

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 Mestrado 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
Filho:06617965663 Dados: 2022.09.28 16:30:43 -03'00'

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



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 PROFISIONAL

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: Dedicção 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

α SMA: α 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 α 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: glutaciona peroxidase

GSH: glutaciona reduzida

GSR: glutaciona redutase

GST: glutaciona S-transferase

JNK: c-Jun N-terminal quinase

LRAT: lectina-retinol acetiltransferase

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógeno

MAPs: proteínas associadas aos microtúbulos

MEC: matriz extracelular

MLYCD: malonil-Coa descarboxilase

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

PGE₂: 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- β : fator de crescimento transformador β

T β R: receptor de TGF β

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.

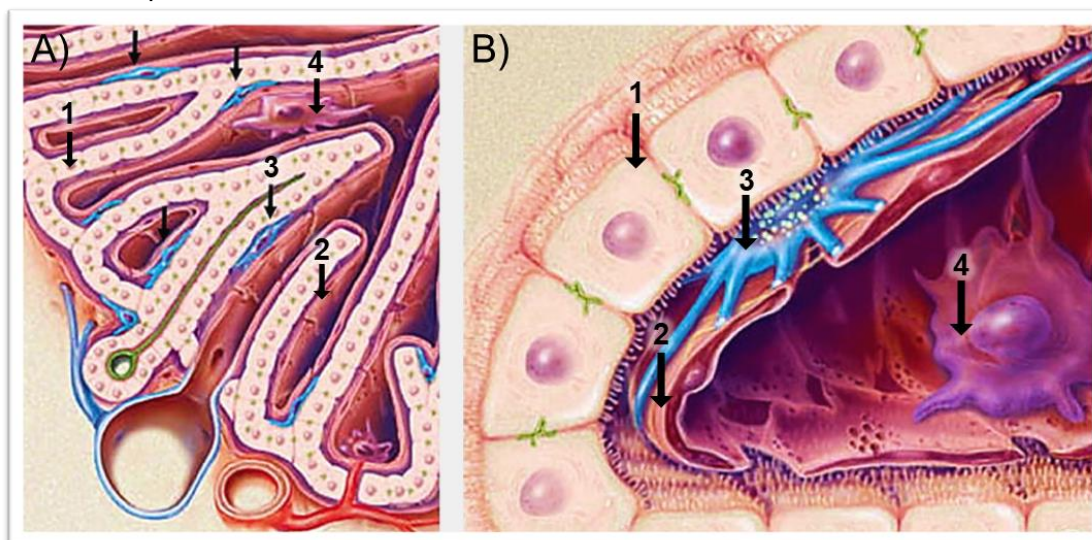


Figura 1 – Tipos de células hepáticas. A) Desenho representativo da arquitetura sinusoidal hepática, representando a orientação espacial das células hepáticas apontadas por setas, das quais células estreladas hepáticas estão representadas entre os hepatócitos e as células endoteliais, e as células de *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. Conseqüentemente, 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.

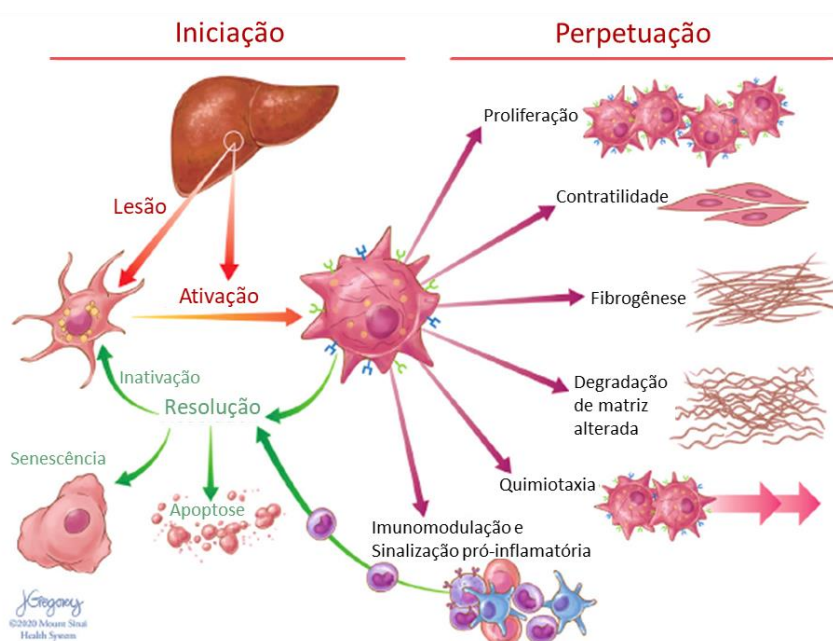


Figura 2 – Ativação de CEHs e resolução. Após a lesão hepática, as células esteladas hepáticas iniciam a ativação, tornando-se responsivas às citocinas e sinais solúveis. Quando o agente causador da lesão é retirado, o destino das CEHs inclui a inativação, senescência ou apoptose. Quando o dano se torna 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 atuam (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. Conseqüentemente, 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 β (TGF- β), derivado de plaquetas (PDGF) e do tecido conjuntivo (CTGF) (KISSELEVA; BRENNER, 2021) são relevantes. Particularmente, TGF- β 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 β -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 β /SMAD (Figura 3) é considerada a mais relevante para a fibrose hepática. Nessa via, TGF β -1 liga-se ao receptor de TGF β II (T β RII), se dimeriza ao receptor de TGF β tipo I (T β 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 β -1 na fibrose hepática (PENG et al., 2022).

Fonte – Adaptado de Aashaq et al., 2022.

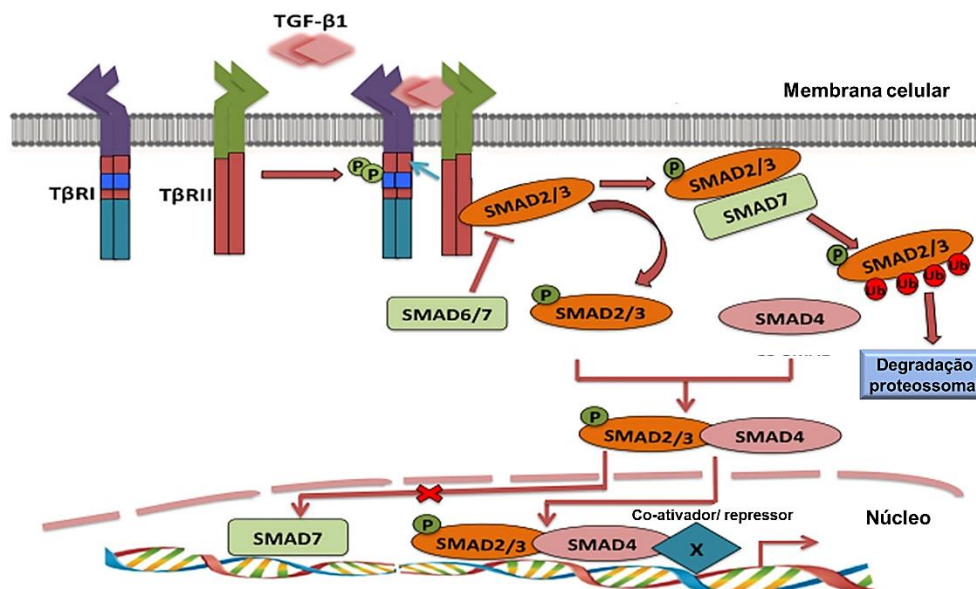


Figura 3 – Via de sinalização TGF- β 1 dependente de SMADs. A ligação da citocina TGF- β 1 aos receptores da superfície celular desencadeia o recrutamento e fosforilação das SMADs 2 e 3, que formam um complexo com a SMAD 4 que atua como co-fator. Este complexo é deslocado ao núcleo onde ativam a expressão dos genes responsivos ao TGF- β 1. 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 α -actina de músculo liso (α 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 γ (PPAR- γ)) 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-existentes (“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 conseqüentemente, 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- β , 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 glutathiona peroxidase (GPx) que utiliza a glutathiona 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 glutathiona. 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 absinthium* (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 α e β -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, conseqüentemente, 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.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial modulador do óleo essencial de *Artemisia absinthium* em vias relacionadas à fibrose hepática e ao estresse celular em modelo celular pró-fibrosante.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do óleo essencial de losna em elementos moduladores do fenótipo pró-fibrosante por meio de análises de microscopia, expressão gênica e perfil proteico;
- Investigar a atuação do óleo essencial em elementos moduladores do metabolismo lipídico utilizando-se análises celulares, bioquímicas e de expressão gênica em células LX-2;
- Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico, e elementos das vias de toxicidade e estresse oxidativo do óleo essencial em células LX-2, utilizando análises bioquímica e moleculares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células e tratamentos

Para a avaliação dos efeitos funcionais do óleo essencial de losna (OE) no quadro pró-fibrosante, células da linhagem estrelada hepática LX-2 (XU et al., 2005), foram utilizadas. As células foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 0.1% de antibiótico Anti-anti (*Thermo fisher*), acrescido o

SBF de acordo com a metodologia de cultivo, e mantidas em estufa à 37°C contendo 5% de CO₂. Para os ensaios, quatro grupos celulares foram estabelecidos (Figura 4): 1. CEHq *like*; 2. CEHa; 3. OE 0.3 µg/ µL: em que células ativadas foram incubadas em meio contendo 0.3 µg/ µL de óleo essencial comercial de losna e 4. OE 0.4 µg/ µL: em que células ativadas foram incubadas em meio contendo 0.4 µg/ µL do mesmo óleo essencial comercial de losna, ambas por um intervalo de 24 h de tratamento. As CEHa foram utilizadas como controle para avaliar a atuação do OE na fisiologia celular cultivada sob condição pró-fibrosante. O grupo experimental CEHq *like* foi considerado como grupo controle experimental de condições não patológicas e utilizada para se avaliar os efeitos dos tratamentos celulares na reversão das características pró-fibróticas. O grupo experimental CEHa, foi utilizado como grupo controle dos efeitos do óleo em relação ao próprio fenótipo ativado.

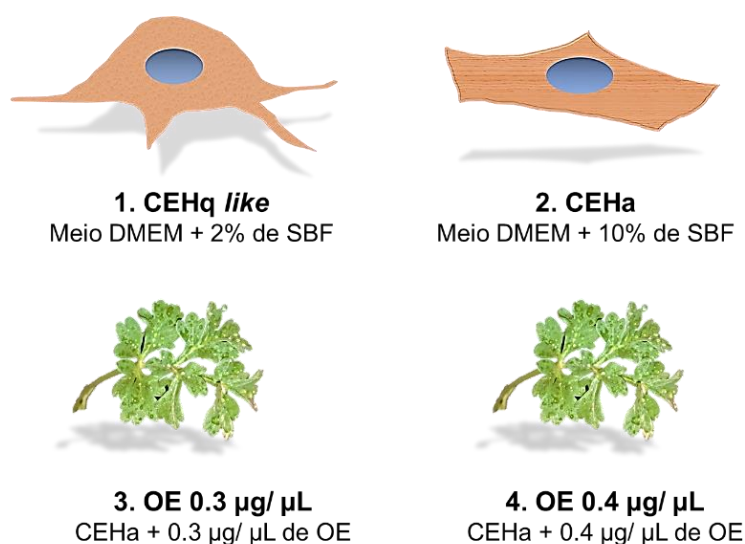


Figura 4 – Grupos experimentais.

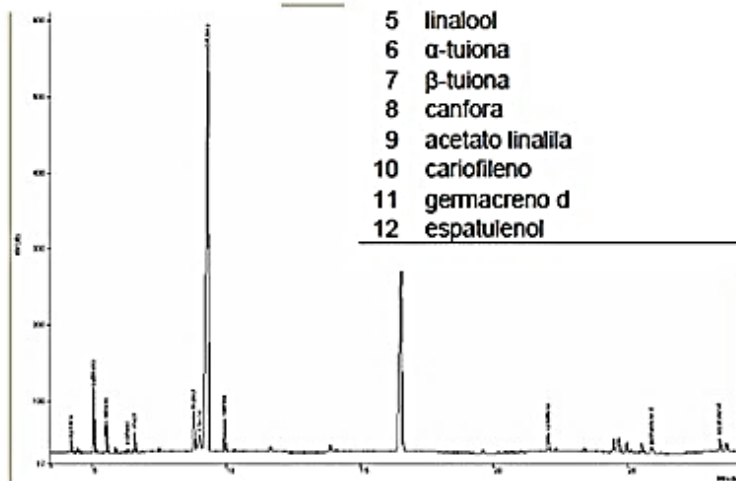
3.2 Óleo essencial de *Artemisia absinthium* (losna)

Para os tratamentos, foi utilizado o óleo essencial de losna adquirido da empresa Laszlo, com certificado de análise química realizado por cromatografia gasosa de alta resolução (Figura 5) detalhando os compostos presentes no produto.

ÓLEO ESSENCIAL DE ABSINTO**Composição Química:**

Nome comercial: óleo de absinto
 Nomenclatura botânica: artemisia absinthium
 Extração: destilação por arraste a vapor
 Método de cultivo: convencional
 Parte da planta: folhas
 Origem: EUA

P	Constituinte ID	%
1	α -pineno	0,5
2	sabineno	2,5
3	mirreno	1,4
4	cineol	1,4
5	linalool	2,6
6	α -tujona	2,6
7	β -tujona	51,1
8	cânfora	1,9
9	acetato linalila	24,3
10	cariofileno	1,5
11	gemacreno d	0,7
12	espatulenol	1,4



Vany Ferraz
 Dra. Vany Ferraz
 Laboratório de Cromatografia
 Departamento de Química – UFMG
 vanyferraz@ufmg.br
 Belo Horizonte, 10/05/2011

Método de análise:
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
 Coluna: BP1 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 60°C (1min), 3°C/min, até 250°C. Injetor: 250°C
 Split: 1/50. Detetor FID: 250°C. Volume de injeção: 1 ul (conc 1.0 % em clorofórmio)

Figura 5 – Certificado de análise química do óleo essencial de losna comercial (Laszlo).

Foi disponibilizada, ainda pela empresa, a densidade do óleo essencial, de 921 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para utilização no cultivo das células, o óleo foi diluído em meio DMEM contendo SBF à 37°C.

Tabela 1 – Componentes do OE e suas respectivas concentrações molares, nas concentrações de OE 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ utilizadas no estudo.

COMPONENTES DO OE	CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	
	0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>β-tujona</i>	1,007 mM	1,343 mM
<i>Acetato linalina</i>	0.371 mM	0.495 mM
<i>α-tujona</i>	0.051 mM	0.068 mM
<i>Linalool</i>	0.050 mM	0.067 mM
<i>Sabineno</i>	0.055 mM	0.073 mM
<i>Cânfora</i>	0.037 mM	0.050 mM
<i>Cariofileno</i>	0.022 mM	0.029 mM

<i>Cineol</i>	0.027 mM	0.036 mM
<i>Espatulenol</i>	0.019 mM	0.025 mM
<i>Mirceno</i>	0.031 mM	0.041 mM
<i>Germacreno d</i>	0.010 mM	0.014 mM
<i>α-pineno</i>	0.011 mM	0.015 mM

3.3 Análise de viabilidade celular: os ensaios de Brometo Tiazolil Azul De Tetrazolio (MTT)

Para as análises, utilizamos metodologia adaptada de Mosmann (1983). Para os ensaios foram utilizadas placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionadas 6×10^3 células cultivadas em meio contendo 10% SBF que foram incubadas por um período de 48 h, para aderência e adaptação. Após o intervalo, foi acrescido um meio de cultivo novo nos poços destinados ao controle e diferentes concentrações do OE de losna foram adicionados aos poços, como seguem: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (considerado controle experimental), 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Decorrido intervalo de 24 h de incubação, foi adicionado 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brometo Tiazolil Azul De Tetrazolio (MTT, Merck) em cada poço, o qual foi incubado por um intervalo de 8 h para formação de cristais de formazana, que foram então dissolvidos em DMSO. O resultado foi obtido em leitor de microplacas *EZ Read 400 (Biochrom)* na absorvância de 570 nm. Concentrações do OE de losna que permitiu sobrevivência de 80% das células foram consideradas para as análises futuras.

Das concentrações analisadas, 0.3 e 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ do OE resultaram em uma viabilidade celular, sem demonstrar diferença significativa em relação ao controle. As CEHa incubadas com 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no período de 24 h não apresentaram perturbações celulares morfológicas, diferentemente da concentração 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que induziu alterações celulares diversas, indicativas de estresse celular. Assim, ambas as concentrações foram escolhidas para o desenvolvimento das análises.

3.4 Análise de Azul de Tripano

Protocolo usual de coloração de azul de tripano foi realizado para se validar as análises obtidas nos ensaios de MTT. Para as análises, 2×10^5 células foram

cultivadas em placas de 6 poços. Decorrido o período de adaptação, uma triplicata foi destinada como controle experimental, cultivada com SBF 10%, e outros dois grupos foram incubados com OE nas concentrações 0.3 e 0.4 µg/ µL. Após o intervalo de 24 h de incubação, as células foram coletadas por tripsinização, e a suspensão em 1mL de meio DMEM foi utilizada para a contagem com auxílio de câmara de Neubauer, utilizando-se azul de tripano à 0.4% (Sigma-Aldrich). O número total de células viáveis foi dividido pelo número total de células e multiplicado por 100, obtendo-se a viabilidade definida como 80%.

3.5 Análise Genotóxica: ensaios do cometa alcalino

Para realização desses ensaios 2×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços, sendo utilizadas duplicata biológica (2 poços) e triplicata técnica para cada grupo experimental. O tratamento foi realizado conforme descrito no item 1. Controles de genotoxicidade positivo (meio DMEM contendo SBF à 10% e 40mM de Metil Metano Sulfonato, MMS - Sigma-Aldrich) e negativo (meio DMEM contendo SBF à 10%) foram utilizados. Os diferentes grupos celulares foram incubados por 24 h com os respectivos tratamentos e, para se prosseguir as análises, a viabilidade celular maior que 80% foi assegurada para a realização dos ensaios, pela análise do azul de tripano.

Na sequência, para se avaliar o potencial genotóxico do OE de losna nas concentrações selecionadas, foi utilizada metodologia adaptada de Roberto e colegas (2016). Para tal, as células foram diluídas em agarose de baixo ponto de fusão (1:7), depositada em lâmina coberta com agarose, e recoberta por lamínula. Para cada amostra foram produzidas duas lâminas, em um total de 6 lâminas por grupo experimental. As lâminas foram mantidas 20 min à 4°C para solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas expostas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL da solução de lise estoque - NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e ~ 8 g de NaOH, pH 10.0), na qual foram mantidas imersas por 1 h à 4°C. Após a lise, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH >13.0) à 4°C por 20 min para deslicoidização do DNA, em seguida, as lâminas foram submetidas à eletroforese em 39 V (1,0 V / cm) e 300 mA por 20 min. Após

este processo, as lâminas foram imersas em tampão de neutralização (0.4 M Trizma Hydrochloride, pH 7.5) no período de 15 min, após, foram fixadas em etanol absoluto e armazenadas à 4°C até o momento da análise.

Para evidenciar os nucleóides, as lâminas foram coradas no momento da análise com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada). As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 3 4 (excitação: $\lambda = 420 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$, barreira: $\lambda = 520 \text{ nm}$), em um total de 100 nucleóides por amostra. Os danos no DNA foram estimados a partir da intensidade e momento da cauda do DNA, mensurados com o auxílio do *software Comet Assay IV*.

3.6. Análises de expressão gênica

3.6.1 Extração de RNA total e transcrição reversa para síntese de DNA complementar (cDNA)

Para as análises de expressão gênica, 2×10^5 células LX-2 foram cultivadas em placas de 6 poços e submetidas aos tratamentos, de acordo com o descrito no item 1. Após o período de incubação dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), e lisadas com 500 µL de TRIZOL® (Thermo Fisher Scientific).

Para a obtenção do RNA total, após a lise, as amostras foram transferidas para microtubos de 1.5 mL, aos quais foram acrescentados 100 µL de clorofórmio (Merck), e centrifugados em 12.000g por 15 min à 4°C, resultando em uma mistura trifásica. A fase superior foi transferida para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 250 µL de álcool isopropílico 100%, seguido de incubação por 10 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em 12.000g por 10min à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado em 300 µL de etanol 80%. Os microtubos foram centrifugados em 10.000 g por 8 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado, e após evaporação do etanol, o RNA extraído foi ressuspenso em 22 µL de H₂O livre de RNase.

Para avaliar a concentração e pureza do RNA extraído, as amostras foram quantificadas com auxílio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare),

utilizando-se a razão A260/A280 (260 nm – absorvância de DNA / 280 nm – absorvância de proteína) e A260/A230 (230nm – absorvância de contaminantes como sais, polissacarídeos ou compostos orgânicos como fenol). Para a obtenção de cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de transcrição reversa, o termociclador Mastercycler pro S® (Eppendorf) foi utilizado.

3.6.2 Análise de expressão gênica em reações de PCR quantitativo (qPCR)

Para as análises de expressão gênica reações de qPCR, foi utilizado o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems® - ThermoFisher Scientific), e as amostras foram analisadas no termociclador A&B – StepOnePlus™ através da quantificação relativa da expressão gênica ($\Delta\Delta C_T$). Os ensaios foram realizados em triplicata técnica para todos os genes avaliados, sendo definido o gene β -ACTINA como normalizador. Os resultados foram analisados utilizando a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Os genes foram desenhados com auxílio do programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e verificados em *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As seqüências de oligonucleotídeos utilizados para as análises encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Anti-sense (5'-3')
β -ACTINA	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC
ACLY	CATCCGGAGGTAGATGTGCT	CGGATCTGGGCATAGTTCAT
ACC1	TGTAAGAGCTCATTGGAGGA	GAATCGAGAGTGCTGGTTCAG
ACC2	GCAGCTGATGACCAACTTCA	TCCGGGTAGACTCACGAGAT
AHR	ATTGTGCCGAGTCCCATATC	CCAAGTCCATCGGTTGTTTT
AKT1	CGGGCACATTAAGATCACAG	TCATTGTCCTCCAGCACCTC
α -SMA	AATCCTGACCCTGAAGTACC	TAGAAAGAGTGGTGCCAGAT

<i>CAT</i>	CGTGCTGAATGAGGAACAGA	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG
<i>COL1α1</i>	ATGACGTGATCTGTGACGAG	AAATTCCTCCGGTTG ATTTC
<i>COX-2</i>	CAGCACTTCACGCATCAG	CTAGCCAGAGTTTCACCG
<i>CPT1a</i>	GCTCATGGTGAACAGCAACT	TAAAGCAGGATGGCATGGAT
<i>CPT1b</i>	CGGGAGGGACGGACTGAGT	AGCTGTAGGCCTTGGGAAC
<i>CPT2</i>	CCAGCCAGCTACCACTGACT	TTAGCAGCTGTGATGCCAGT
<i>CTGF</i>	GCTGACCTGGAAGAGAACAT	ACAGCGATTCAAAGATGTCA
<i>DGAT1</i>	GCCTTCTTCCACGAGTACCT	AGTGGGATCTGAGCCATCA
<i>DGAT2</i>	TGAGTCTCTGAGCTCCATGC	AACCAGGTCAGCTCCATGAC
<i>DESM</i>	ATGACGTGATCTGTGACGAG	AAATTCCTCCGGTTGATTTTC
<i>ECAD</i>	GATCACAGTCACTGACACCA	GTGACGAATGTGGTACCTTT
<i>FASN</i>	TCCTGCTGACCAAGAAGTCC	TCCTGCTGACCAAGAAGTCC
<i>FOXO1</i>	GCCTGACCCAAGTGAAGAC	GCCCATTCTGCCATAGCC
<i>GPx</i>	TTGACATCGAGCCTGACATC	ACTGGGATCAACAGGACCAG
<i>GSR</i>	ATCCATATGCAGGGACTTGG	GTAGGGTGAATGGCGACTGT
<i>MLYCD</i>	GACATCTCCAGCAACATCCA	CTGGGTCAAGCTGATGGAAT
<i>NFKB</i>	TTGAAACACTGGAAGCACGA	TTGCAAATAGGCAAGGTCAG
<i>NRF2</i>	ATTGAGCAAGTTTGGGAGGA	GTTTGGCTTCTGGACTTGGA
<i>OCLN</i>	AAAGAACTCTCCCGTTTGGGA	GCAGATCCCTTCACTTGCTT
<i>PDGFB</i>	CCCAGGAATTACTCGGTCAA	ACAGCCACAATTTCTCCAC
<i>PDRG1</i>	CACCCTGAGACAAAGGAAATG	GGCGGTTGACCTTCACTTTA
<i>PPARα</i>	GGCCTCAGGCTATCATTACG	ACCAGCTTGAGTCGAATCGT
<i>PPARγ</i>	GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC	AACTCAAACCTGGGCTCCATAAAG
<i>SNAIL1</i>	CCTCCCTGTCAGATGAGGAC	GCCTCCAAGGAAGAGACTGA
<i>SLUG</i>	TCTTGACCAGGAAGGAGCTT	TGTTCAACCACGAACGACCGA
<i>SOD1</i>	AGGGCATCATCAATTTGAG	GTGAGGACCTGCACTGGTAC
<i>SREBP1c</i>	AATCCGCCGCGCCTTGACAG	AAGTGCAATCCATGGCTCC
<i>TGFβ-1</i>	GACTCGCCAGAGTGGTTATC	GGAGCTGAAGCAATAGTTGG
<i>TGFβ-2</i>	GCACCTCCACATATAACAGT	GGCAATAACATTAGCAGGAG
<i>TWIST</i>	ACTCCAAGATGGCAAGCTG	TAGTGGGACGCGGACATCG
<i>ZEB1</i>	TGCACTGAGTGTGGAAAAGC	AAGCGTTTCTTGCAGTTTGG

ZEB2

AATGGACTGCAAGGCTGAAG

CGACAGGCGGAATATTAGGA

3.7. Microscopia de fluorescência

3.7.1 Distribuição dos filamentos de actina F

Para as análises foram utilizadas placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, nas quais foram cultivadas 3.5×10^4 células, submetidas aos tratamentos como descrito no item 1 da presente metodologia. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas em solução contendo paraformaldeído (1.4%), Triton X-100 (0.05%) e PBS por 5 min. O núcleo celular foi evidenciado utilizando-se 3.33 ng/ mL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI, Sigma-Aldrich) por 4 min, e os filamentos de actina F foram marcados com faloidina-TRICT a 100 µg/ mL por 2 h. Após sucessivas lavagens em solução salina (PBS), as lamínulas foram então montadas sobre lâmina, e analisadas com o microscópio B X 51 Olympus e sistema fotográfico digital DP71 com os filtros correspondentes.

3.7.2 Rastreamento da oxidação de ácidos graxos

Para as análises de oxidação dos ácidos graxos foi utilizada a metodologia adaptada de *pulse-chase* (RAMBOLD; COHEN; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2015), que consiste em rastrear o BODIPY™ 558/568 C12, molécula análoga a um ácido graxo saturado com cadeia de 12 carbonos conjugada a um fluoróforo, para compreender a absorção, esterificação e oxidação de ácidos graxos. Para tal, os experimentos foram realizados após dois tempos distintos de tratamento: 17 h e 24 h.

Para os ensaios, 3.5×10^4 células LX-2 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após o período de adaptação, foram adicionados os tratamentos de acordo com o grupo experimental, descritos anteriormente. Às culturas também foi adicionado o BODIPY™ 558/ 568 C12 (4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid) (*Thermo Fisher Scientific*) na concentração de 1µM.

Decorridas 16 horas de incubação, os meios de cultivo foram trocados por meios de cultura novos com os respectivos tratamentos, e incubados por 1h e 8h sob condições regulares de cultivo. Triplicatas para cada grupo experimental foram fixadas após 1h, e outras triplicatas após 8h de incubação.

Como controle negativo da beta-oxidação, foi utilizado o Etomoxir (2[6(4-chlorophenoxy) hexyl] oxirane-2-carboxylate) (Merck), molécula inibidora da enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1). O Etomoxir foi acrescido 1 h após a troca dos meios de cultura no controle negativo (meio DMEM + SBF 10%), e incubado por 7 h subsequentes e, em seguida, também fixadas.

Para a fixação, foi utilizada uma solução contendo paraformaldeído (1.4%), Triton X-100 (0.05%) e PBS por 5 min, as lâminas foram então lavadas com solução salina (PBS 0.5x), coradas por 20 min com 0.5 µg/ mL de BODIPY™ 493/ 503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (*Thermo Fisher Scientific*), um fluoróforo de 18 carbonos que se incorpora a lipídeos neutros para evidenciar as gotículas lipídicas, e contra-coradas com 3.33 ng/ mL de DAPI para evidenciar o núcleo.

As lamínulas foram montadas sobre lâminas contendo N-propilgalato, e analisadas logo em seguida com o microscópio de fluorescência BX51 Olympus. Foram obtidas imagens utilizando o sistema fotográfico digital DP71 e filtros correspondentes, e posteriormente quantificadas utilizando o programa Image J (NIH) e o plug-in "JACoP", a fim de obter o coeficiente de Manders, que representa a sobreposição de sinais de fluorescência do canal vermelho (Bodipy C12) aos sinais de fluorescência do canal verde (Bodipy 493/ 503). Um aumento no coeficiente de Manders, ao longo do tempo, demonstra a capacidade da célula de metabolizar o C12 incorporado e acumulá-lo na forma de gotículas de lipídeos, e a redução indica a ocorrência de oxidação lipídica.

3.8 Análises Bioquímicas

3.8.1 Mensuração de triglicerídeos totais

Para analisar os níveis de triglicerídeos intracelulares, 2×10^5 células foram adicionadas em cada poço de placas de 6 poços, em triplicatas biológicas e técnicas

para cada grupo experimental. Após o cultivo e incubação de acordo com o descrito no item 1, as células foram coletadas, lavadas em PBS-EDTA (PBS contendo 0.5mM de EDTA) e centrifugadas a 3000 rpm por 4 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspendido em 100 µL de PBS-EDTA, utilizado para o ensaio. A mensuração foi realizada com o reagente comercial Triglicérides Liquiform (LabTest), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada no espectrofotômetro Thermo Biomate 3 UV-Vis (Thermo Fischer Scientific), em absorbância de 505 nm.

3.8.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio

Para a mensuração da espécie reativa de oxigênio superóxido, 2×10^5 células LX-2 foram adicionadas a poços de placas de 6 poços. Após o cultivo e tratamento, como descrito anteriormente, as células foram coletadas por tripsinização, e após contagem foram distribuídas em placa de 96 poços preta com fundo transparente e plano, na proporção de 4.5×10^4 células por poço.

O ensaio foi realizado com o kit comercial *ROS Detection Cell-Based Assay Kit* (DHE) (Cayman Chemical), seguindo as recomendações do fabricante. O kit utiliza a sonda fluorescente Diidroetídio (DHE) para a detecção da geração de superóxido. Foi utilizado como controle positivo a Antimicina A, um inibidor do complexo III da cadeia transportadora de elétrons, e para o controle negativo o antioxidante N-acetilcisteína. O resultado foi obtido através da leitura da placa no EZ READ 400 (Biochrom), com excitação de 515nm e emissão de 605nm.

3.9 Western blot

As análises de *Western Blot* foram realizadas seguindo o protocolo descrito em Da Silva e colegas (2016). Para os ensaios, extratos celulares totais dos grupos celulares investigados foram submetidos à sonicação em tampão de lise (Triton X-100 0.5%, Tris HCl pH 7,2 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 1mM) acrescentada de 1 mM de inibidor de protease para cada extrato celular, utilizando o sonicador *Fisher Scientific, Sonic Dismembrator*, model 500) em 40% de amplitude por 20 segundos. Posteriormente as amostras foram

centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos sob refrigeração de 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e as proteínas quantificadas em espectrofotômetro (595 nm), seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976), e em seguida acrescido 4% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol.

As amostras foram desnaturadas à 95°C por 5 minutos, das quais 90 μ g de proteína foram utilizadas na eletroforese em géis de poliacrilamida 10% para separação das amostras, sob 300 V e 50 mA, durante aproximadamente 1 h e 30 minutos. Em seguida, as proteínas contidas nos géis foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) com o uso de solução de transferência (25 mM Tris-HCl, 0.192 M de glicina, 10% metanol) por 20 minutos a uma corrente elétrica fixa de 18V, 300 mA, pelo aparelho transferidor do tipo *Semi-Dry*. Após o término da transferência, as membranas foram bloqueadas em Bloto (5% de leite em pó desnatado contendo TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6)), lavadas em TBS-T (1M Tris-HCl pH 7.6, 5 M NaCl, 1% Twew 20) e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários FOXO1 (*FineTest*) diluído em TBS 1:300 ou β -actina (*Cell Signaling*) diluído em TBS na concentração 1:350, e mantidas à 4°C por um período de 24 h sob agitação.

Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário policlonal anti IgG de Coelho conjugado a peroxidase (*Cayman*) diluído com TBS na razão 1:6000, por 2 horas, sob agitação. Após, as membranas foram submetidas a sucessivas lavagens e, em seguida, reveladas. A detecção de sinais foi realizada com o kit de reação quimioluminescente (*ECL – GE Healthcare Life Sciences*), de acordo com as especificações do fornecedor, e exposto em filme de raio-X. Para a quantificação relativa dos níveis de proteína, foi utilizado o *software* Image J (NIH).

3.10 Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 8.0, utilizando análises de One Way ANOVA e testes post-hoc de Tukey, para avaliar a diferença estatística entre as médias dos tratamentos. Os dados são expressos em média e desvio padrão, com valor de $p < 0.05$ determinado para significância estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela clareza das vias induzidas pelo OE na concentração 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, as quais exibiram poucas alterações na concentração 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em relação às CEHa, apresentamos apenas os resultados referentes aos efeitos do OE na concentração 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.1 Óleo essencial de losna 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

4.1.1. Análise de marcadores pró-fibrogênicos

Para avaliar os efeitos do OE na modulação pró-fibrogênica celular, análises da morfologia celular foram realizadas. Na Figura 6.A são apresentados os resultados referentes à organização do citoesqueleto de actina F frente as diferentes condições de cultivo, em análises de microscopia de fluorescência.

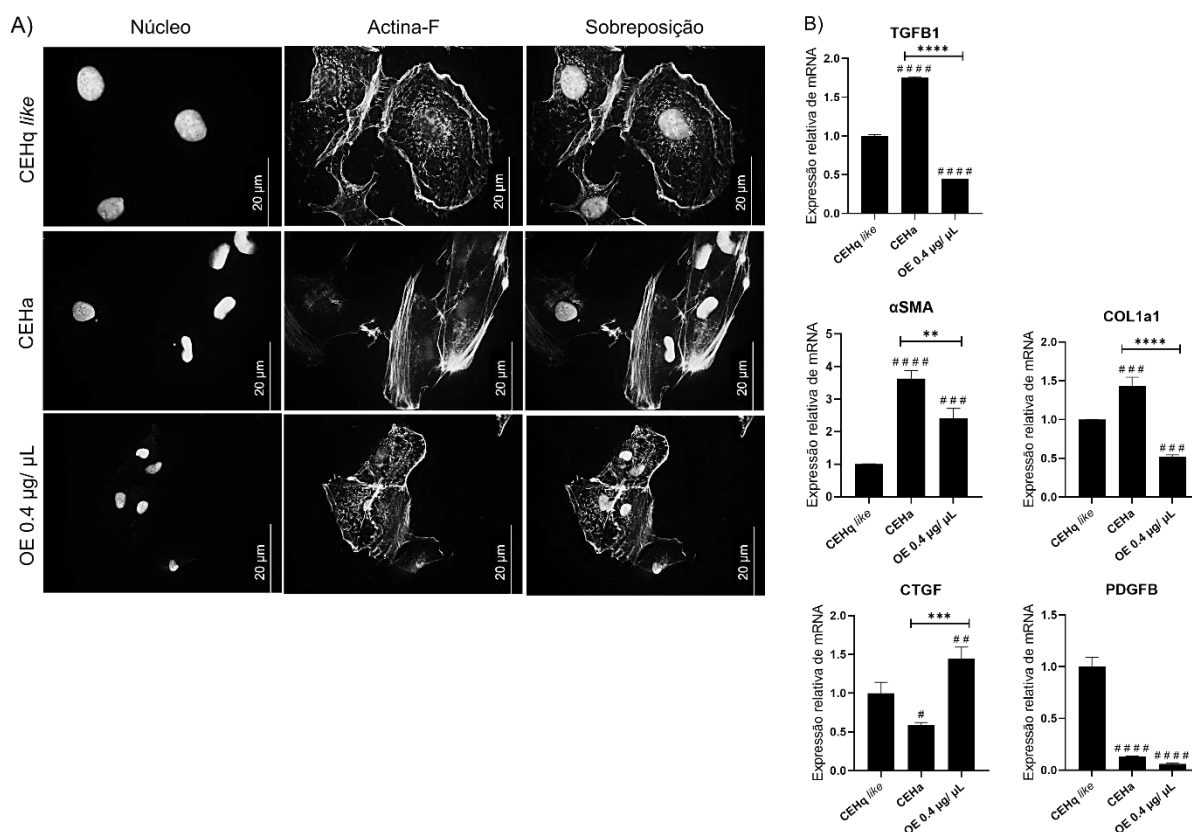


Figura 6 – Efeitos do OE em marcadores pró-fibrogênicos. A) Imagens de microscopia de fluorescência evidenciando os filamentos de actina F; B) Painel geral dos transcritos gênicos envolvidos em processos pró-fibrogênicos, em análises de qPCR. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq like (* e # $p < 0.05$, ** e ## $p < 0.01$, *** e ### $p < 0.001$, **** e ##### $p < 0.0001$).

A imagens revelam alterações no padrão de polimerização dos filamentos de actina nas células tratadas com OE a 0.4 ug/ uL (redução no comprimento e despolimerização das fibras), além de redução no tamanho celular e nuclear. A análise molecular de elementos pró-fibróticos (Figura 6.B) exibiu redução significativa na expressão de TGF β -1 ~74%, colágeno 1 α 1 (COL1 α 1) em ~63% (p<0.0001) e α SMA ~33% (p<0.01), em relação à CEHa. Comparando-se os resultados ao observado nas CEHq *like*, o tratamento com OE apresentou menor expressão de TGF β -1 (p<0.0001), COL1 α 1 (p<0.001) e maior expressão de α SMA. Foi observado ainda, após o tratamento com OE, aumento na expressão da citocina CTGF ~145% em relação à CEHa (p<0.001) e à CEHq (p<0.01).

Em um estudo no qual células LX-2 ativadas foram incubadas com ovos de *Schistosoma mansoni*, foi observado redução na organização de fibras de estresse junto à expressão reduzida de α -SMA e COL1 α 1 (ANTHONY et al., 2010), como observado nas CEHa após o tratamento com OE nesta concentração, verificando-se uma relação entre a organização de actina F em fibras de estresse e a expressão de marcadores pró-fibrogênicos.

Importantes proteínas que atuam nas alterações do citoesqueleto e da MEC, α -SMA e COL1 α 1, têm sua expressão induzida por citocinas pró-fibrogênicas, dentre as quais TGF β -1 (FABREGAT; CABALLERO-DIAZ, 2018). Esta citocina pode ainda induzir a transcrição de CTGF (DEWIAR et al., 2019), citocina pró-fibrogênica que participa da sinalização de vias de migração, proliferação e sobrevivência celular (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Os resultados apresentados sugerem que a citocina TGF β -1 induziu as alterações observadas em seus genes alvo α -SMA e COL1 α 1 e na organização das fibras de actina F após o tratamento com OE, porém não se correlacionou com a expressão do gene CTGF, verificada aumentada.

4.1.2 Análise do metabolismo lipídico

Considerando-se o processo de ativação celular, as CEHs se utilizam do metabolismo lipídico para suprir os processos biossintéticos. Para se avaliar os

efeitos do OE sobre o metabolismo lipídico em CEHa foram realizadas análises celulares, bioquímicas e moleculares.

Inicialmente, os níveis de TG intracelular foram avaliados. Os resultados apresentam alterações significativas nos níveis do metabólito após o tratamento com OE, quando em comparação com as CEHq (Figura 7). Para investigar possíveis alterações nas vias moleculares foram analisadas a expressão gênica de fatores de transcrição e enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios (Figuras 7.B, 7.C e 7.A). Comparando-se à CEHa, o OE induziu redução significativa na expressão da enzima APT citrato liase (ACLY) em ~46% ($p < 0.0001$) e aumento de acetil-CoA carboxilase 2 ~899% (ACC2), malonil-CoA descarboxilase – MLYCD ~485% e ácido graxo sintetase FASN ~82% ($p < 0.0001$).

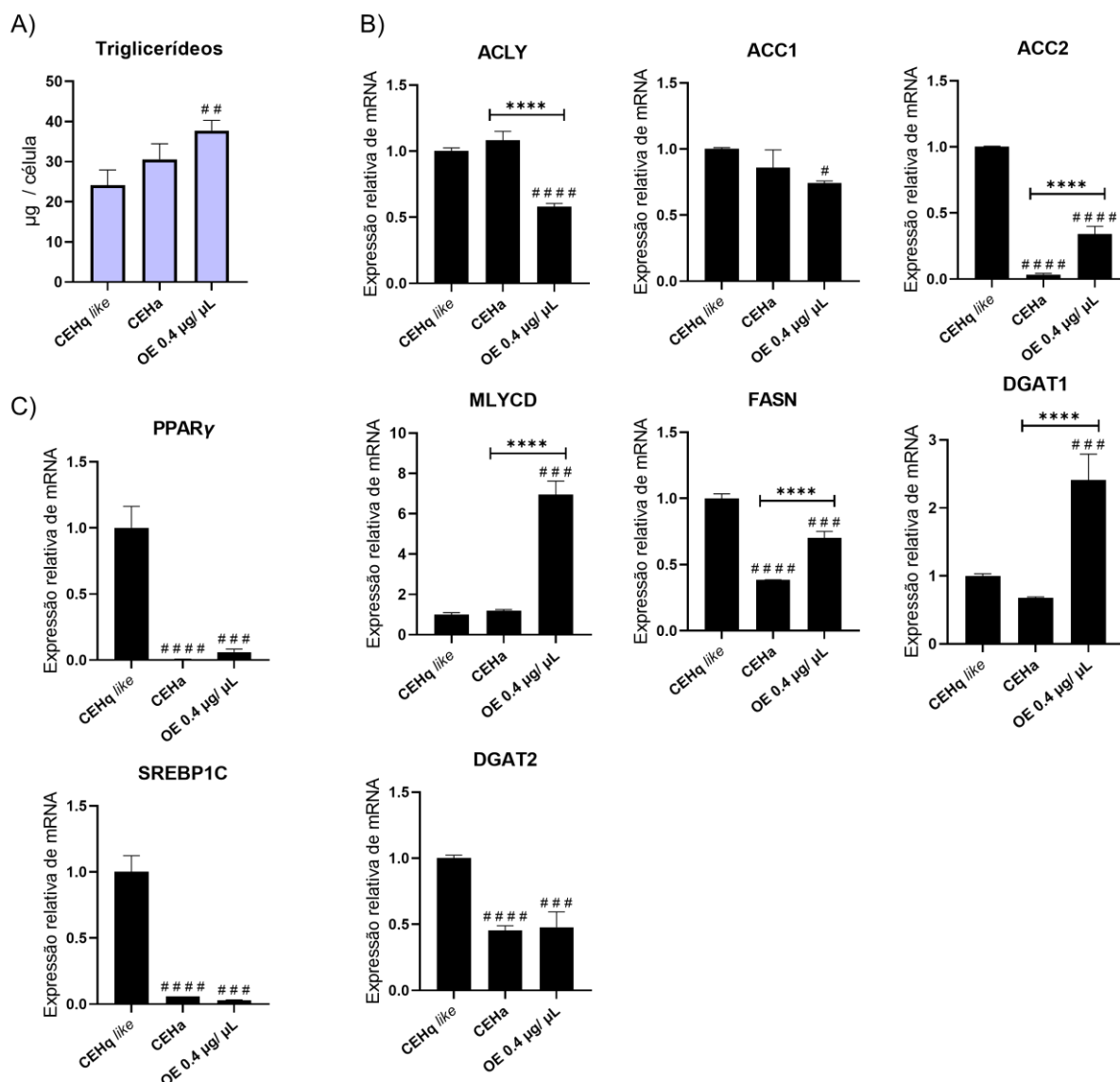


Figura 7 – Efeitos do OE no metabolismo lipídico. A) Quantificação bioquímica dos níveis de triglicerídeos intracelular; B) Painel geral dos transcritos gênicos envolvidos na síntese, armazenamento de ácidos graxos; C) e fatores adipogênicos, em análises de qPCR; As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq *like* (* e # $p < 0.05$, ** e ## $p < 0.01$, *** e ### $p < 0.001$, **** e #### $p < 0.0001$).

A enzima ACLY converte o citrato provindo do metabolismo da glicose em oxaloacetato e acetil-CoA, este último é direcionado para a síntese de ácidos graxos, processo realizado pela FASN, que catalisa sucessivas reações de condensação para formar ácidos graxos a partir dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (CURRIE et al., 2013).

A isoforma ACC2 é uma enzima-chave na síntese de lipídeos e β -oxidação. Essa enzima catalisa a carboxilação acetil-CoA em malonil-CoA, que inibe alostericamente a enzima CPT1, limitando a velocidade na síntese de ácidos graxos. De forma contrária, a enzima MLYCD reverte malonil-CoA à acetil-CoA, liberando a entrada de AG na mitocôndria (CURRIE et al., 2013). Após o tratamento com OE 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, podemos inferir a presença da biossíntese de lipídeos em relação às CEHa.

Os ácidos graxos produzidos de forma endógena e provindos de fontes exógenas são armazenados em TG através da esterificação. A enzima responsável por este processo é a diacilglicerol transferase – DGAT, cujos níveis da isoforma 1 (DGAT1) se elevaram em ~255% após o tratamento com OE ($p < 0.0001$), em comparação com as CEHa e ~141% em relação à CEHq. Em altas concentrações de substrato, a isoforma 1 (DGAT1) esterifica preferencialmente AG exógenos, e demonstra assim função protetora contra lipotoxicidade (CHITRAJU; WALTHER; ROBERT, 2019).

A Figura 7.C apresenta os resultados da expressão dos fatores de transcrição adipogênicos, relacionados de forma direta com a transdiferenciação das CEHs. Após a ativação dessas células, há uma redução expressiva da transcrição dos genes adipogênicos *PPAR γ* e *SREBP1c* em referência à CEHq *like*, que não sofreu alteração após o tratamento com OE. O receptor *PPAR γ* possui um relevante papel na manutenção e restabelecimento do fenótipo quiescente, demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KISSELEVA; BRENNER, 2021). A expressão ectópica desses dois receptores nucleares pode reverter a ativação das CEHa (DELGADO et al.,

2021). Estes resultados demonstram que, apesar da redução de elementos pró-fibrogênicos após o tratamento com o OE de losna, os genes adipogênicos não sofreram alteração em relação às CEHa.

Prosseguindo com a investigação do metabolismo lipídico, ensaios correlatos à mensuração da oxidação de ácidos graxos e expressão gênica de proteínas envolvidas no processo foram realizados (Figura 8).

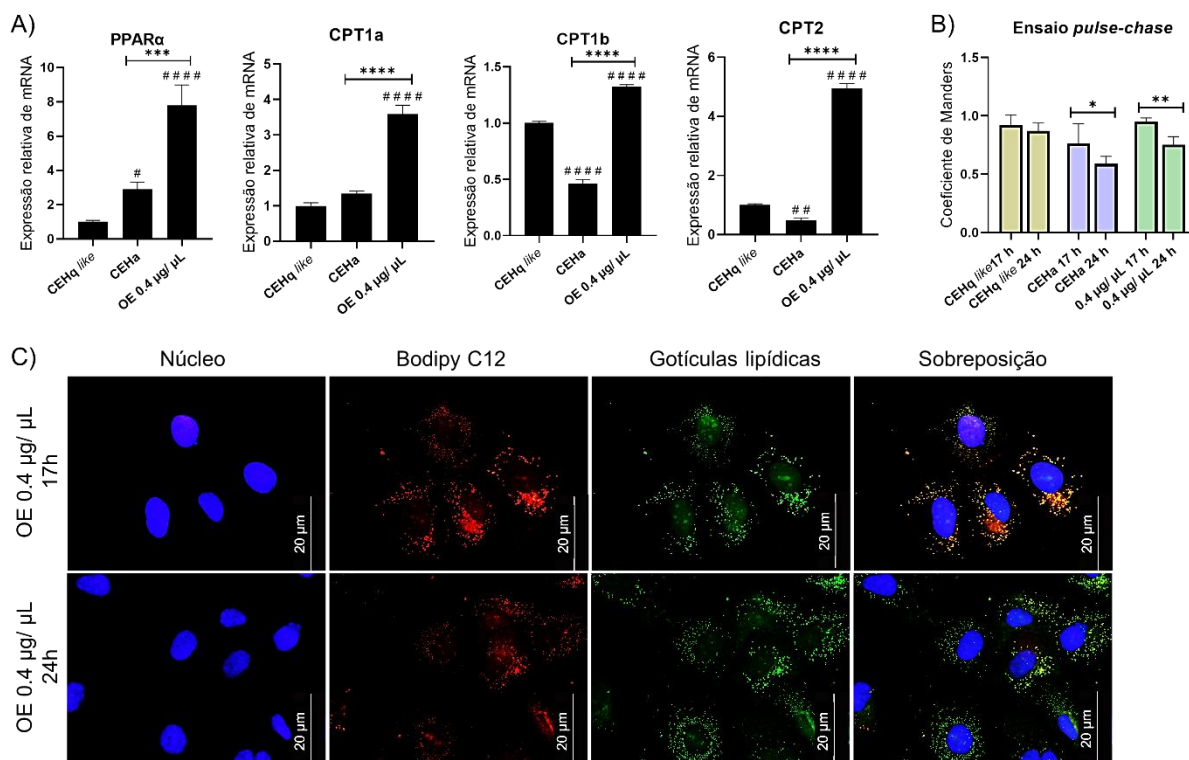


Figura 8 – Efeitos do OE na oxidação lipídica. A) Painel geral dos transcritos gênicos envolvidos na oxidação mitocondrial de ácidos graxos em análises de qPCR; B) Quantificação da sobreposição de ácidos graxos às gotículas lipídicas de armazenamento a partir do Coeficiente de Manders, nos tempos de 17 h e 24 h após os tratamentos. C) Imagens da microscopia de fluorescência do ensaio de *pulse-chase* do grupo experimental OE 0.4 µg/ µL após 17 h e 24 h de tratamento. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq like (* e # p<0.05, ** e ### p< 0.01, *** e #### p<0.001, **** e ##### p<0.0001).

A Figura 8.A apresenta níveis transcricionais de importantes genes correlatos a oxidação lipídica. O tratamento com o OE induziu aumento na expressão do PPARα ~169 % (p<0.0001) e das enzimas carnitina palmitoiltransferase 1a (CPT1a) ~167 %, CPT2 ~926 % (p<0.0001) e CPT1b ~185 % (p<0.001), em relação à CEHa e aumento significativo de PPARα, CPT1a e CPT2 comparado aos valores observados nas CEHq like. A resposta celular foi avaliada pelo rastreamento de ácidos

graxos (Figura 8.B e 8.C), ensaio o qual foi evidenciado aumento significativo na oxidação de ácidos graxos, representado pela redução no coeficiente de Manders após 24h, que indica redução na sobreposição dos ácidos graxos às gotículas de lipídios armazenados.

O fator de transcrição PPAR α é um sensor nutricional que permite a adaptação das taxas de transporte, catabolismo de ácidos graxos e lipogênese, regulando a transcrição de genes envolvidos na β -oxidação e transporte de AG (PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2015). Os ácidos graxos de cadeia longa, maior fração de AGs entregue aos tecidos, são transportados pelo sistema carnitina palmitoil transferase até a matriz mitocondrial, onde são oxidados. Esse sistema é composto pela enzima CPT2, presente na membrana interna da mitocôndria, e CPT1 na membrana externa, a qual possui três isoformas – CPT1a abundante no fígado, CPT1b no tecido muscular e CPT1c no cérebro (BONNEFONT et al., 2004). O aumento na expressão de PPAR α após o tratamento com OE possivelmente induziu a expressão das enzimas ligadas à β -oxidação CPT1a, CPT1b e CPT2, com resposta celular observada por aumento na oxidação de ácidos graxos.

As adaptações induzidas no metabolismo de lipídios após o tratamento com OE, foram observadas de forma semelhante por Hetherington e colaboradores (2016) na análise de lipotoxicidade em CEHs primárias humanas, após exposição à altas concentrações de palmitato e/ou oleato. Os autores identificaram aumento na β -oxidação, síntese de triglicérides e armazenamento de ácidos graxos concomitante a perda de viabilidade celular após 48 h, alterações estas observadas ainda em análises de lipotoxicidade em hepatócitos (HETHERINGTON et al., 2016; GENG et al., 2021).

No metabolismo lipídico, observamos que o tratamento com OE elevou a oxidação de lipídios, ao mesmo tempo em que induziu as vias de síntese e armazenamento de lipídeos e reduziu a expressão de ACLY, demonstrando um possível mecanismo adaptativo com vistas a economia energética. Deste modo, sugerimos que o OE nessa concentração inicia um processo de perturbação da homeostase celular. Para avaliar a toxicidade preditiva do OE, prosseguimos com as análises investigando elementos correlatos às vias de toxicidade.

4.1.3 Análise dos elementos correlatos às vias de toxicidade e estresse oxidativo

Quando em excesso na disponibilidade de lipídios, as adaptações no metabolismo são acompanhadas do aumento na produção de EROs (GENG et al., 2021). Para se avaliar um possível estresse oxidativo gerado após o tratamento das CEHa com OE, realizamos análises da ERO superóxido (Figura 9.A) e danos ao DNA pelo ensaio cometa alcalino, que avalia o potencial genotóxico do OE (Figura 9.B e 9.C).

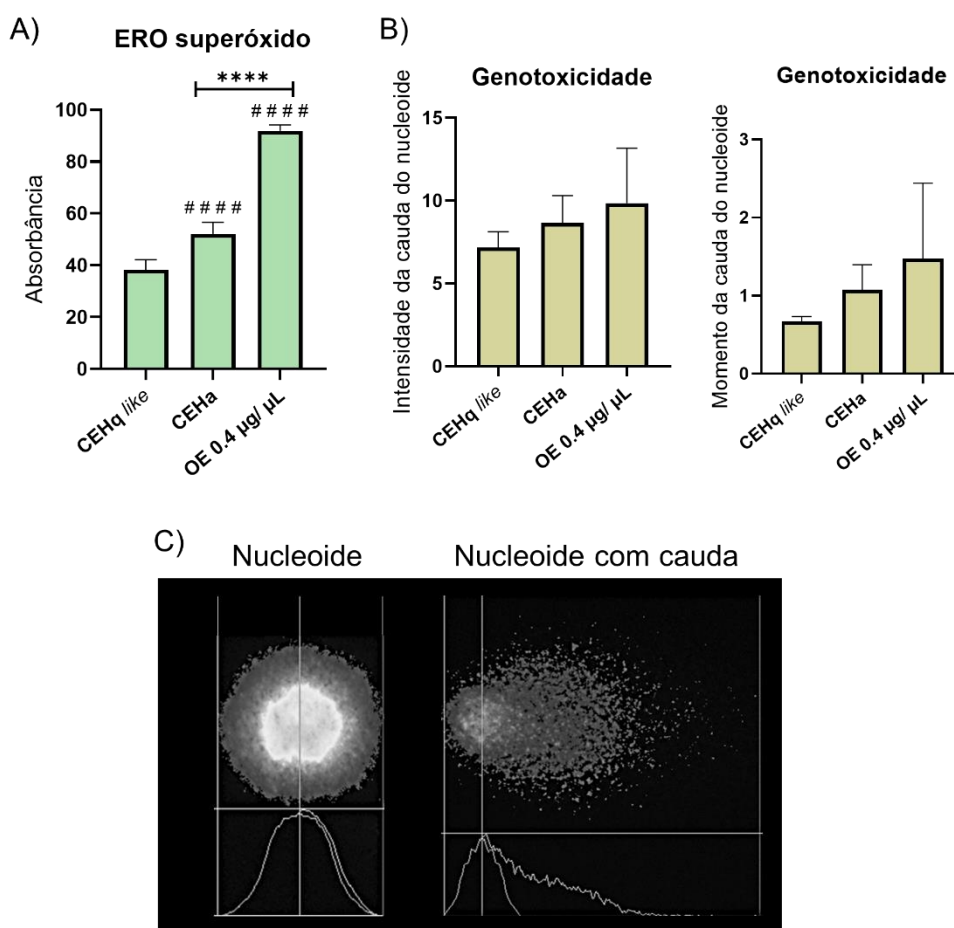


Figura 9 – Efeitos do OE no estresse oxidativo, e potencial. A) Detecção da ERO superóxido por Diidroetídeo; B) Análise pelo ensaio cometa a partir da intensidade e momento da cauda do nucleóide; C) Imagens representativas de nucleóides com e sem a presença de cauda, obtidas pelo *software Comet Assay IV*. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq like (* e # p<0.05, ** e ## p< 0.01, *** e ### p<0.001, **** e ##### p<0.0001).

Os resultados demonstraram aumento na produção da espécie reativa superóxido após o tratamento com OE em relação às CEHa de ~76% e ~139%

comparando-se às CEHq *like* ($p < 0.0001$). No que diz respeito a análise do cometa alcalino, não foi evidenciado potencial genotóxico do OE nas CEHa.

O excesso de EROs produzido na célula, quando não é suficientemente neutralizado pelas defesas antioxidantes, conduz o aparecimento de estresse oxidativo que induz danos às biomoléculas, e subsequentemente causa danos oxidativos ao DNA (FORMAN; ZHANG, 2021). A análise do cometa alcalino, também conhecida como eletroforese de gel unicelular, é um dos métodos mais sensíveis e disseminado para se avaliar a formação e reparação de danos ao DNA, entre os quais quebras de fitas únicas ou duplas, ligações DNA-DNA e locais alcalinos lábeis (JI et al., 2022). A cauda evidenciada no nucleóide representa a migração de fragmentos de DNA, assim, os “cometas” com caudas longas demonstram a presença de mais lesões no DNA do que aqueles com caudas curtas ou ausência (MOLLER, 2022). Nos ensaios cometa alcalino realizados com o OE, apesar do aumento significativo na produção da ERO superóxido, não evidenciaram danos ao DNA.

Assim, posteriormente foram avaliadas a expressão de importantes enzimas antioxidantes quanto à sua expressão (Figura 10). As células incubadas com OE exibiram aumento na expressão das enzimas SOD1 em ~183%, GPx em ~55% ($p < 0.0001$) e GSR em ~97% ($p < 0.001$); e redução de CAT ~26% ($p < 0.0001$) em relação à CEHa. Foi observada ainda superexpressão de todas as enzimas analisadas em relação à CEHq *like* - SOD1, GPX, GSR ($p < 0.0001$) e CAT ($p < 0.01$).

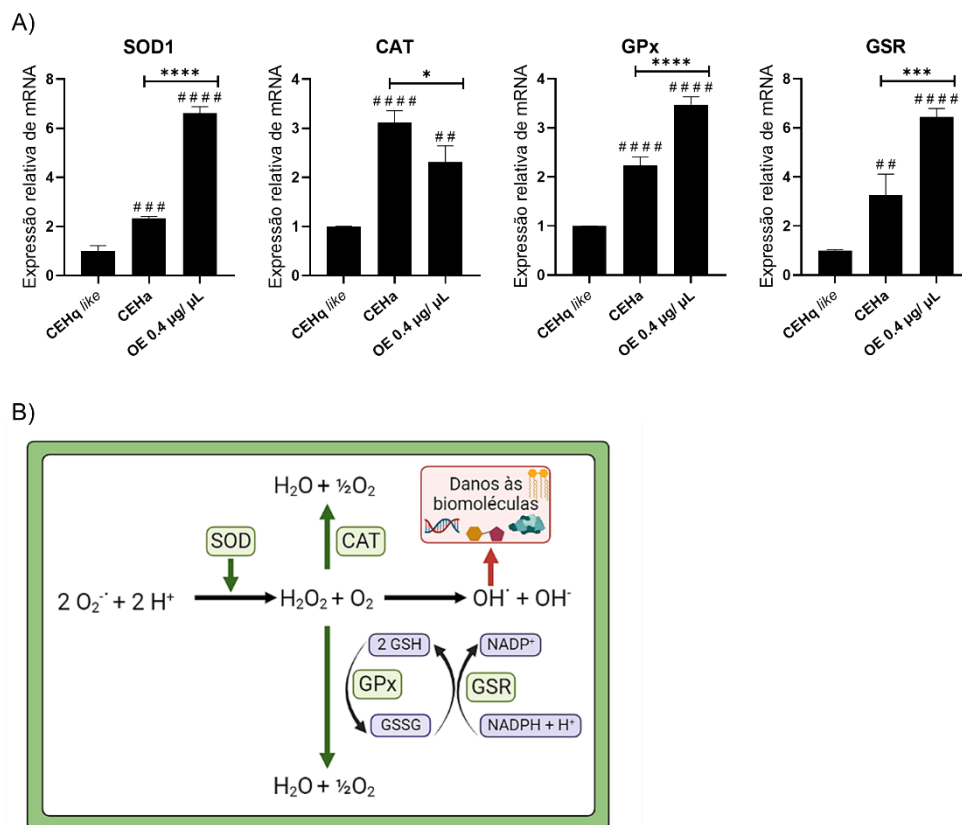


Figura 10 – Efeitos do OE nas defesas antioxidantes. **A)** Painel geral dos transcritos gênicos de enzimas antioxidantes em análises de qPCR; **B)** Esquema representativo da produção de EROs celular, e estratégia antioxidante contra a produção excessiva de EROs. Imagem criada pelo BioRender. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq *like* (* e # $p < 0.05$, ** e ## $p < 0.01$, *** e #### $p < 0.001$, **** e ##### $p < 0.0001$).

O aumento da ERO superóxido induziu maior expressão da enzima SOD1, responsável pela dismutação do superóxido, que gera como subproduto o peróxido de hidrogênio. Esta espécie reativa não radical é neutralizada na célula pelas enzimas CAT e GPx (HE et al., 2017), das quais GPx foi observada superexpressa após o tratamento com OE, bem como a enzima GSR que reduz a glutatona oxidada (Figura 10.B).

A CAT é uma enzima antioxidante peroxissomal (RIVES et al., 2020) que, por sua vez, teve a expressão reduzida após o tratamento com OE, e pode indicar menor demanda para a neutralização de peróxido de hidrogênio por redução na atividade oxidativa peroxissomal, tendo em vista o aumento na expressão de enzimas da via de oxidação lipídica mitocondrial observada nessa concentração. O aumento na expressão das enzimas antioxidantes contribui para a neutralização das

EROs, das quais a superóxido foi observada aumentada nessa concentração, propiciando que não fossem induzidos danos oxidativos significativos ao DNA.

A sinalização de EROs pode ser influenciada pelas atividades de várias enzimas antioxidantes, cuja expressão é regulada por fatores de transcrição, que fazem parte das vias de resposta ao estresse celular e compõem, junto às vias ativadas por ligantes, as vias de toxicidade (SIMMONS; FAN; RAMABHADRAN, 2009). O elemento NRF2 da via de resposta ao estresse e AHR da via ativada por ligante foram investigadas, junto à enzima CYP1a1 (Figura 11).

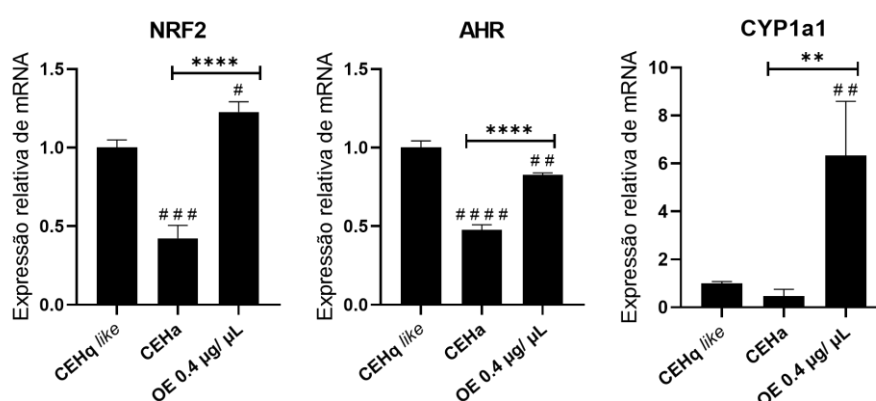


Figura 11 – Efeitos do OE nos elementos correlatos às vias de toxicidade. Painel geral dos transcritos gênicos de elementos correlatos às vias de toxicidade, em análises de qPCR. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq like (* e # $p < 0.05$, ** e ## $p < 0.01$, *** e ### $p < 0.001$, **** e #### $p < 0.0001$).

A ativação dos elementos que contribuem para o restabelecimento da homeostase celular ocorre anteriormente ao início da toxicidade e, propiciam assim, maior sensibilidade e compreensão dos detalhes mecanicistas para avaliar a segurança química de um composto (WINK et al., 2018). Dos elementos analisados, observamos após o tratamento com OE, a indução da expressão do receptor aril-hidrocarboneto (AHR) em ~73%, NRF2 em ~189%, e CYP1a1 em ~1234% ($p < 0.01$) em relação às CEHa. No que diz respeito à CEHq like, o OE conferiu maior expressão de todos os elementos analisados, excetuando-se AHR, observado reduzido ($p < 0.01$).

O fator de transcrição NRF2 é responsável por diversos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, induzindo a expressão de uma diversidade de

genes citoprotetores (ZHOU; ZHENG; CHEN et al., 2022). O excesso da ERO superóxido, induzido após o tratamento com OE de losna, foi suficiente para induzir essa via de estresse. Esse fator de transcrição se liga ao DNA na sequência elementos de resposta antioxidante (*antioxidant response elements – ARE*) e inicia a transcrição de genes antioxidantes e genes enzimáticos de desintoxicação da fase II (ZHOU; ZHENG; CHEN et al., 2022), contribuindo com a homeostase redox celular. Além disso, foi demonstrado que esse gene também participa do metabolismo de xenobióticos através da via NRF2-ARE e a sinalização AHR-XRE (*xenobiotic responsive element – XRE*), em que ambas as vias regulam positivamente uma à outra no nível transcricional (SHAW; CHATTOPADHYAY, 2019). Os resultados apresentados na Figura 11, reforçam a presença da sincronização desses elementos no modelo celular investigado.

Considerando-se o receptor AHR, este atua como um fator de transcrição importante na modulação do metabolismo de xenobióticos, induzindo a transcrição de genes da família P450, em particular CYP1a1, enzima responsável por metabolizar substratos endógenos e exógenos. Por atuar como oxidase, essa enzima produz EROs no processo de metabolização e, assim, pode contribuir para exacerbar o estresse oxidativo (SAHEBNASAGH et al., 2021). A ativação dessas vias demonstra um mecanismo adaptativo frente às alterações celulares, contribuindo com sua sobrevivência.

4.1.4 Fator de transcrição *Forkhead O1 – FOXO1*

A subclasse “O” da família de fatores de transcrição *Forkhead* (FOX) é composta por quatro membros, que inclui FOXO1, FOXO3a, FOXO4 e FOXO6, dos quais FOXO1 é um membro representativo, modulando genes envolvidos na apoptose, autofagia, parada do ciclo celular, reguladores metabólicos e imunológicos, e enzimas antioxidantes (XING et al., 2018). Seu papel biológico é predominantemente responder às condições de estresse de forma a manter a homeostase (EIJKELENBOOM; BURGERING, 2013). Por seu importante papel frente ao estresse celular e controle da homeostase, a análise transcricional e proteica dessa molécula foi realizada. A Figura 12 apresenta os resultados bem como de elementos pró-inflamatórios correlatos (Figura 12).

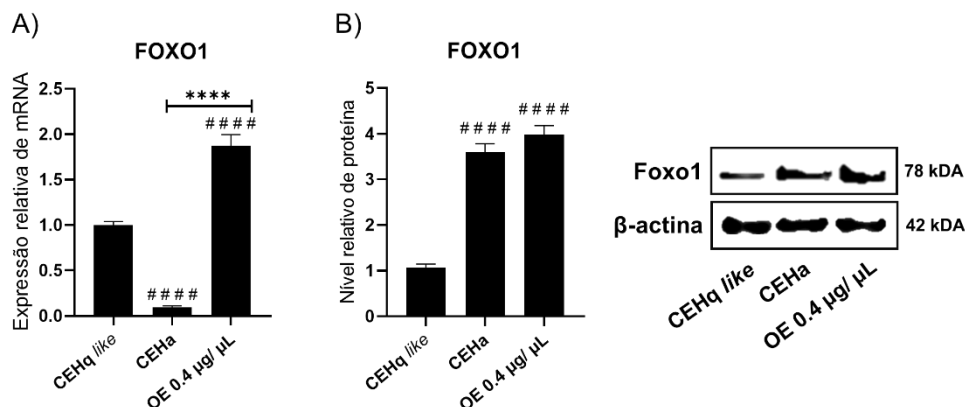


Figura 12 – Efeitos do OE no fator de transcrição FOXO1 e elementos pró-inflamatórios. A) Transcrito gênico de FOXO1 em análise de qPCR; e B) nível proteico de FoxO1 obtido por análise de *Western Blot*. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq *like* (**** e ##### $p < 0.0001$).

Os resultados apresentam que a incubação celular com o OE promoveu aumento na transcrição de FOXO1 em ~1940% em relação às CEHa e ~87% comparando-se às CEHq ($p < 0.0001$). Quanto ao perfil proteico, as células ativadas, incubadas ou não com o OE, apresentaram expressões absolutamente maiores que às CEHq em ~274% ($p < 0.0001$). Por outro lado, os níveis proteicos, entre as células ativadas tratadas ou não com o OE, não apresentaram variações estatísticas entre si.

A ativação de FOXO1 ocorre através de uma rede complexa de elementos da sinalização celular que é modulada em vários níveis que incluem a expressão do gene *FOXO1*, modificações pós-traducionais que determinam sua localização subcelular e estabilidade, e interação com co-reguladores (Figura 13) (XING et al., 2018).

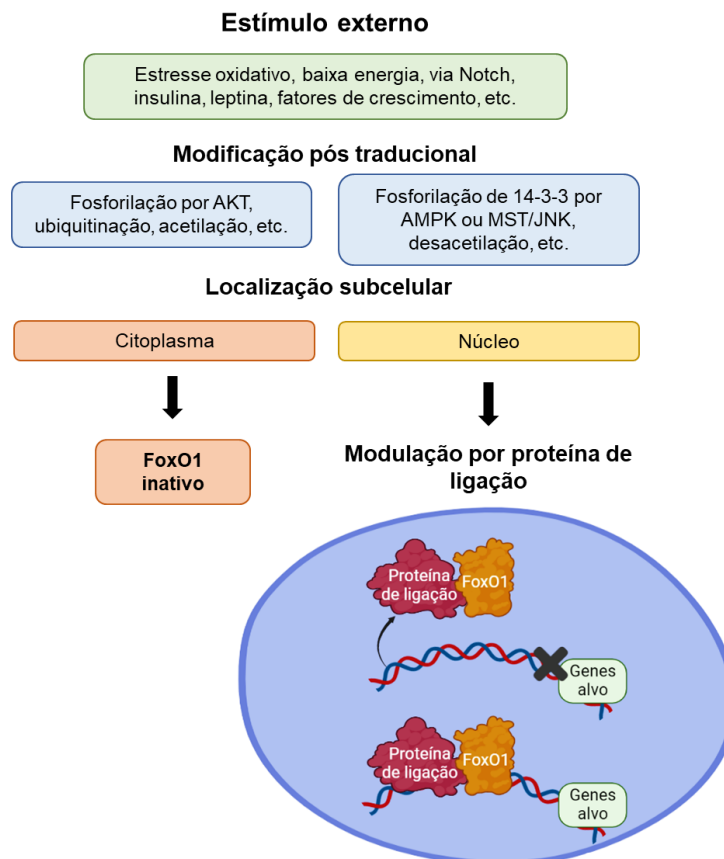


Figura 13 – Mecanismo celular regulatório de FoxO1. Em resposta à estímulos diversos que induzem quebra na homeostase celular, a molécula FoxO1 sofre regulação em diversos níveis. Inicialmente, a molécula pode sofrer modificações pós-traducionais como a fosforilação, ubiquitinação e acetilação, que determinam sua localização subcelular e estabilidade. Quando direcionada ao citoplasma a proteína se torna inativa. No núcleo FoxO1 está em sua forma ativa em que pode se ligar ao DNA e induzir a transcrição de seus genes alvo, processo esse que pode ainda sofrer um ajuste fino pela interação de FoxO1 com proteínas de ligação. Imagem criada pelo BioRender.

Considerando-se os resultados obtidos, observa-se que o tratamento com OE de losna induziu aumento significativo nos níveis transcricionais de FOXO1, quando comparado as células ativadas, porém, sem alterar significativamente os níveis relativos de sua proteína. Essa disparidade entre o perfil de expressão da molécula FOXO1 (RNA e proteína) se respalda no contexto da sinalização celular. Por ser uma molécula que atua em diferentes rotas celulares, entre elas nas rotas correlatas a produção de EROS e do estresse oxidativo, crescimento, migração celular, processo pró-inflamatório e no equilíbrio homeostático, em geral, os níveis da proteína FOXO1 devem ser estritamente controlados, evitando-se a morte celular. Conjuntamente os resultados sugerem, que nas células ativadas, a redução transcricional visa controlar os níveis proteicos, evitando-se uma tradução excessiva da mesma, o que poderia ser deletério às células. Paralelamente, na presença do

OE a 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, onde existe a ativação dos mecanismos de estresse oxidativo, os níveis transcricionais de FOXO1 aumentam ainda mais numa provável tentativa de controlar a sinalização deletéria. Essa modulação na regulação de FOXO1 pode se correlacionar ainda a modificações pós-traducionais, apontadas em Lu et al. (2021).

Na sequência, considerando-se a multifuncionalidade de FOXO1 no equilíbrio celular, genes do processo pró-inflamatório foram avaliados. A Figura 13, apresenta os resultados.

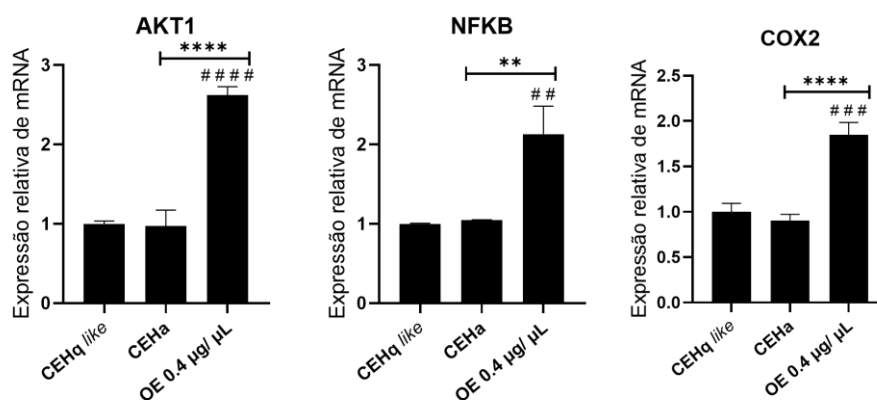


Figura 13 – Efeitos do OE em elementos pró-inflamatórios. A) Painel geral dos transcritos gênicos pró-inflamatórios em análises de qPCR. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq like (* e # $p < 0.05$, ** e ## $p < 0.01$, *** e ### $p < 0.001$, **** e #### $p < 0.0001$).

Após o uso do OE, foram induzidas a expressão da proteína serina/treonina quinase 1 (AKT1) em ~170%, enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) em ~105% ($p < 0.0001$) e NFKB em ~103% ($p < 0.01$) comparando-se às CEHa.

Quando em presença de estresse oxidativo, mecanismos celulares pró-inflamatórios são induzidos, dentre os quais a expressão da enzima AKT1, importante na regulação da proliferação celular, metabolismo, síntese de proteínas, autofagia e sobrevivência (ZHOU et al., 2022). Pelas suas funções frente as alterações celulares, AKT1 é considerada importante enzima citoprotetora contra insultos tóxicos (FABREGAT; CABALLERO; DÍAZ, 2018), e contribui, entre outros, para a regulação da proteína FOXO1. Em CEHs, a ativação de FOXO1 foi observada quando inibida a via PI3K/AKT (DA SILVA; RAMOS; MORAES, 2017).

Frente ao estresse celular, AKT1 induz a ativação de NFKB, promovendo a resposta pró-inflamatória e sobrevivência celular, que podem contribuir para a

progressão da fibrose hepática (HUANG et al., 2016). Ativado frente a alterações celulares, NFKB regula processos inflamatórios através da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (ZINATIZADE et al., 2021), além de induzir a transcrição da enzima COX2. Essa enzima catalisa a oxidação do ácido araquidônico em prostaglandinas, em especial a E2 (PGE2), envolvida em doenças relacionadas à inflamação (TSENG et al., 2019).

4.1.5 Análise de fatores relacionados à EMT

Considerando-se que a presença do OE de losna a 0.4 ug/ mL no meio de cultivo celular e as alterações na homeostase observadas nas análises anteriores elementos correlatos ao processo de transição epitélio mesenquimal (EMT) foram investigados. A ativação da proliferação é uma característica fisiológica das células ativadas; entretanto, quando exacerbada pode se correlacionar ao aparecimento de características tumorais, como a ativação da migração celular. A Figura 14 apresenta os níveis transcricionais de genes relacionados aos processos EMT.

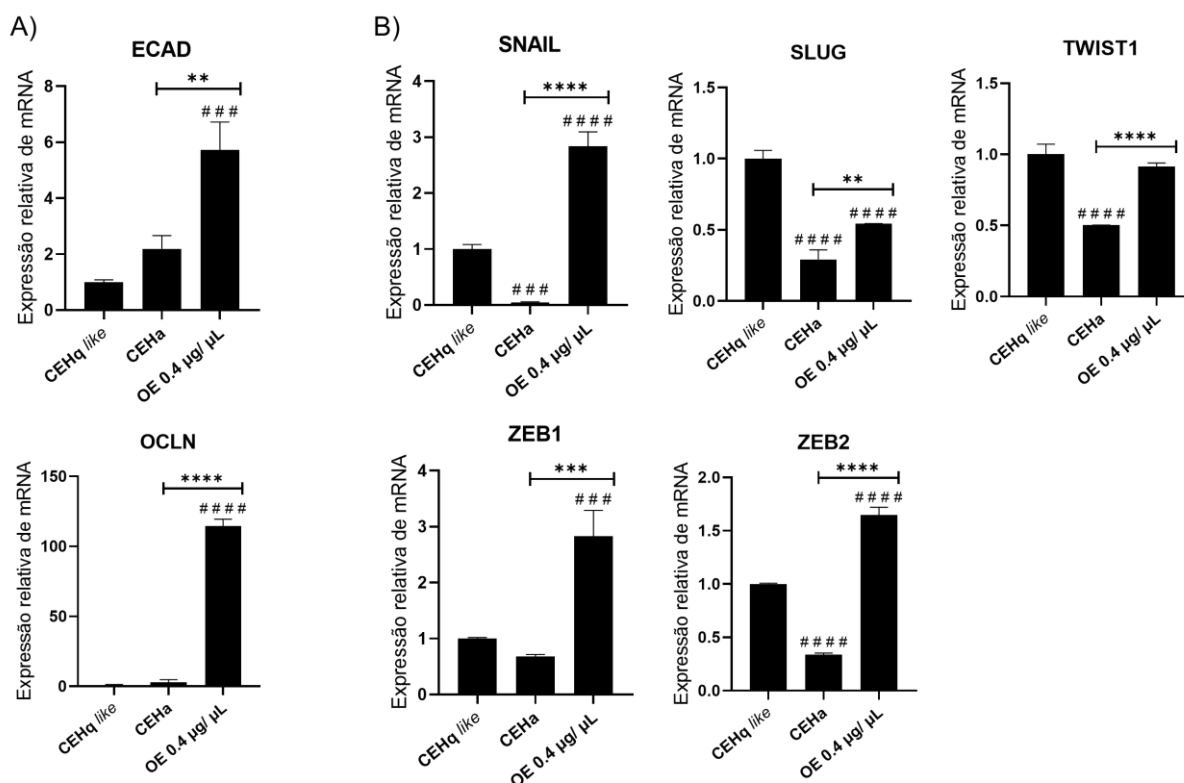


Figura 14 – Efeitos do OE nos elementos correlatos à transição epitélio mesenquimal. A) Painel geral dos transcritos de genes epiteliais; B) e fatores de transcrição relacionados à EMT em análises de qPCR. As diferenças significativamente estatísticas entre as células tratadas com OE e CEHa foram

indicadas por asterisco (*); e cerquilha (#) foi utilizado para indicar diferenças significativas entre as células incubadas com OE e às CEHq *like* (* e # $p < 0.05$, ** e ## $p < 0.01$, *** e ### $p < 0.001$, **** e #### $p < 0.0001$).

Conjuntamente, a análise da expressão dos genes evidencia que a presença do OE ativa marcadores epiteliais e elementos correlatos à EMT, comparando-se às CEHa.

A EMT é um processo biológico induzido por alterações no microambiente da célula, que realizam transição de um estado epitelial para mesenquimal (PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013). Este mecanismo celular engloba uma gama de alterações de expressão gênica, fenotípicas e metabólicas, que são reguladas de forma extensa devido às consequências patológicas de sua desregulação (BRACKEN; GOODALL, 2022).

Os fatores de transcrição EMT, dos quais se destacam *snai1* (SNAIL), *snai2* (SLUG), proteína 1 relacionada à torção (TWIST) e ligantes 1 e 2 do dedo de zinco ao Ebox (ZEB1 e ZEB2), possuem um papel primordial na EMT (YANG et al., 2020). Ambos foram superexpressos após o uso do OE nas CEHs. A ativação desses fatores pode ocorrer através das vias TGF β -1, WNT, NOTCH e fatores de crescimento que atuam por meio de receptores tirosina quinases (MARCONI et al., 2021), ou pelo estresse oxidativo de forma direta ou indireta através de sensores redox (HUANG et al., 2022). Um dos fatores mais relevantes induzidos por este processo é a resistência conferida à senescência e apoptose (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014), e dentre as características celulares induzidas por este programa transcricional estão a remodelação do citoesqueleto com aumento das fibras de estresse, perda da polaridade apical-basal, perda de adesão célula-célula e célula-matriz, motilidade e invasão (YANG et al., 2020).

As análises dos genes epiteliais demonstraram aumento na expressão após a incubação das células com OE, em relação às CEHa. A ocludina (OCLN) é uma proteína associada às junções apertadas, desempenhando um papel na formação e regulação da barreira de permeabilidade paracelular (SUZUKI et al., 2009). A proteína ecaderina (ECAD), por sua vez, é ligada à outras de células vizinhas, bem como conectada a filamentos de actina, fornecendo uma ligação entre a interação célula-célula e a dinâmica do citoesqueleto intracelular (MALAGOBADAN;

NAGOOR, 2017). A indução desses marcadores epiteliais demonstra um possível mecanismo adaptativo à superexpressão observada nos fatores de transcrição EMT, que entre outros, induzem a redução da adesão celular.

4.1.6 Análises conjuntas

As características fenotípicas mesenquimais observadas, como o comprimento celular reduzido, redução nas proteínas do citoesqueleto e fibras de estresse, foram observadas também por Hetherington e colaboradores (2016) após a exposição de CEHs humanas primárias por 48 h à alta concentração de oleato (1.0 mM). Neste estudo houve redução na viabilidade celular, na qual sugeriram que o excesso de gotículas lipídicas interferiu na função do citoesqueleto, induzindo morte celular lipotóxica por anoikis (desprendimento de células). Nas CEHa expostas ao OE, não houve acúmulo de gotículas lipídicas, o que, entre outros fatores, pode ter contribuído para a viabilidade celular após 24 h.

No metabolismo lipídico, observamos indução da oxidação concomitante a maior expressão de genes relacionados à síntese e armazenamento de lipídeos, que contribuíram para a manutenção das gotículas lipídicas, observada nas análises celulares, com vistas a economia energética. O aumento na oxidação eleva a produção de EROs, evidenciada nas células após o uso do OE pelo aumento na produção da ERO superóxido, fator este que contribui para o estresse oxidativo. As alterações metabólicas e do estado redox celular induzem mecanismos adaptativos, visando o restabelecimento da homeostase, dentre os quais verificamos as vias de resposta ao estresse e pró-inflamatórias superexpressas. A ativação dessas vias contribui para induzir a expressão de genes citoprotetores, como as enzimas antioxidantes e de detoxificação, observadas com aumento na expressão após a incubação das células com o OE, que induziu ainda a EMT.

Em conjunto, os resultados indicam que o OE nessa concentração reduziu os elementos pró-fibrogênicos e, ao mesmo tempo, induziu mecanismos adaptativos diversos no metabolismo lipídico, nas vias de resposta ao estresse celular e EMT (Figura15) que, em conjunto, contribuíram para a viabilidade celular observada após 24 h, e representam um mecanismo de toxicidade preditivo, o qual em concentração ou tempo de exposição maiores, podem induzir as CEHs à apoptose.

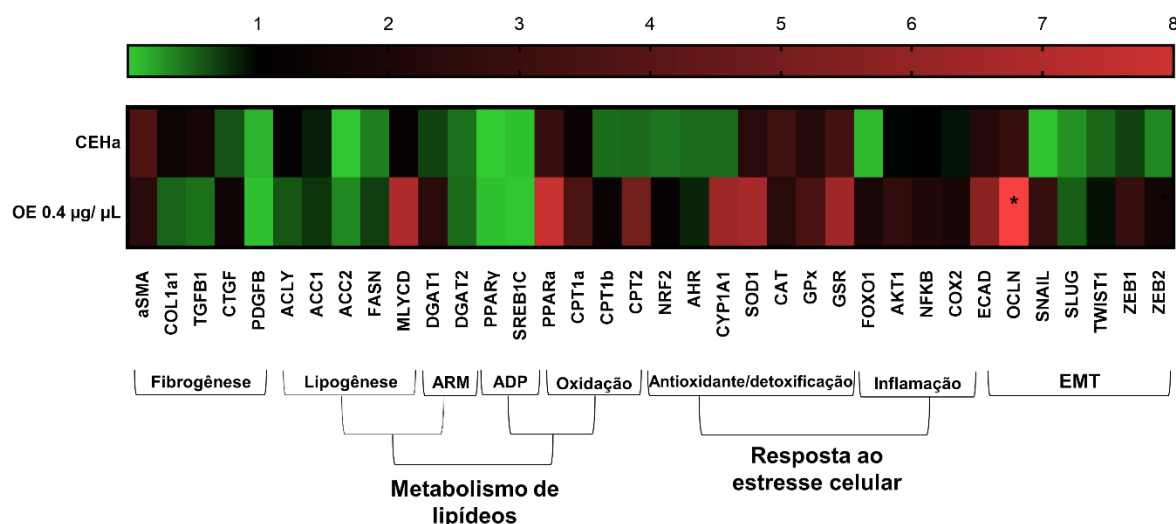


Figura 15 – Heat Map da expressão relativa à CEHq *like* dos genes avaliados. ARM – armazenamento de lipídeos; ADP – fatores adipogênicos (* representa expressão relativa acima de 8).

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 officinais 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- β 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- β 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- β 1 and TGF- β 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- β -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 α 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/pnppmf/ppnppmf/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- β 2 upregulates sphingosine kinase-1 activity, which in turn attenuates the fibrotic response to TGF- β 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 η 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, fev. 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- β /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- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.*, v. 8, n. 3, p. 287-297, may 2021.