.** V. 60, n. 9, p. 1573-1589, sep. 2019.

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 14, n. 7, p. 397–411, july 2017.

TUOHETAHUNTILA, M. et al. Lysosome-mediated degradation of a distinct pool of lipid droplets during hepatic stellate cell activation. **J Biol Chem.**, v. 292, n. 30, p. 12436-12448, july 2017.

VARGAS-POZADA, E. E.; MURIEL, P. Herbal medicines for the liver: from bench to bedside. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 32, n. 2, p. 148–158, feb. 2020.

VINKEN, M.; HENGSTLER, J. G. Characterization of hepatocyte-based in vitro systems for reliable toxicity testing. **Arch Toxicol.**, v. 92, n. 10, p. 2981–2986, oct. 2018.

XIE, G.; DIEHL, A. M. Evidence for and against epithelial-to-mesenchymal transition in the liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 305, n. 12, p. G881–G890, 15 dec. 2013.

XING, Y. Q. et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. **Life Sci.**, v. 15, n. 193, p. 124-131, jan. 2018.

XU, F. et al. TGF- $\beta$ /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. **J Histochem Cytochem.**, v. 64, n. 3, p. 157–167, mar. 2016.

XU, L. 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, jan. 2005.

YANG, J. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 6, p. 341–352, june 2020.

YANG, N. et al. The role of extracellular vesicles in mediating progression, metastasis and potential treatment of hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3683–3695, 10 jan. 2017.

WINK, S. et al. Dynamic imaging of adaptive stress response pathway activation for prediction of drug induced liver injury. **Arch Toxicol.**, v. 92, n. 5, p. 1797-1814, may 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Primary health care: report of the International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, USSR, 6-12 September 1978.** Geneva: World Health Organization, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019.** Geneva: World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005.** Geneva: World Health Organization, 2002.

YANG, J. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 21, n. 6, p. 341-352, jun. 2020.

ZHANG, M. et al. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. **Mech Ageing Dev.**, v. 199, p. 111572, out. 2021.

ZHANG, X. et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res.**, v. 1813, n. 11, p. 1978–1986, nov. 2011.

ZHAO, Y. L.; ZHU, R. T.; SUN, Y. L. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis. **Biomed Rep.**, v. 4, n. 3, p. 269–274, mar. 2016.

ZHOU, J.; ZHENG, Q.; CHEN, Z. The Nrf2 pathway in liver diseases. **Front Cell Dev Biol.**, v. 10, p. 826204, feb. 2022.

ZHOU, Y. et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial fission promotes hepatic stellate cell activation via stimulating oxidative phosphorylation. **Cell Death Dis.**, v. 13, n. 8, p. 689, aug. 2022.

ZINATIZADEH, M. R. et al. The Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.*, v. 8, n. 3, p. 287-297, may 2021.