
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FERNANDA RANGEL GONÇALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
TERAPÊUTICO DE *Silybum marianum*
NA REVERSÃO DO PROCESSO
FIBROSANTE HEPÁTICO EM MODELO
CELULAR



Rio Claro
2016

FERNANDA RANGEL GONÇALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
TERAPÊUTICO DE *Silybum marianum* NA
REVERSÃO DO PROCESSO FIBROSANTE
HEPÁTICO EM MODELO CELULAR

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Karen C. Martinez de Moraes

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

Rio Claro
2016

615.53 Gonçalves, Fernanda
G635a Avaliação do potencial terapêutico de silybum marianum
na reversão do processo fibrosante hepático em modelo
celular / Fernanda Gonçalves. - Rio Claro, 2016
52 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientadora: Karen C. Martinez de Moraes

1. Medicina alternativa. 2. Fibrose hepática. 2. Silimarina.
3. Proteínas da matriz extracelular. I. Título.

Dedico este trabalho em especial a minha mãe Katia, por toda a dedicação que teve comigo ao longo da minha vida e pelas sabias palavras de incentivo e força. Dedico também a toda a minha família pelo apoio e por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter presenteado com sabedoria, saúde e capacidade para realizar esse trabalho.

Gostaria de agradecer também a Prof.^a Dr.^a Karen C. M. de Moraes, por me aceitar em seu laboratório, por tudo o que me ensinou e por ter proporcionado o meu crescimento como profissional.

Agradeço em especial aos meus pais por terem me incentivado por toda a minha vida, por terem me dado amor e se dedicado a mim muitas vezes em detrimento de si mesmos.

À minha família pelo apoio, em especial aos meus avós pelo apoio financeiro que me permitiu continuar a estudar.

Aos amigos do laboratório pelos ensinamentos, ajudas e risadas dentro e fora do laboratório.

Aos amigos que fiz na faculdade, por tudo o que passamos juntos, pelos bons e maus momentos que me fizeram crescer muito como ser humano, vocês estarão sempre em meu coração.

Por fim, mas não menos importante, a minha companheira no dia-a-dia, minha cachorra Beethovan, por me animar quando eu estava desanimada, por me fazer feliz quando eu estava triste e me alegrar ainda mais quando eu estava feliz e, sobretudo pela companhia.

“A única forma de chegar ao impossível, é
acreditar que é possível.”

(Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas)

RESUMO

A fibrose hepática é uma doença que ao longo dos anos vem se tornando um grave problema de saúde pública, chegando a se tornar a 18ª maior causadora de mortes no mundo, com números que tendem a crescer anualmente. Essa doença é causada por repetidas lesões no fígado, e as células ao tentarem cicatrizar o tecido machucado, acabam desencadeando o acúmulo de proteínas na matriz extracelular, gerando a fibrose, essa que pode se agravar até o estado conhecido como cirrose. Hoje, vários novos estudos vem sendo feitos a fim de tratar essa doença, porém os resultados obtidos servem apenas como um paliativo ou carecem ainda de novos estudos, sendo que a prevenção das lesões é ainda o melhor método encontrado de combate a esse problema. Tendo em vista a gravidade dessa doença e as dificuldades em se estabelecer um tratamento para ela, decidimos propor um novo modelo de tratamento, utilizando a silimarina, uma planta que vem sendo utilizada desde os tempos antigos na cura de diversas doenças, entre elas, algumas doenças do fígado. Ao final desse estudo poderemos verificar a eficácia ou não da silimarina sobre a fibrose hepática, bem como as concentrações que melhor atuam sobre as células lesionadas.

Palavras-chave: Silimarina. Fibrose hepática. Proteínas da matriz extracelular.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Silimarina e seus efeitos em doenças hepáticas.....	8
1.2 Fibrose hepática.....	11
1.3 O modelo celular no estudo de patogenias humanas.....	18
1.4 Justificativa.....	21
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Cultura de células e tratamento.....	22
3.2 Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular (MTT).....	22
3.3 Análises morfológicas.....	23
3.3.1 Microscopia de Luz: análise das gotículas de lipídeos.....	23
3.3.2 Microscopia de Fluorescência: a análise dos filamentos de actina e núcleo celular.....	24
3.4 Extração de RNA e transcrição reversa.....	25
3.4.1 Extração de RNA.....	25
3.5 Transcrição reversa.....	26
3.6 Análises moleculares.....	26
3.6.1 PCR semi-quantitativo.....	26
3.7 Análises estatísticas.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Ensaio de citotoxicidade.....	28

4.2 Análises morfológicas: microscopia de luz.....	30
4.3 Análises morfológicas: microscopia de fluorescência.....	32
4.4 Análise molecular de marcadores pró-fibrosantes: PCRs semi-quantitativos.....	35
5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Silimarina e seus efeitos em doenças hepáticas

Silybum marianum é uma planta herbácea pertencente a família das Asteraceae, a qual engloba as margaridas e cardos. Essa é uma planta originária de uma estreita área do Mediterrâneo, porém após ter sido introduzida por colonizadores europeus no início de sua migração, agora ela se espalha por toda parte oriental dos Estados Unidos e América do Sul, podendo também ser encontrada na Índia, China, África do Sul e Austrália, preferindo sempre áreas ensolaradas e com solo drenado (FLORA et al.,1998).

A planta que é popularmente conhecida como cardo de leite ou cardo mariano, ganhou o nome devido sua principal característica, presença de folhas pontiagudas com veias brancas, o que de acordo com a lenda, elas carregariam o leite da Virgem Maria. Já a planta madura (Figura 1), apresenta flores de cores roxas exuberantes e uma grande quantidade de espinhos robustos (FLORA et al.,1998).

Figura 1: Flor da planta madura herbácea *Silimum marianum*, de onde é derivada a silimarina.



Fonte: www.medicinanet.com.br

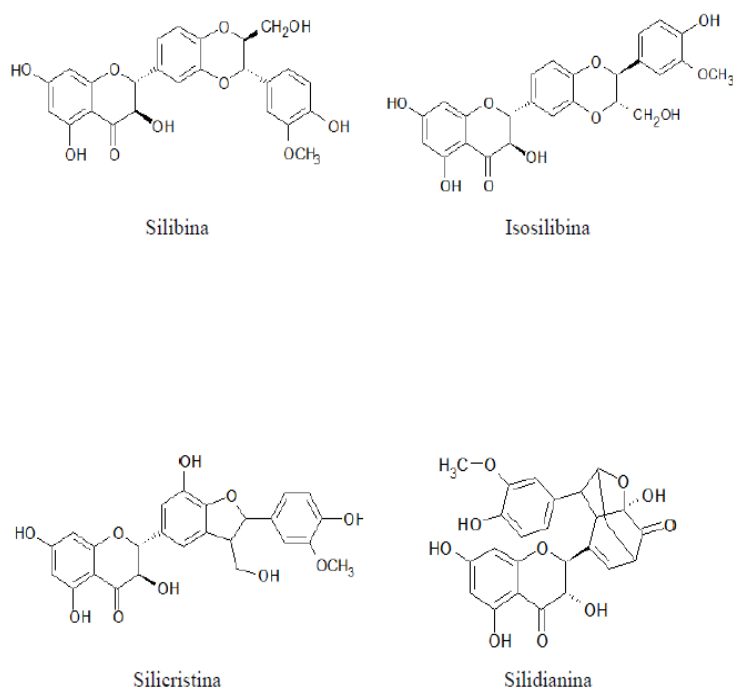
O uso medicinal dos extratos dessa planta é conhecido desde a Grécia Antiga, quando Dioscorides, um herbalista grego, descreveu que um chá feito das sementes dessa planta seria capaz de curar picadas de cobras venenosas. Enquanto, Plínio, o velho, naturalista romano, descreveu que a mistura do extrato da planta com mel era um excelente remédio para tratar de problemas biliares. Porém,

foi apenas em 1534 que a planta foi cotada como possível tratamento para doenças do fígado, por Otto Brumfels, sendo seguido por novos estudos sobre o assunto por Hieronimus Bock (1595), Jacobus Theodorus (1664) e Adam Lonicerus (1679) (FLORA et al.,1998). E apenas em 1960 seu princípio ativo foi isolado de extratos de plantas, por Janiak e Hansel, sendo a sua estrutura química elucidada em 1968 por Petter and Hansel, assim como Wagner et al. (1968, 1971).

No final do século dezesseis, Culpepper (1787), percebeu que o cardo mariano era um ótimo remédio para obstrução do fígado e baço e que a infusão de suas raízes e sementes frescas eram capazes de curar icterícia e expelir pedras. A planta se tornou ainda mais conhecida entre 1772 e 1850 com a “Rademacher’s Tincture”, o qual era um extrato de etanol feito a partir das sementes de *Silybum marianum* com a finalidade de tratar distúrbios hepáticos (FLORA et al.,1998). Em 1980, Fintel e Albert perceberam que após uma lesão tóxica no fígado, a utilização de silimarina normalizava os valores de soro de glutamato-oxaloacetato-transaminase e de glutamato-piruvato transaminase de uma forma consideravelmente rápida. Em 1977, Berenquer e Carrasco também observaram uma normalização mais rápida após aplicações de silimarina, só que nos valores de albumina no plasma em pacientes com doença crônica inflamatória do fígado. Feher em 1989, demonstrou que após administração de silimarina em pacientes com problemas no fígado devido a ingestão de álcool, ocorria a normalização mais rápida das transaminases. Em 1996, Andres descobriu que dentre as quatro flavoligninas mais importantes encontradas na silimarina, apenas silibina e silicristina teriam um efeito estimulador sobre a transcrição e tradução nas células do fígado (SONNENBICHLER, et al., 1999). Por outro lado, no início do século vinte, o uso da *Silimum marianum* foi expandido, com os “Eclectics”, uma escola de medicina de herbalistas que estava usando extratos de cardo mariano para tratar congestão hepática, varizes, problemas menstruais e anormalidades no baço e nos rins (FLORA et al.,1998).

Em 1999, Sonnenbichler et al. isolou uma mistura chamada de silimarina, cujos principais componentes são: silibina (60%), silicristina (20%), silidianina (10%) e isosilibina (5%) (DIXIT et al., 2007 – Figura 2), sendo esses encontrados em maiores concentrações nas frutas, sementes e folhas da planta (FLORA et al.,1998).

Figura 2: Estruturas isoladas dos principais componentes encontrados na mistura conhecida como silimarina.



Fonte: Sonnenbichler e colaboradores (1999) adaptado.

Vários estudos vêm sendo feitos com relação as propriedades curativas da silimarina, porém ainda pouco se sabe sobre os seus mecanismos de atuação. Até agora, sabe-se que a ação hepatoprotetora da silimarina é encontrada em 5 sítios (FERREIRA, 2011):

- 1- Atividade antioxidante contra peroxidação de lipídios por retirar espécies reativas de oxigênio e aumentar a quantidade de glutathiona;
- 2- Habilidade de regular a permeabilidade da membrana dos hepatócitos aumentando sua defesa contra a agressão de xenobióticos;
- 3- Ação anti-inflamatória agindo sobre o receptor do TNF-alfa, diminuindo a ação pró-inflamatória de diversos agentes agressores;
- 4- Aumento da síntese proteica por estímulo da RNA-polimerase I, e esta propriedade promoveria a regeneração hepática, a qual é de extrema importância na defesa do órgão contra doenças agudas e crônicas;
- 5- Diminuição da ativação das células estreladas, promovendo uma ação anti-fibrogênica.

Além disso, as sementes de *S. marianum*, contêm betamina, a qual possui efeito hepatoprotetor comprovado. A silimarina também é constituída de ácidos graxos essenciais o que podem contribuir para sua atividade anti-inflamatória. Sabe-se também que um de seus componentes, a silibina possui atividade hepatoprotetora e apresenta ação quimiopreventiva para câncer, tanto in vitro quanto in vivo. Além da silibina, dois diastereoisômeros presentes na silimarina, isosilibina A e isosilibina B, também apresentam atividade antineoplásica (SANTOS, et al., 2010).

Hoje, a silimarina é altamente estudada a fim de elucidar suas propriedades terapêuticas, pois, pode-se tornar um importante remédio contra problemas hepáticos, considerando-se que o composto possui um longo tempo de ação no fígado (HE et al., 2002), não é hepatotóxica baseadas em observações clínicas, apresenta valores muito altos de dose letal 50 - LD50 (FLORA et al., 1998), além de ser aceita como um produto natural seguro. Além disso, a silimarina já foi aprovada para o tratamento de vários distúrbios hepáticos, como cirrose hepática, hepatite alcoólica, hepatite secundária devido a exposição de substâncias tóxicas e hepatites virais agudas e crônicas (TAKEDA, 2016).

1.2 Fibrose Hepática

As doenças do fígado são a quinta maior causa de mortalidade na União Europeia, podendo levar a fibrose hepática e a cirrose. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cirrose hepática é a 18ª maior causa de mortalidade no mundo, além de ser responsável por 1.8% de todas as mortes na Europa, ou seja, aproximadamente 170.000 mortes/ ano, segundo dados de 2013 (ALVES, 2013). No Brasil, segundo o portal de saúde do Ministério da Saúde, em 2010, a cirrose e outras doenças crônicas do fígado foram a quarta maior causa de morte nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste e a quinta maior causa de morte na região Sul. Sendo que na região Sudeste, a taxa específica de mortalidade por cirrose foi igual à taxa de mortalidade por doenças isquêmicas do coração (6,9 óbitos/ 100 mil habitantes) (Tabela 1).

Tabela 1: Número de mortes por cirrose no Brasil em 2012.

Consequências para a Saúde: Mortalidade e Morbidade

Taxas de mortalidade padronizada por idade (TMPI) e frações atribuídas ao álcool (FAA), 2012

	TMPI*		FAA (%)	
Cirrose hepática, homens/mulheres	28.8	5.8	62.6	60.2
Mortes em estrada, homens/mulheres	52.5	11.3	18.0	5.2

* Por 100.000 da população (+15)

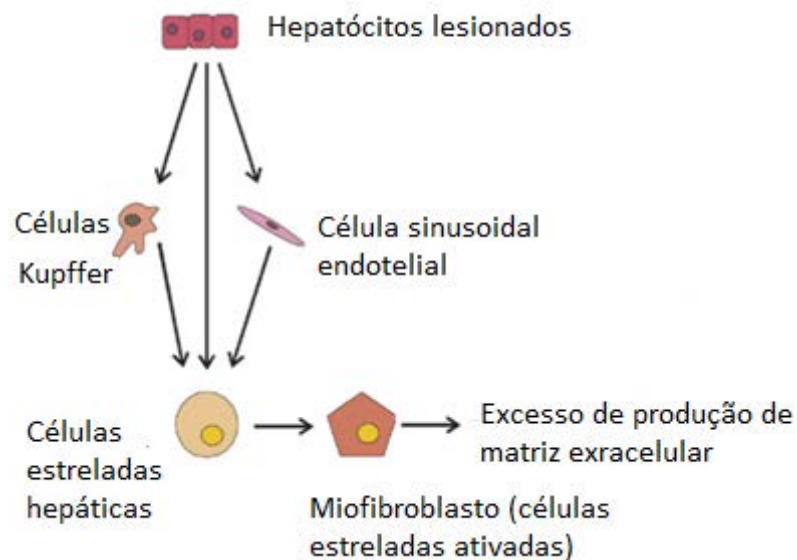
Fonte: Organização Mundial da Saúde adaptado.

Lesões hepáticas crônicas podem causar fibrose hepática, a qual é uma forma de resposta de cicatrização, envolvendo diversos tipos de células e mediadores, gerando o acúmulo de tecido conectivo em torno do fígado (VAN DE BOVENKAMP, 2007). Em estágios mais avançados das fibroses hepáticas, a cirrose se estabelece frequentemente, e caracteriza-se por gerar grande distorção do parênquima do fígado associado com septos e formação de nódulos, alterando o fluxo sanguíneo e com risco de insuficiência hepática, além de uma maior cicatrização (FRIEDMAN, 2008).

Muitas são as causas de fibrose hepática entre as quais estão as infecções com o vírus da hepatite B ou C, consumo exacerbado de álcool, distúrbios metabólicos e respostas autoimunes, decorrente do uso de drogas, infecções por helmintos, sobrecarga de ferro ou cobre e obstrução biliar (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007). Em geral, a lesão hepática leva ao recrutamento de células imunológicas para o fígado e a ativação das células Kupffer locais, sendo que as plaquetas são as primeiras a chegarem ao local da lesão (Figura 3). Elas diminuem a perda de sangue ao formarem agregados ao final dos vasos sanguíneos danificados e convertendo fibrogênio em fibrina, além disso, elas dão início a coagulação e liberam fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento transformador β (TGF- β), os quais são excelentes estimuladores de fibroblastos e outras células mesenquimais de cicatrização de

tecidos. Essas sendo seguidas pelos neutrófilos, os quais são considerados células de rápida resposta do sistema imune inato (HENDERSON, et. al., 2007).

Figura 3: Representação da interação entre os quatro grandes tipos de células do fígado, hepatócitos, células de Kupffer, células estreladas, e endoteliais no desenvolvimento da fibrose hepática em resposta à lesão hepática crônica.



Fonte: Van de Bovenkanp, 2007 adaptado.

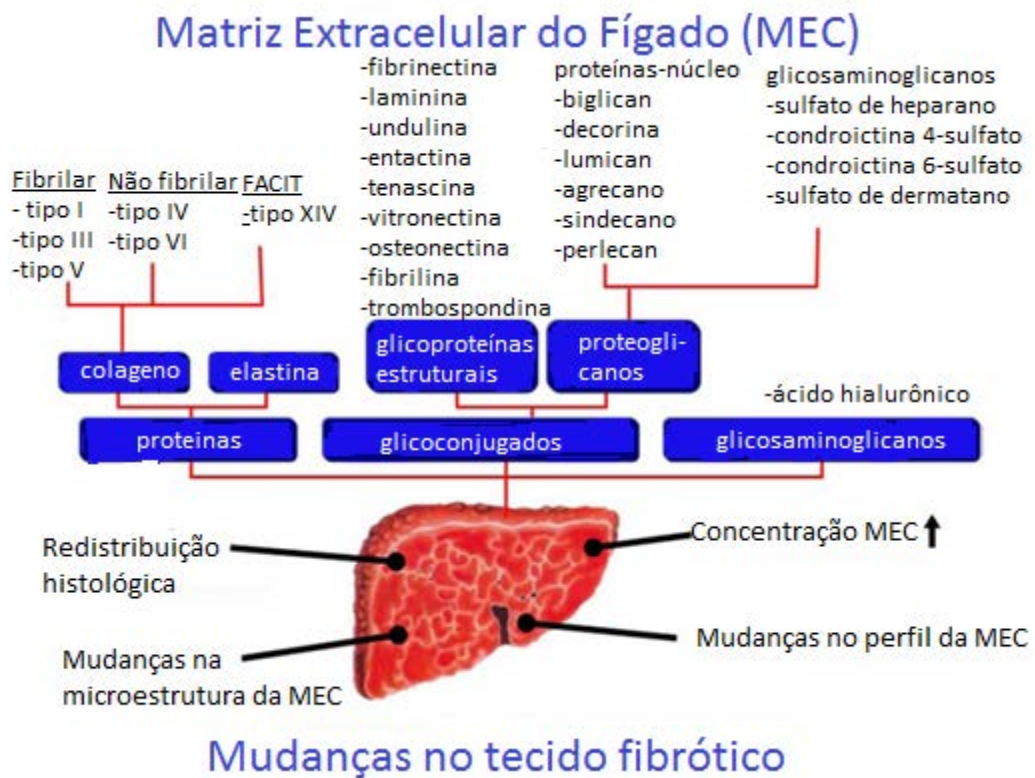
Outras células que também atuam nas lesões são os macrófagos, os quais realizam diversas funções, como regulação de células inflamatórias, recrutamento e ativação de miofibroblastos e regulando a recuperação espontânea da fibrose. Os mastócitos também estão presentes, sendo fonte de citocinas pró-fibrogênicas, incluindo TGF- β , PDGF e fatores de crescimento de fibroblasto (FGF). E por fim, as células exterminadoras naturais (NK - "natural killer cell"), as quais atuam quando a fibrose é provocada por patógenos, combatendo o vírus ao recrutar células T e secretando citocinas (HENDERSON, et al., 2007).

O processo fibrosante é o resultado do acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágeno, principalmente os do tipo I e III, proteoglicanos e glicoproteínas e da redução da degradação dessas moléculas (Figura 4). Durante a fibrose hepática, a quantidade total de componentes com e sem colágeno no fígado aumentam em 3-5 vezes, sendo acompanhados por uma mudança no tipo de MEC no espaço sub-endotelial de Disse, do tipo normal que apresenta baixa densidade para um tipo intersticial de matriz que apresenta colágenos formadores de fibrilas.

Essas mudanças na composição da MEC contribuem para a formação de um novo ambiente bioquímico, e criam barreiras de difusão adicionais entre os hepatócitos e os sinusóides do fígado (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007).

Portanto, a fibrose ocorre quando os estímulos para a fibrogênese (aumento da quantidade da matriz extracelular) superam aqueles da fibrólise (diminuição da quantidade da matriz extracelular), ocorrendo um acúmulo de tecido fibroso (ANDRADE, 2005).

Figura 4: Mudanças dos componentes da MEC do fígado na fibrose.



Fonte: Gressner, et. al., 2014 adaptado.

As células-chave na produção da fibrose no fígado são as células estreladas hepáticas (HSC), também conhecidas como lipócitos, células Ito, ou células de reserva de vitamina A. Elas se localizam no espaço de Disse e são responsáveis pelo estoque de 80% de vitamina A (retinol) de todo o organismo, na forma de palmitato de retinol, presentes em vesículas de lipídeos citoplasmáticos. Elas também podem ser encontradas em órgãos extra-hepáticos, como o pâncreas, coração, rins e intestino. Essas e conjunto com as células extra-hepáticas formam o que se denomina de sistema de células estreladas (MAIA, 2009).

Elas foram descritas pela primeira vez em 1876 por Carl Von Kupffer, utilizando-se de um método de coloração por cloreto de ouro, o qual detecta células estreladas localizadas no espaço de Disse. A princípio, Kupffer acreditava que essas eram células do tecido conjuntivo, porém 20 anos depois concluiu erroneamente que as HSC eram um tipo especial de fagócitos (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007).

Na primeira metade do século 20 essas células foram redescobertas, com relatos de investigadores sobre a presença de vitamina A em células do fígado não parenquimatosas. Em 1952, Toshio Ito observou em microscopia de luz, células perisinusoidais contendo gotículas lipídicas em fígados humanos e as chamou de células armazenadoras de gordura. Em 1958, Suzuki encontrou células com formato estrelado no espaço de Disse e se referiu a elas como células intersticiais. Por fim, em 1971, Kenjiro Wake concluiu que as células descritas por Kupffer, Ito e Suzuki eram as mesmas, além de demonstrar que a autofluorescência das gotículas de lipídeo e sua reatividade ao cloreto de ouro se devem a presença da vitamina A (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007).

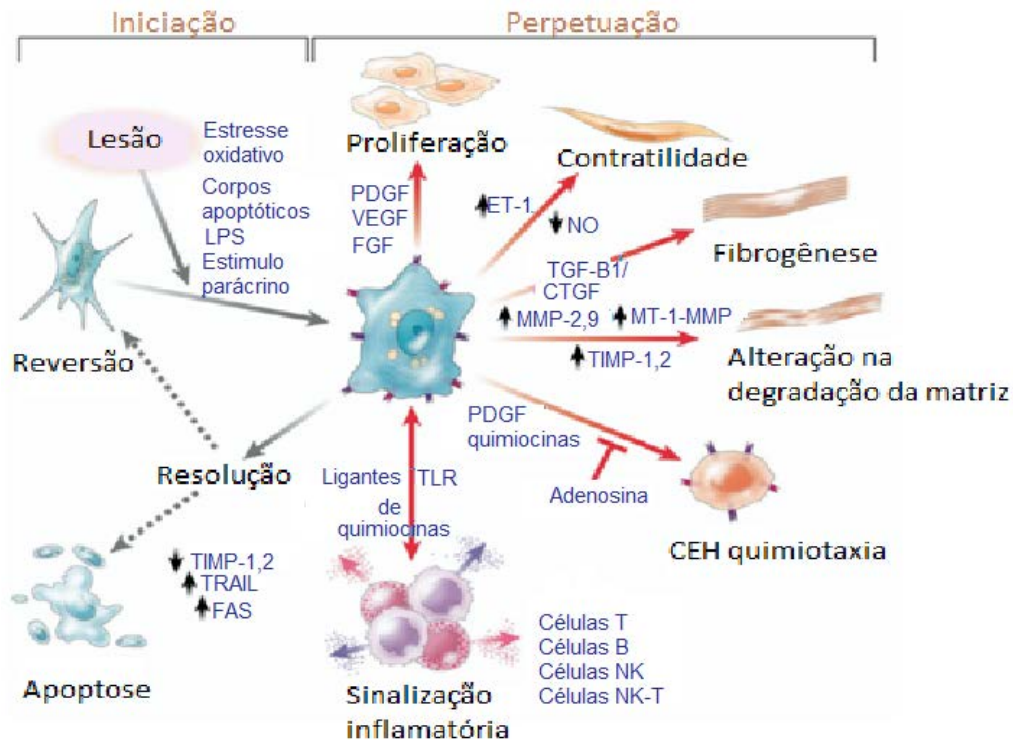
Em situações fisiológicas, essas células representam de 5-8% das células do fígado, possuem uma grande concentração de lipídeo e baixa densidade (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007), além de desempenharem papel primordial na regulação da homeostase do retinol. Em situações patológicas, elas sofrem um processo conhecido como “ativação”, perdem o retinol e sintetizam grande quantidade de componentes da matriz extracelular. Essa “ativação” consiste na transição de células quiescentes, ricas em retinol para miofibroblastos (MFB) contráteis, sendo esse um evento chave na lesão hepática e tendo papel central na produção e na degradação da matriz extracelular (MAIA, 2009).

A “ativação” das células hepáticas estreladas ocorre em 3 etapas (Figura 5) mostradas a seguir (GRESSNER, et. al., 2014):

- Fase pré-inflamatória: ativação parácrina direta das HSC por hepatócitos necróticos.
- Fase inflamatória: HSC pré-ativadas são ainda mais estimuladas no modo parácrino por leucócitos e trombócitos invasores para que essas se transdiferenciem em MFB.

- Fase pós-inflamatória: secreção de citocinas estimulantes de MFB e interação de componentes da matriz.

Figura 5: Diversos caminhos que levam a “ativação” das HSC, assim como os diversos genes envolvidos nesse processo.



Fonte: Friedman, 2008 adaptado.

Ao serem “ativadas”, HSC adquirem propriedades contráteis, pró-inflamatórias e pró fibrogênicas. Elas migram para os tecidos de reparação secretando uma grande quantidade de MEC e regulando sua degradação. Há também mudanças morfológicas, como o aparecimento da proteína de citoesqueleto alfa actina de músculo liso (α -SMA), perda do armazenamento celular de vitamina A e um aumento do aparecimento do retículo endoplasmático rugoso. Já no metabolismo, ocorre um aumento na síntese de DNA e proliferação celular, sendo que o padrão da expressão gênica também é alterado. Com essa alteração, ocorre um aumento na síntese e deposição de proteínas na MEC, o que faz com que essas células se tornem diretamente fibrogênicas. Depois, ocorre uma maior proliferação das HSC, o que aumenta o número de células fibrogênicas presentes no fígado, complicando ainda mais o quadro (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007).

Portanto, esse processo atua como um *feedback* positivo, já que o aumento da produção das proteínas da MEC é causado pela ativação das HSC, o que resulta na ativação e proliferação das mesmas e portanto da continuidade ao processo fibrosante (VAN DE BOVENKAMP, 2007). Pode-se observar também que a “ativação” das células estreladas hepáticas em miofibroblastos, pode ser considerada o mediador final comum da fibrose (HENDERSON, et al., 2007).

Embora seja crescente o número de investigações, ainda são poucas as opções para o tratamento tanto da fibrose hepática quanto da cirrose. A maioria dos tratamentos conhecidos se embasam na remoção do estímulo indutor das doenças ou o transplante de fígado nos casos mais graves da doença, o que também é uma forma de tratamento bastante limitada, visto a dificuldade do procedimento e de compatibilidade (HENDERSON, et al., 2007).

Esse conceito só começou a ser mudado devido a diversas pesquisas feitas durante as últimas décadas do século passado, principalmente devido a estudos de fibrose hepática associada com a esquistossomose (ANDRADE, 2005). Com isso, novos estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar tratamentos eficazes contra a fibrose hepática e contra a cirrose, como o uso de antivirais no tratamento contra hepatites B e C, metotrexano e ácido ursodeoxicólico no tratamento de cirrose biliar primária e corticoesteróides em pacientes portadores de hepatite autoimune, mas ainda muitos estudos devem ser feitos para verificar a eficácia desses tratamentos (MAIA, 2009).

Entre as novas pesquisas relacionadas a essas doenças, se encontram a utilização de culturas de células e de linhagens humanas de HSC. Entre as linhagens estabelecidas para esses estudos, as linhagens LX-1 e LX-2 foram desenvolvidas por (XU, et al., 2005). A primeira tendo sido gerada a partir da imortalização do antígeno SV40 T e a segunda por imobilização espontânea sob condições baixas de soro. Interessantemente, linhagem LX-2 está associada ao metabolismo de retinóides e da fibrogenese, o que a torna altamente adequada a estudos sobre fibrose hepática (GUTIÉRREZ-RUIZ, 2007). Entre as características que tornam essa linhagem vantajosa nos estudos de fibrose, está o fato de que elas possuem características de culturas primárias de células estreladas hepáticas, como a expressão da proteína desmina e o fator de crescimento (TGF- β), além disso,

células LX-2 podem ser crescidas em sob diferentes concentrações de soro, expressão altos níveis de α -SMA e colágeno-1 e possuem uma eficiência de transfecção de 100% quando comparadas com o percentual muito inferior das HSC primárias (VENUGOPAL, et al., 2010) e de 30% ao utilizar reagentes comerciais (XU, et al., 2005).

1.3 O Modelo Celular no Estudo de Patogenias Humanas

A cultura de células caracteriza-se como um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células vivas isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias das mesmas em um sistema considerado ex vivo (MIGITA, 2012).

Existem dois tipos de culturas celulares, as primárias, a qual é preparada diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem passo inicial de fracionamento de células e a cultura secundária, na qual as células cultivadas foram retiradas de uma cultura primária, elas podem ser repetidamente subcultivadas dessa forma, por semanas ou meses (GONÇALVES, et al., 2005). Existem também as chamadas linhagens celulares contínuas, caracterizadas pela imortalização das células, ou seja, as células adquirem a capacidade de se diferenciar indefinidamente, o que garante maior reprodutibilidade e fidelidade do que as culturas primárias (MIGITA, 2012).

O princípio básico da técnica de cultura foi estabelecido no final do século XIX por um embriologista alemão chamado Wilhen Roux (1885), que conservou uma porção de medula de embrião de galinha numa solução salina durante vários dias, provando que o fechamento do tubo neural é uma função primária de seu constituinte celular e não um efeito mecânico direto por pressão exercida pelas estruturas adjacentes, como se supunha anteriormente. Em 1887, J. Arnold cultivou leucócitos, implantando-os sob a pele e na cavidade abdominal de um sapo fragmentos da parte central de uma planta umedecidos com humor aquoso do mesmo tipo de animal, os quais foram invadidos pelos leucócitos, sendo este o primeiro estudo de mitose e a prova de que as células podiam sobreviver fora do corpo do animal (ASSIS, 2007).

Em 1912, Alexis Carrel, um cirurgião e biólogo, introduziu as técnicas de assepsia utilizadas em salas de cirurgia para os laboratórios de cultura de células. Ele trabalhou por 30 anos com subcultura de fibroblasto de pintos sem nunca ocorrer nenhum incidente de contaminação, demonstrando que células animais podem ser cultivadas *in vitro* com sucesso (ASSIS, 2007). Ele também fez a primeira descrição de uma cultura celular 3D (MIGITA, 2012).

Em 1913, o uso da cultura de células teve início no campo da Virologia, com Steinhard, Israeli e Lambert, os quais demonstraram que o vírus da *vaccinia* (varíola) permanecia ativo durante mais de um mês quando inoculado em células de córnea de coelho ou preá (*Cavea*) em cultura (PARKER, 1961). Desde essa época, a cultura de células continua como importante suporte laboratorial para a identificação de uma grande quantidade de vírus, tanto da família viral quanto do tipo específico, através da resposta citológica, característica de cada grupo (KOBUNE et al., 1990; BITKO et al., 2004; ROJAH et al., 2005).

Em 1940, o surgimento dos antibióticos ajudou bastante na simplificação de várias técnicas de cultura de células, devido ao aumento no controle da contaminação microbiológica, sendo de grande importância em técnicas com utilização de vírus (ASSIS, 2007). E em 1946, P. R. White, deu início ao crescimento de tecido animal em meio sintético, com composição conhecida (PARKER, 1961; WASLEY e MAY, 1970), o que permitiu a formulação de uma variedade de meios de cultura, acrescidos de substâncias responsáveis pelo melhor desenvolvimento celular *in vitro*, possibilitando o cultivo de células da maioria dos tecidos e órgãos (ASSIS, 2007).

Em 1948, Earle isola uma única célula da linhagem das células L e mostra que elas formam clones de células em cultura de tecidos (GONÇALVES, et al., 2005). Em 1949, foi descoberto que o vírus da pólio poderia ser crescido em culturas celulares humanas gerando um grande número de pesquisas e por consequência várias vacinas a partir de cultura de células (COMINETTI, 2010). Em 1952, se tornou possível cultivar células humanas indefinidamente, com a primeira linhagem celular (HeLa), estabelecida em laboratório pelo pesquisador George Gey no Hospital Johns Hopkins, em Baltimore, EUA (MIGITA, 2012).

Até a metade do século XX, acreditava-se que se fossem fornecidos todos os substratos necessários, as células em cultura poderiam ser cultivadas indefinidamente. Porém, em 1961, Leonard Hayflick e Paul Moorhead, trabalhando com fibroblastos humanos, descobriram que as culturas normais de células humanas exibiam capacidade limitada de divisão, fenômeno intitulado “Limite de Hayflick”. Essa nova teoria permitiu mudanças no pensamento da época e abriu caminho para novos estudos sobre a senescência celular (MIGITA, 2012). Em 1981, Evans e Kaufman estabeleceram a primeira cultura de células-tronco a partir de embriões de camundongo. Enquanto em 1988, James Thomson descobriu a primeira linhagem de células-tronco embrionária humana (MIGITA, 2012).

Hoje, a cultura de células é utilizada em diversas pesquisas, pois essa possibilita o estudo de fenômenos inacessíveis em tecidos intactos, considerando-se a possibilidade de controle das condições ambientais, como pH, temperatura, concentração de O₂, além de outras variáveis, o que permite a obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas, com economia de tempo e reagentes, viabilizando estudos avançados sobre o sistema molecular (GONÇALVES, et al., 2005).

Existem também algumas desvantagens para a utilização dessa técnica, como gasto elevado de material, instabilidade da cultura celular, perda de características fenotípicas, dificuldade de extrapolação para o modelo de organismo intacto, além da necessidade de pesquisadores experientes (GONÇALVES, et al., 2005). Além disso, há críticas também sobre a validade das células em cultura como modelo biológico “vivo” com função fisiológica, por frequentemente não expressarem as propriedades características das células que lhe deram origem, devido às trocas no ambiente celular quando in vitro (FRESHNEY, 2000). Apesar disso, as células em cultura, representam um modelo experimental vivo considerado, em muitos testes, substituto do modelo animal, pois elas mantêm o genoma e os mecanismos fundamentais de proliferação (mitoses) (ASSIS, 2007).

Sendo assim, o uso dessa técnica foi de grande importância para o nosso trabalho, já que esta permite a manutenção de células vivas independente do organismo que a originou, o que foi de grande valia para nossos experimentos, já que a doença estudada ocorre em seres humanos, o que impossibilita um estudo no

organismo vivo. Além disso, a cultura celular garante a reprodutibilidade dos experimentos e viabiliza estudos mecanísticos da atuação de compostos farmacêuticos/naturais.

Outro ponto importante na escolha dessa técnica foi o fato de haver um maior controle das condições em que o experimento foi realizado, como o pH e a temperatura, além de sabermos o tipo de meio de cultura mais apropriado para o crescimento das células, o que permitiu maior facilidade durante a experimentação, menor gasto de tempo e principalmente proporcionou uma maior economia de fundos. Essas características também permitiu um menor número de contaminações no experimento, o que também gerou grande economia de tempo e dinheiro.

1.4 Justificativa

A fibrose hepática, assim como a cirrose constituem um grave problema para a saúde pública, não só do Brasil, mas também mundial. Atualmente essas patologias são consideradas pela OMS como 18^a maior causa de mortes, sendo que esses números vem crescendo anualmente. Apesar do maior interesse no estudo dessas doenças, ainda não se tem uma solução definitiva para esses males e as soluções até então propostas ainda necessitam de ampla investigação.

No presente estudo estamos propondo a investigação do efeito de um composto natural na reversão do quadro pró-fibrosante hepático, considerando-se a necessidade de inovações tecnológicas.

2 OBJETIVOS

Analisar os efeitos celulares e moleculares da *Silybum marianum* (silimarina) na modulação do processo fibrosante hepático em culturas de células estreladas hepáticas.

2.1 Objetivos específicos

- Padronizar condições de cultivo na presença de silimarina, utilizando-se os ensaios de citotoxicidade;

- Analisar alterações morfofisiológicas das células estreladas hepáticas (HSC) cultivadas em condições de quiescência celular, ou indutoras do processo fibrosante hepático na presença e ausência de *Silybum marianum* (silimarina).
- Análise de microscopia das células nas diferentes condições para se avaliar a distribuição das gotículas de lipídeos e a distribuição dos filamentos de actina.
- Analisar o padrão de expressão gênica das células LX-2 de marcadores do processo de fibrogênese, nas diferentes condições de cultivo celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de Células e Tratamento

Células da linhagem humana estrelada hepática (HSC), LX-2, estabelecidas por XU *et al.* (2005) foram crescidas em garrafas de 25 ou 75 cm² em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 2% de soro bovino fetal (SBF), condição mantenedora da quiescência celular ou 10% de SBF, condição de cultivo indutora do quadro pró fibrosante. As células crescidas na presença de 10% de SBF, ao atingirem a confluência de aproximadamente 80% foram ou não tratadas com silimarina nas concentrações de 100 µM e 150 µM por um intervalo de 24 h a 37 °C e em 5% CO₂. As células assim cultivadas foram utilizadas na análises subsequentes.

3.2 Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular (MTT)

Para a padronização das concentrações de silimarina a serem utilizadas nos ensaios, foi realizado o clássico ensaio descrito por Mosmann (1983), conhecido como MTT. Essa técnica consiste na redução de sais amarelos de tetrazólio (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) pela enzima desidrogenase succínica, formando cristais azuis (formazan) intracelularmente. Posteriormente esses cristais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e foi realizada a quantificação em espectrofotômetro a 570 nm (MOSMANN, 1983; LOBNER, 2000).

Previamente a realização dos ensaios com a silimarina, diferentes concentrações de DMSO foram avaliadas em ensaios de MTT para se verificar concentrações seguras a serem utilizadas na solubilização do extrato de silimarina, considerando-se a toxicidade do solvente (SANTOS, *et al.*, 2003). Para os ensaios, 8 x 10³ células foram cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24

horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi trocado e em cada poço foi acrescentada quantidades decrescentes de DMSO (40% a 0,2% v/v). Após a adição de diferentes concentrações do solvente, as células foram novamente incubadas por um intervalo de 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ para permitir que a droga fizesse efeito. Após o intervalo, foi adicionada uma solução contendo 0,5 mg/mL de MTT em cada poço, seguindo a nova incubação por 4 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Logo após, o meio contendo MTT foi retirado dos poços e foi adicionado 100 µL de DMSO, sendo este novamente incubado a 37 °C e 5% de CO₂ durante um intervalo de 12 horas, para que os cristais de formazan formados intracelularmente fossem dissolvidos. Depois foi feita a leitura da absorbância no leitor de placa *EZ Read 400 Microplate Reader* (Biochrom) no comprimento de onda de 570 nm. Esse ensaio foi realizado duas vezes e em triplicatas para cada uma das condições previamente mencionadas. . A mesma metodologia foi utilizada para se avaliar os efeitos da silimarina nas culturas de LX-2. Assim, diferentes concentrações do extrato foram adicionadas às culturas celulares (10 µM a 200 µM). Para a realização dos ensaios, os respectivos controles positivos (células crescidas na presença de concentrações de dimetil sulfoxido, DMSO, compatíveis as utilizadas para a solubilização dos extratos de silimarina) e negativos (somente célula) foram utilizados.

3.3 Análises Morfológicas

3.3.1 Microscopia de Luz: análise das gotículas de lipídeos

A técnica de microscopia de luz foi utilizada para visualização e análise das gotículas de lipídio e de alterações morfológicas nas células de LX-2 tratadas com silimarina nas condições preestabelecidas pelo ensaio de MTT.

Para a realização dos ensaios as células LX-2 foram crescidas nas condições previamente descritas na presença ou ausência do extrato biológico. Para a microscopia, 8×10^4 células foram crescidas sobre lamínula em placa de 24 poços a 37 °C e 5% CO₂ até atingirem 70-80% de confluência e em seguida incubadas por um período de 24 horas com silimarina a 100 µM e a 150 µM. Para esses ensaios de microscopia, as lamínulas foram fixadas com formol-cálcio. Para isso, primeiramente foi retirado o meio dos poços e colocado 300 µL de PBS 0,5 X, logo após essa

solução foi retirada e o formol-cálcio foi adicionado e deixado durante 30 minutos em agitação. Após esse intervalo de tempo, o formol-cálcio foi retirado e as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 0,5 X durante 5 minutos por lavagem.

Em seguida, foi realizada a marcação de gotículas de lipídeos com o reagente Red Oil (Sigma-Aldrich). A técnica consiste em adicionar 300 µL de propilenoglicol 100% sobre as lamínulas, deixando-as sob agitação durante 5 minutos, duas vezes. Após isso, esse reagente é retirado e é acrescentado Red Oil 0,7% (0,105 g de Red Oil e 15 mL de propilenoglicerol a 100% aquecido por 5 minutos e filtrado 2 vezes), até cobrir a lamínula deixando-o por 7 minutos sob agitação. Em seguida o corante é removido e se adiciona propilenoglicol a 85% por um intervalo de 3 minutos. Em seguida, o núcleo celular é contra corado com hematoxilina por 1 minuto. Por fim, as lamínulas foram lavadas com água corrente e colocadas sobre lâminas contendo gelatina glicerinada (7%), para que elas não se soltassem. Em seguida, procedeu-se a análise de microscopia de luz, utilizando o microscópio *Leica DMLB*, acoplado a um sistema fotográfico *Leica MPS-3*.

Esse experimento foi realizado 3 vezes e cada uma das condições foi realizada em duplicata.

3.3.2 Microscopia de Fluorescência: a análise dos filamentos de actina e núcleo celular

Para as análises da morfologia celular, as células foram crescidas como descrito no item 3. 3.1.

Para a marcação de citoesqueleto as lamínulas foram lavadas com PBS 0,5 X (PBS 1X = 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) e fixadas com paraformaldeído a 1,36% contendo 0,2% de Triton X-100, durante 5 minutos a temperatura ambiente, e, logo após, estas foram novamente lavadas com PBS 0,5 X. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com solução de albumina bovina sérica (BSA) a 1%, durante um intervalo de 2 horas. Logo após esse período, foi adicionada uma solução de BSA a 1% contendo faloidina-TRITC, sendo esta nova incubação processada por mais 2 horas. Após esse tempo foram feitas sucessivas lavagens com PBS 0,5 X e então as lamínulas foram coradas com 4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) na concentração final de 3,33 ng/ mL para visualização

do núcleo celular. Novamente, foram realizadas sucessivas lavagens com tampão PBS 0,5 X e em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas próprias com N-propilgalato, para análise em microscópio de fluorescência modelo *BX51 OLYMPUS* DMLB, utilizando sistema de filtros compatíveis com a faloidina-TRITC e acoplado a um sistema fotográfico. O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

3.4 Extração de RNA e Transcrição Reversa

3.4.1 Extração de RNA

Para as análises de expressão gênica as células foram crescidas em garrafas de 75 cm² conforme descrito anteriormente (tópico 3.1), até a confluência de 80% e em seguida foram incubadas por um intervalo de 24 horas na presença ou ausência de silimarina, nas concentrações de 100 µM e 150 µM de extrato. Os respectivos controles positivos e negativos também foram realizados (culturas celulares incubadas com meio contendo DMSO nas concentrações 140,8 mM e 211,2 mM), as quais foram feitas em triplicata para cada uma das condições.

Para a realização da coleta, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas rapidamente com uma solução de PBS contendo EDTA, PSB-EDTA (1X PBS acrescido de 0,68 mM EDTA em pH 7,4). Em seguida as células foram tripsinizadas, recolhidas e lavadas em solução de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 2 mM de KH₂PO₄). O precipitado celular foi recolhido e utilizado na extração do RNA total, com a utilização do *TRIZOL® Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.) adaptando-se as recomendações do fornecedor.

Para a extração do RNA, os precipitados celulares foram ressuspensos em 500 µL de *TRIZOL®*, sendo estas incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado 100 µL de clorofórmio seguido de agitação vigorosa do microtubo por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, o microtubo foi centrifugado durante 15 minutos a 9000 rpm a 4 °C, gerando uma mistura trifásica, da qual o sobrenadante foi retirado com cuidado e colocado em um novo microtubo de 1,5 mL com a mesma identificação. Ao sobrenadante foram adicionados 250 µL de isopropanol, o qual foi homogeneizado suavemente e incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 10000 rpm e 4 °C. Descartou-

se o sobrenadante e o precipitado de RNA foi lavado com etanol gelado a 80%. Por fim, a amostra foi secada e ressuspensa em 30 μ L de água DEPC (água livre de RNase). Logo após, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare), utilizando-se a razão A260/A280 e A260/A230 para se avaliar a qualidade do RNA extraído, e as amostras foram guardadas no -80 °C.

3.5 Transcrição Reversa

Para a obtenção do cDNA, foram feitas reações de transcrição reversa utilizando 200 ng de RNA, seguindo as especificações do fabricante do High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). Os cDNAs sintetizados foram posteriormente utilizados em reações de polimerização em cadeia semi-quantitativa (PCR). Essas reações foram submetidas ao programa de transcrição reversa utilizando o termociclador *Mastercycle pro S*® - *Eppendorf*, sendo as reações incubadas a 25 °C por um intervalo de 10 minutos, seguido de incubação a 37 °C por 120 minutos e inativação enzimática a 85 °C por 5 minutos. Para se avaliar a quantidade do transcrito, reações de PCR convencional para o gene β -actina foram realizadas e os produtos avaliados em gel de agarose a 1%. O cDNA sintetizado foi diluído (1:10) e estocado no -20 °C até que fosse utilizado.

3.6 Análises Moleculares

3.6.1 PCR semi-quantitativo

Reações de PCR foram realizadas para se avaliar a expressão de genes e as vias de sinalização correlatos a indução do processo pro inflamatório do estresse oxidativo, as reações foram montadas em um volume final de 15 μ L, sendo 2 μ L de cDNA (1:10) e 13 μ L de solução contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 0,4 mM de oligonucleotídeos direto e reverso específicos para cada alvo (Tabela 4), enzima *Taq DNA polimerase* (0,025 U/ μ L) e solução tampão para PCR. Essas reações foram realizadas em triplicata e depois foram para um termociclador *Mastercycler® Pro S* (*Eppendorf*), onde foram realizados 30 ciclos de amplificação que consistiram em uma denaturação a 95°C por 1 minuto, seguido de um anelamento por 1 minuto - com temperaturas específicas de anelamento (T_m) para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados (direto e reverso) e então foram submetidas a um gel de agarose 1% corado com

GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) e fotografados em *MiniBIS Pro* (DNR Bio-Imaging System).

A quantificação relativa das bandas foi feita pelo programa *Image-J* (programa de domínio público desenvolvido pelo “*National Institute of Health, USA*”). A Tabela 2 apresenta a sequência dos oligonucleotídeos utilizados, assim como suas temperaturas de anelamento (T_m).

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR semi-quantitativo, com suas respectivas temperaturas de anelamento (T_m).

Genes	Oligonucleotídeos (5'-3')	T_m
β -actina	Primer Sense: CGGGACCTGACTGACTAC Primer Antisense: CTCCTTAATGTCACGCAC	54°C
COL1A1	Primer Sense: ATGACGTGATCTGTGACGAG Primer Antisense: AAATTCCTCCGGTTGATTTC	45°C
CTGF	Primer Sense: GCTGACCTGGAAGAGAACAT Primer Antisense: GCTGACCTGGAAGAGAACAT	45°C
MCP1	Primer Sense: GACTAACCCAGAAACATCCA Primer Antisense: GGTCAGCACAGATCTCCTT	45°C
TGF- β 1	Primer Sense: GACTCGCCAGAGTGGTTATC Primer Antisense: GGAGCTGAAGCAATAGTTGG	49°C
α -SMA	Primer Sense: GCCGAGATCTCACTGACTAC Primer Antisense: GCTGTTGTAGGTGGTTTCAT	49°C

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Análises Estatísticas

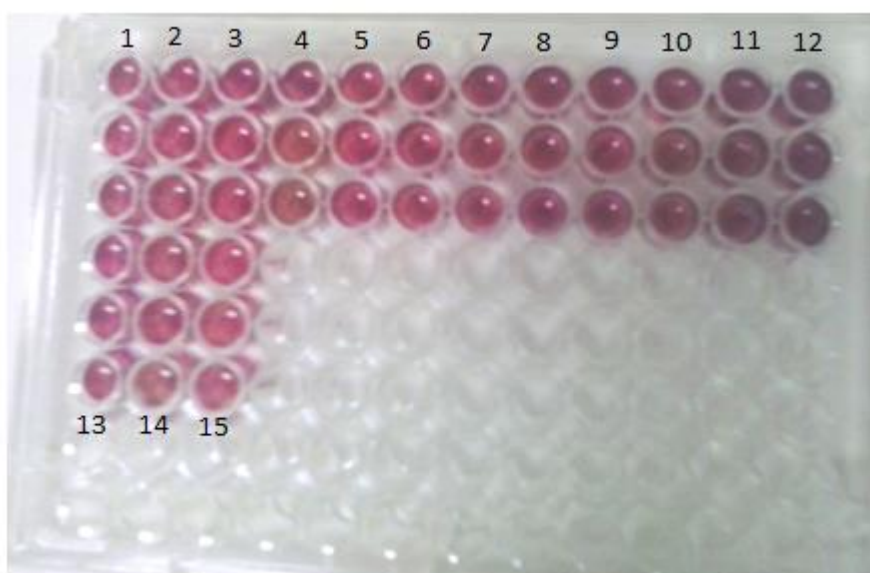
Análises estatísticas dos resultados foram geradas no programa *GraphPad*, versão 5.0 (Prism Inc.) utilizando-se ANOVA seguido pelo teste de Dunnet. Sendo adotado o valor $p < 0.05$ para significância estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular (Figura 6) foram realizados utilizando-se o clássico teste de MTT. Com essa metodologia foi possível padronizar as concentrações de silimarina a serem utilizadas nos ensaios futuros e verificar o seu potencial citotóxico nas células de LX-2.

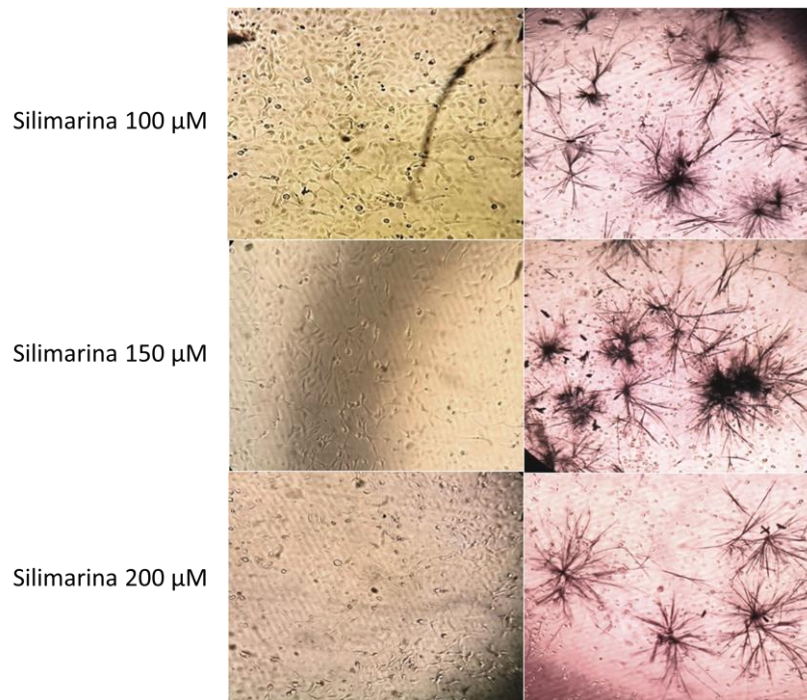
Figura 6: Figura ilustrativa dos ensaios de citotoxicidade. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada uma das concentrações de silimarina utilizadas, além das triplicatas para os controles negativo e positivo e o meio.



Legenda: 1- 10 μM ; 2- 20 μM ; 3- 30 μM ; 4- 40 μM ; 5- 50 μM ; 6- 60 μM ; 7- 70 μM ; 8- 80 μM ; 9- 90 μM ; 10-100 μM ; 11- 150 μM ; 12- 200 μM ; 13- controle negativo; 14- controle positivo; 15- meio. Fonte: Elaborada pela autora.

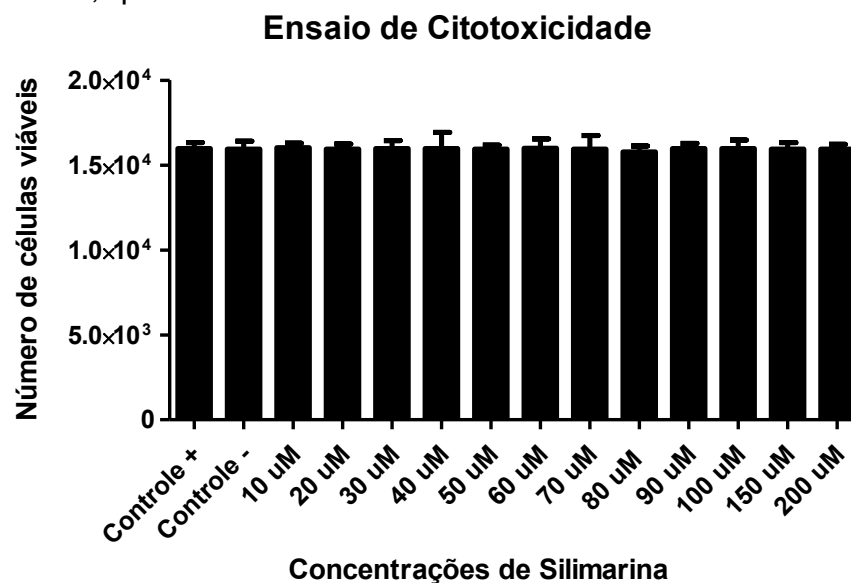
Após a realização desses experimentos foi possível comprovar que as melhores concentrações de silimarina a serem utilizadas, as quais não comprometeram a morfofisiologia celular foram às concentrações de 100 μM e 150 μM (Figura 7). A concentração de 200 μM apesar de não demonstrar alterações estatísticas significativas na viabilidade celular (Figura 8), foi possível observar alterações na morfologia celular e a conclusão de que não se tratava de uma condição apropriada para o estudo.

Figura 7: Fotos ilustrativas da técnica de microscopia de luz das células de LX-2 nas maiores condições de silimarina, 100 μM , 150 μM e 200 μM , assim como os respectivos cristais formados após a redução do tetrazólio pela enzima desidrogenase succínica, demonstrando a diminuição das células na condição de 200 μM , assim como alterações morfofisiológicas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8: Representação gráfica da análise da viabilidade celular nas diferentes concentrações de silimarina, comprovando que não houve alteração estatística significativa na taxa de mortalidade das células. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA seguido pelo teste de *Dunnett*, onde $***p < 0.0005$, $**p < 0.005$, $*p < 0.05$.



Fonte: Elaborada pela autora.

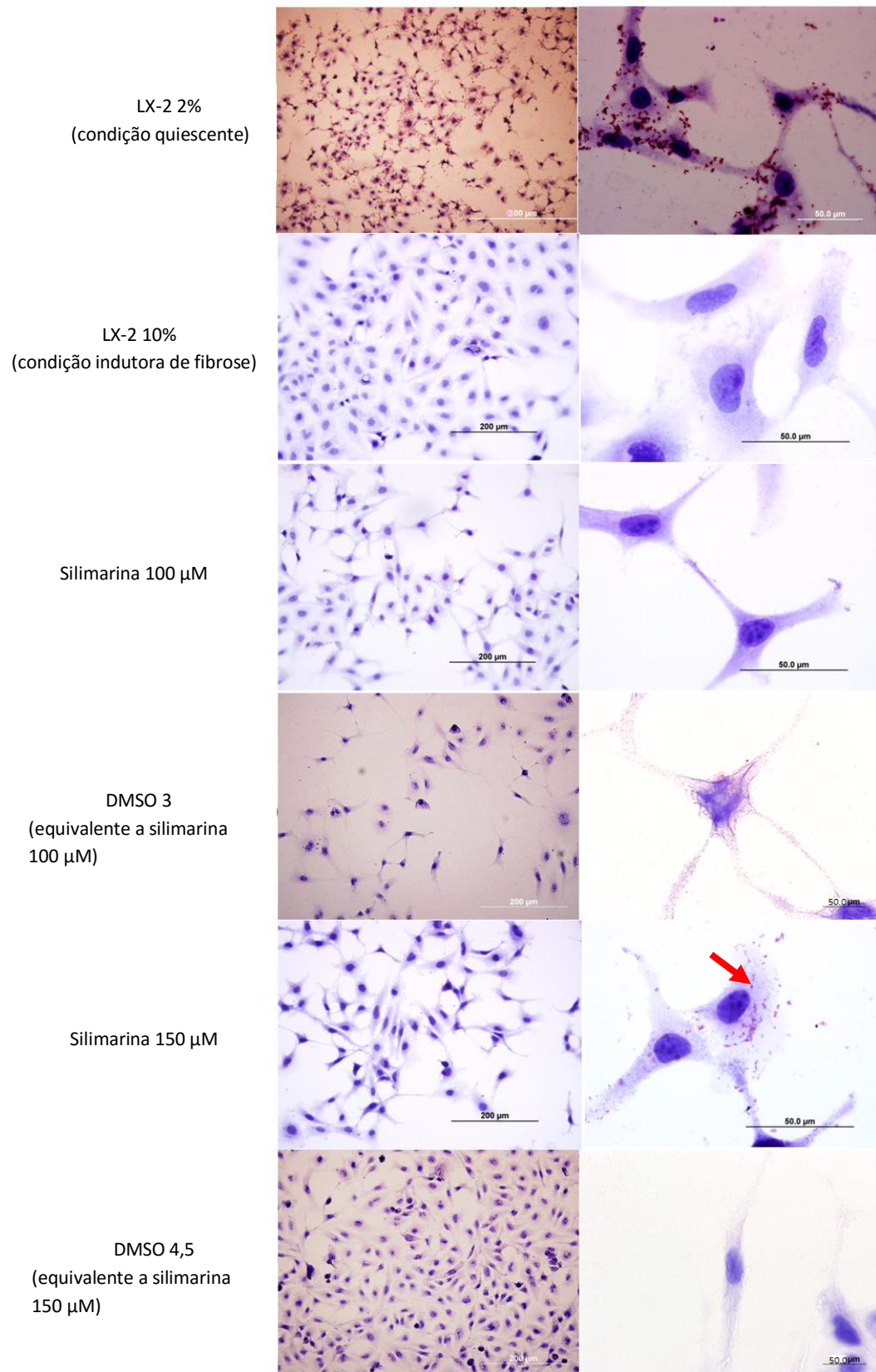
4.2 Análises morfológicas: microscopia de luz

A técnica de microscopia de luz foi utilizada para visualizar e analisar as gotículas de lipídeo, e as alterações morfológicas nas células.

Com esses experimentos foi possível verificar a presença de mudanças nas células tratadas com silimarina, em ambas as condições (100 μM e 150 μM), sendo que as maiores alterações se deram na morfologia das células. As células LX-2 2% (condição quiescente), apresentam um formato estrelado, enquanto células de LX-2 10% (condição de fibrose) demonstram um formato mais irregular. Com a utilização da silimarina, foi possível notar que em ambas as concentrações desse composto, as células retornaram a forma estrelada, compatível com uma célula saudável. Enquanto que nas células em que foram ministradas as doses de DMSO, essas demonstraram formato característico das células fibrosadas (Figura 9).

Outro detalhe que também deve ser observado é a presença das gotículas lipídicas, principalmente na condição de silimarina 150 μM (seta vermelha), o que sugere que ela está atuando diretamente no metabolismo de lipídeos. Revertendo, portanto, outra característica comum da fibrose hepática, que seria a perda das gotículas lipídicas, assim como observado nas células de LX-2 crescidas na presença de 10% de SBF, ao contrário das células de LX-2 crescidas na presença de 2% de SBF (condição quiescente). Por sua vez, a silimarina 100 μM não apresentou gotículas de lipídeo, apenas alterações morfológicas, e nas células tratadas com DMSO, também não houve o aparecimento de lipídeos (Figura 9).

Figura 9: Figura ilustrativa de microscopia de luz de células LX-2 com marcação de Red Oil, núcleo das células corado em roxo e lipídeos em vermelho.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Análises morfológicas: microscopia de fluorescência

As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas a fim de verificar os filamentos de actina presentes no citoesqueleto, os quais atuam nos processos de migração, morfogênese, fagocitose e adesão, bem como o núcleo das células (TOJKANDER, et al., 2012).

Na figura 10, é possível notar a despolimerização dos filamentos de actina (seta verde) nas células em estado quiescente (LX-2 com 2% de SBF), enquanto que para a condição indutora de fibrose (LX-2 com 10% de SBF), os filamentos de actina encontram-se polimerizados (seta amarela), o que retifica os resultados obtidos por Cui, et al. (2014).

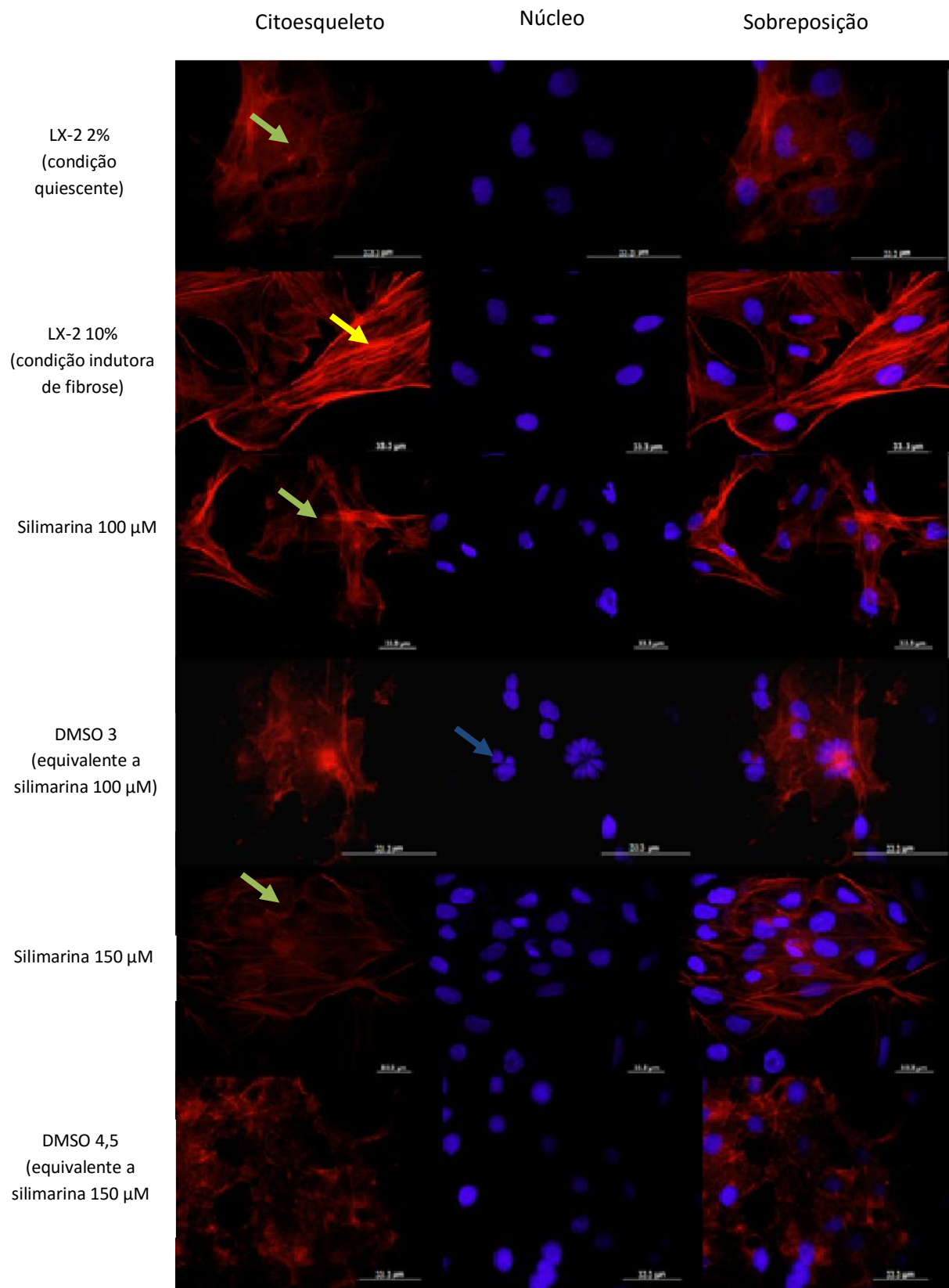
Quando da análise dos resultados obtidos após o tratamento com a silimarina 100 μ M, observa-se uma completa desorganização dos filamentos de actina celular. Partes dos filamentos se apresentam polimerizados e partes com filamentos despolimerizados. Entretanto, quando são analisados os resultados para o tratamento realizado com a quantidade equivalente de solvente (DMSO 3), observa-se uma despolimerização e desorganização dos filamentos de actina ainda maior. Esses resultados, sugerem um forte efeito protetor da silimarina na transdiferenciação celular.

Reforçando as observações acima, novas análises foram realizadas com silimarina 150 μ M. A figura 10 também apresenta os resultados e podemos observar um efeito ainda maior do composto na hepatoproteção. O tratamento com a silimarina 150 μ M não altera a morfologia geral das células e também não apresenta fortes indícios de despolimerização dos filamentos de actina. Quando comparado aos resultados obtidos quando das análises com a concentração de solvente equivalente (DMSO 4,5), observa-se uma completa desorganização estrutural celular. Dessa maneira, o efeito da silimarina é corroborado na sua função hepatoprotetora.

Ao analisar os núcleos celulares, não foi possível notar grandes diferenças morfofisiológicas entre as condições indutoras do quadro de fibrose e a condição quiescente, bem como ao compararmos ambas as condições de silimarina com as células LX-2 2% E LX-2 10%. Porém, ao verificar as células tratadas com DMSO,

algumas mudanças morfológicas nos núcleos foram visualizadas (seta azul), sendo que tenho ocorrido mais provavelmente devido ao estresse sofrido pelas células, do que pelo tratamento em si.

Figura 10: Figura ilustrativa de microscopia de fluorescência de células LX-2 10%, coradas com Faloidina-TRITC, marcando o citoesqueleto e DAPI marcando o núcleo.

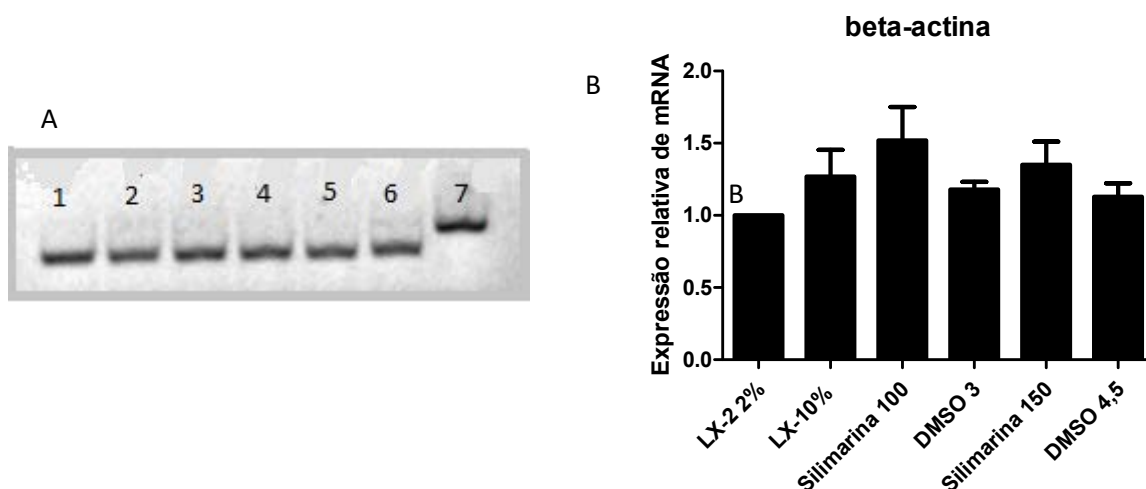


Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Análise molecular de marcadores pró-fibrosantes: PCRs semi-quantitativos

Para se avaliar a expressão de genes e as vias de sinalização correlatos a indução do processo pró-fibrosante ensaios de PCR foram analisados, sendo a análise da expressão do gene da β -actina utilizado como normalizador, considerando-se que esse gene conserva seu padrão de expressão independente do tratamento a que seja submetido. A figura 11 A é uma foto ilustrativa do gel de agarose 1% e a figura 11 B é a representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene de β -actina, permitindo a verificação da qualidade dos mRNA extraídos e da transcrição reversa.

Figura 11: A- Foto ilustrativa do gel de agarose a 1% contendo o produto de PCR do gene β -actina. B- Representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene de β -actina. O gráfico foi plotado no *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.



Legenda: 1- LX-2 2%; 2- LX-2 10%; 3- Silimarina 100 μ M; 4-Silimarina 150 μ M; 5- DMSO 150 μ M 6- DMSO 100 μ M; 7- β -actina. Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez assegurada à qualidade dos transcritos, reações de PCR semi-quantitativa foram realizadas para os demais genes como: α -SMA, *COL1A1*, *CTGF*, *MCP1* e *TGF- β 1*, com o objetivo de analisar qual concentração de silimarina teria efeitos mais positivos ou menos negativos sobre as células de LX-2.

A alfa actina de músculo liso (α -SMA), quando ativada é de grande importância na resposta à fibrose, tanto que durante esse processo há um aumento

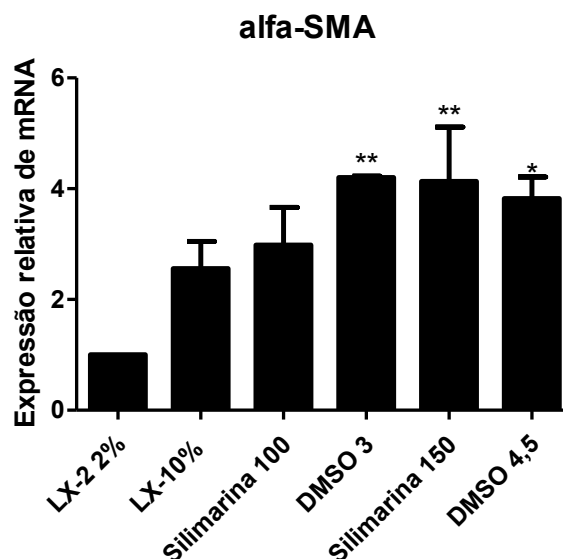
significativo dessa proteína. Sua principal função é atuar para acelerar o processo de reparo das lesões, ao contrair as pontas das áreas traumatizadas (CHERNING, et al., 2008). Além do seu papel na contractilidade, ela também é responsável pela motilidade nas células e auxilia na ativação das HSC em miofibroblastos (ROCKEY, et al., 2013).

No modelo celular estudado, a análise de PCR mostrou que não há diferença estatística entre a condição quiescente e a indutora de fibrose para o gene α -SMA LX-2 crescida em 10% de FBS) e nem alterações significativas na expressão do gene foram observadas entre a condição quiescente e o tratamento com a silimarina 100 μ M. Entretanto, são verificadas, diferenças estatísticas entre a condição mantenedora de quiescência e as demais condições de cultivo celular. Com esse resultado, podemos inferir que a silimarina na concentração de 100 μ M está sendo capaz de proteger a células de maiores agressões, pois controla os níveis de expressão de α -SMA diferentemente das demais análises. Em conjunto, esse resultado sugere que a concentração de 100 μ M está buscando reverter os os níveis do mRNA α -SMA e o quadro fibrosante.

Com relação a concentração de silimarina 150 μ M, é possível visualizar que há diferenças estatísticas entre ela e a condição quiescente. Enquanto que comparada com a condição indutora de fibrose, essa diferença estatística desaparece. Nota-se também diferenças estatísticas entre a condição LX-2 2% e DMSO 4,5 (211,2 mM), concentração equivalente a encontrada na silimarina 150 μ M, sendo essa diferença estatística é menos exacerbada que a condição da silimarina 150 μ M.

Com isso podemos inferir que a silimarina 100 μ M tem potencial de reversão da fibrose enquanto a silimarina 150 μ M agrava o problema, porém uma hipótese é de que esse possível efeito negativo da silimarina 150 μ M se deva ao DMSO, que ele estaria impedindo a real ação da silimarina (Figura 12).

Figura 12: Representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene α -SMA em células tratadas com silimarina nas condições de 100 μ M e 150 μ M, assim como seus controles positivos. O gráfico foi plotado no *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde *** p <0.0005, ** p <0.005, * p <0.05.

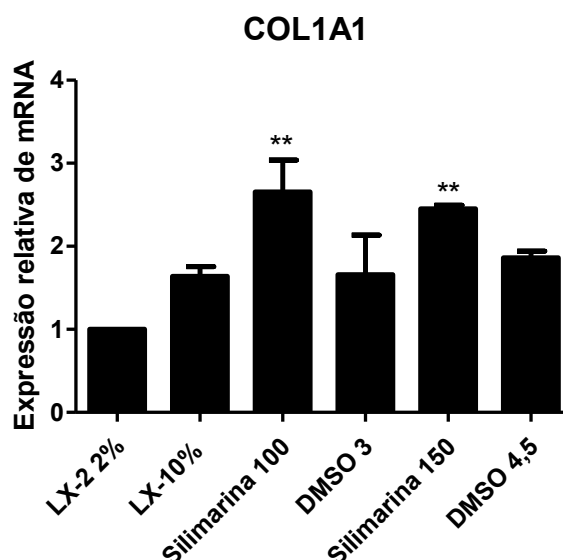


Fonte: Elaborada pela autora.

O gene de colagenase tipo 1 alfa 1 de cadeia (*COL1A1*), é o componente da MEC que aparece em maior quantidade e serve como indicador da gravidade da fibrose hepática. Ele é ativado após a ativação das HSC, numa tentativa de parar ou diminuir a fibrose hepática (ZHANG, et al. 2014).

Ao analisar a PCR do gene *COL1A1*, podemos inferir que não há diferenças estatísticas entre as condições LX 2-2% e LX 2- 10%. Além disso, pode-se dizer que há uma grande diferença estatística entre a condição de LX 2-2% e os tratamentos com silimarina 100 μ M e 150 μ M, que é independente do DMSO, considerando-se que não ocorre alteração na expressão do gene *COL1A1* quando do tratamento (Figura 13).

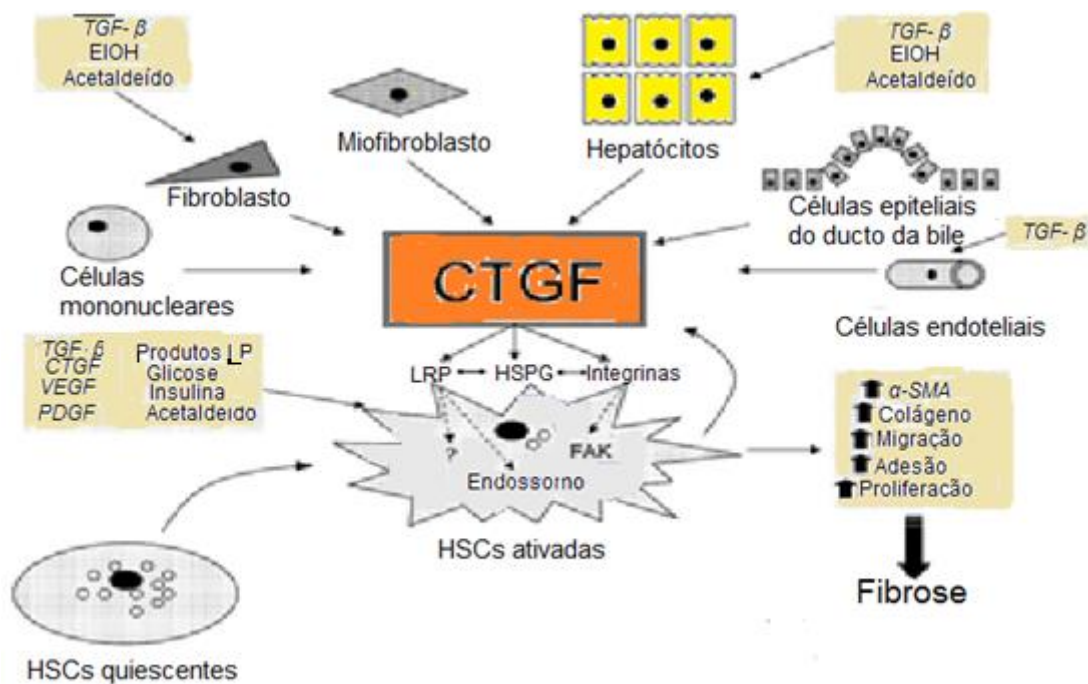
Figura 13: Representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene *COL1A1* em células tratadas com silimarina nas condições de 100 μ M e 150 μ M, assim como seus controles positivos. O gráfico foi plotado no *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnett*, onde *** p <0.0005, ** p <0.005, * p <0.05.



Fonte: Elaborada pela autora.

O fator de crescimento do tecido conectivo (*CTGF/CCN2*) pode ser produzido pelas HSCs como uma das consequências de seu estado de ativação, sendo encontrado no Golgi e secretado para o meio. O *CTGF* está intimamente ligado com a fibrose, sendo a sua expressão cerca de 6-8 vezes maior em fígados com cirrose, além de serem utilizados como localizador da doença (CHEN, et al., 2004). Além disso, ele está envolvido com diversos processos, como a adesão celular, migração, proliferação, angiogênese, desenvolvimento do esqueleto e reparo de lesões no tecido (CHEN, et al., 2004). Ele também induz a síntese e a secreção de proteínas da MEC, induz a diferenciação de MFB e aumenta a síntese de colágeno (BRIGSTOCK, 2009). Ele também tem relação direta com o *TGF- β* (LEASK, et al., 2006), tendo como resultado final a indução da fibrose e a exacerbação da produção de MEC (CHEN, et al., 2004). A Figura 14 ilustra as principais vias de atuação do *CTGF*.

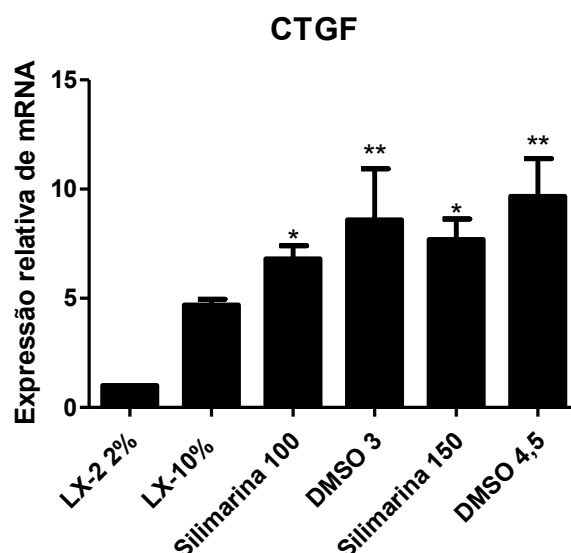
Figura 14: Caminho de ativação e produção de *CTGF/CCN2* na fibrose hepática. *CTGF/CCN2* se liga a LRP e integrinas na superfície celular de HSC. Essa ligação de *CTGF/CCN2* com integrinas resulta numa cascata de sinais que leva a proliferação, adesão, motilidade e síntese de colágenos. *CTGF/CCN2* também está envolvido com interações de ligação de outras moléculas fibrogênicas, como *TGF- β* e *PDGF*.



Fonte: Rachfal, et al., 2003 adaptado

A análise da PCR, demonstrou que em relação à condição considerada controle (LX-2 -2%), a adição de silimarina a 100 μ M ou 150 μ M, assim como a adição de diferentes concentrações de DMSO apresentam aumento na expressão desse marcador de processo fibrosante. A análise conjunta, entretanto, sugere que a alteração da expressão gênica deve-se ao DMSO e não aos extratos (Figura 15).

Figura 15: Representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene *CTGF* em células tratadas com silimarina nas condições de 100 μ M e 150 μ M, assim como seus controles positivos. O gráfico foi plotado no *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

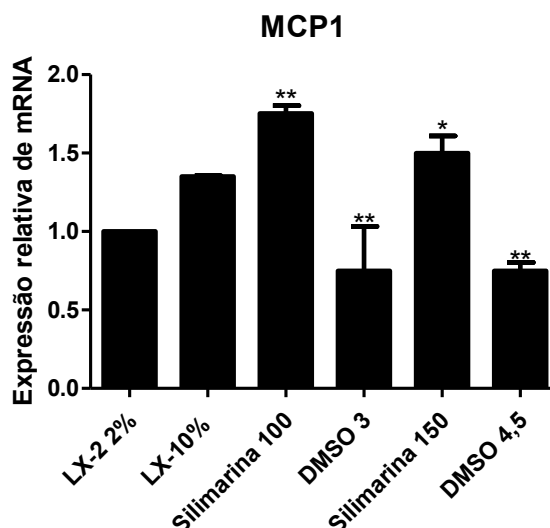


Fonte: Elaborada pela autora.

A proteína quimiotática de monócitos 1 (*MCP1/CCL2*), é secretada pelas HSC ativadas e é regulada pelas células de Kupffer, sendo sua produção estimulada por trombinas, IL-1 α , interferon- γ e fatores de necrose de tecido (TNF)- α . Elas são responsáveis por recrutar e ativar monócitos, leucócitos, células T e basófilos para o local das lesões, além disso, regulam a adesão de moléculas e citocinas próinflamatória e geram produção de ROS. Elas também podem levar ao acúmulo de lipídeos (PINZANI, et al., 2004; SEKI, et al., 2009; MANDREKAR et al., 2011).

Ao examinar a PCR, nota-se que não há diferenças estatísticas entre as condições quiescente e indutora do quadro fibrosante. Ao se comparar a condição quiescente com as concentrações de silimarina de 100 μ M e 150 μ M, observa-se um aumento significativo na expressão dos genes que é independente da concentração de DMSO utilizada (Figura 16) sugerindo a presença de um ambiente de estresse celular e/ ou início de processo inflamatório decorrente da utilização do extrato.

Figura 16: Representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene *MCP1* em células tratadas com silimarina nas condições de 100 μ M e 150 μ M, assim como seus controles positivos. O gráfico foi plotado no *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

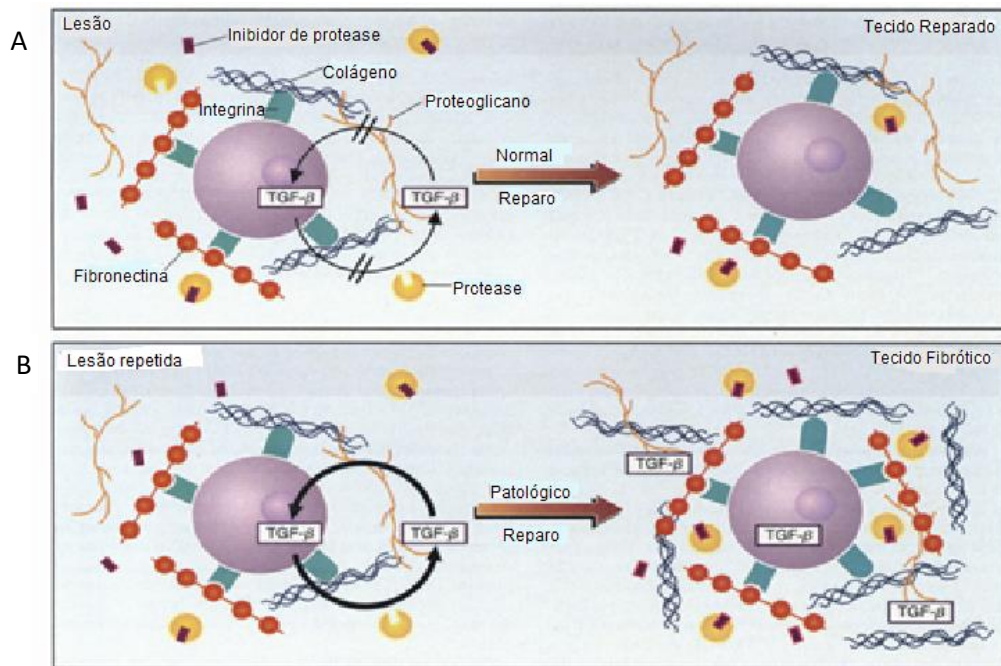


Fonte: Elaborada pela autora.

O fator de crescimento transformador beta 1 (*TGF- β 1*) é considerado uma citocina clássica da fibrose. Ele é secretado por células Kupffer em seu modo inativo e depois é ativado na superfície celular por mecanismos ainda desconhecidos. Lesões repetidas induzem a produção de *TGF- β 1* o que ocorrendo com uma determinada frequência desregula o sinal de término e cria uma superprodução de *TGF- β 1* (BORDER et al., 1994). A figura 17 apresenta a ação do *TGF- β 1* em situação normal de reparo e em situação de lesões repetidas, que leva a fibrose.

O *TGF- β 1* é responsável pela diferenciação das células estreladas em miofibroblastos, estimulando a sua transformação de forma paracrina e ajuda a manter esse fenótipo por alimentação autócrina positiva (OLIVEIRA, 2009). Estimula também a transcrição de colágeno nas células estreladas através de um mecanismo dependente de peróxido de hidrogênio e proteínas intensificadoras de ligação CCAAT(C/EBP β) (FRIEDMAN,2008). Além do colágeno, ele aumenta a produção de diversas outras proteínas da MEC. Contribui também para o acúmulo da MEC através da inibição da expressão de metaloproteínas de matriz (MMP) e collagenases e estimulando a expressão da enzima inibidora de MMP (ARROYO, et al., 2011).

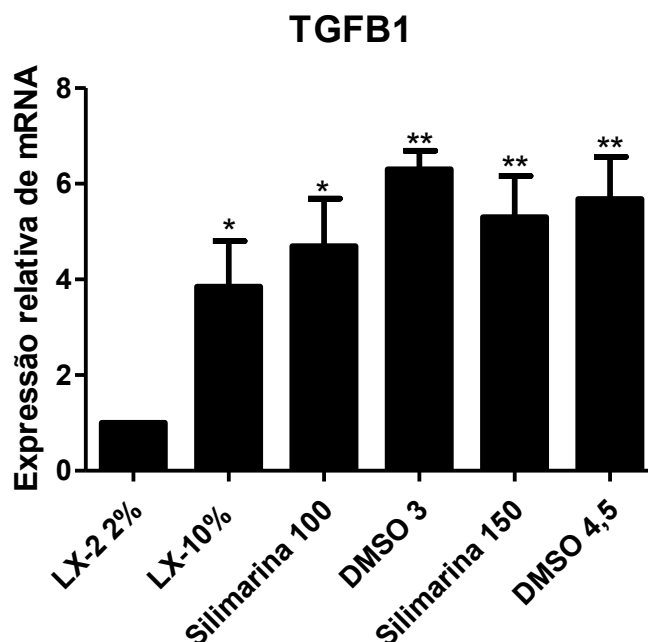
Figura 17: Superprodução de *TGF- β 1* na fibrogênese. A- Condição normal de reparo do tecido, com produção normal de *TGF- β 1*. B- Lesões repetidas, o que gera a produção exagerada de *TGF- β 1*, resultando na fibrose.



Fonte: Border, et al. 1994, adaptado.

A PCR do gene *TGF- β 1*, assim como a dos demais genes até então estudados, demonstra que não existe diferença estatística entre a condição quiescente e a condição mantenedora do quadro fibrosante. A análise do resultado demonstra aumento na expressão do gene em todas as condições investigadas, quando da comparação com as células cultivadas em condição quiescente, sugerindo que o aumento da expressão se deve ao próprio mecanismo indutor de fibrose (meio contendo 10% de SBF) e independente do DMSO e /ou silimarina (Figura 18).

Figura 18: Representação gráfica dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene *TGF- β 1* em células tratadas com silimarina nas condições de 100 μ M e 150 μ M, assim como seus controles positivos. O gráfico foi plotado no *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde *** p <0.0005, ** p <0.005, * p <0.05.



Fonte: Elaborada pela autora.

5 Conclusão

A fibrose hepática é um grave problema de saúde mundial, chegando no Brasil a 6,9 óbitos/ 100 mil habitantes, com números que tendem a crescer anualmente. Apesar do alto grau de mortalidade e de várias novas pesquisas que vem sendo desenvolvidas, ainda não há uma forma de tratamento eficaz contra essa doença nem contra a cirrose (estado mais avançado da fibrose). Essa doença se desenvolve devido a repetidas lesões no fígado, gerando desregulação na cicatrização do tecido afetado, com isso novos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de tratar essa doença, como o uso de antivirais, metotrexano e ácido ursodeoxicólico e corticoesteróides (MAIA, 2009), cada um dos diferentes tratamentos para os diferentes tipos da doença, porém, essas pesquisas ainda carecem de muitos estudos a fim de validá-los como tratamentos eficazes contra os problemas hepáticos. Dessa forma, considerando-se a necessidade de novas terapias, o estudo com a silimarina, uma droga de origem natural, torna-se extremamente relevante na tentativa de encontrar uma solução para essa patologia.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a silimarina em ambas as condições estudadas, apresentam aspectos positivos na reversão da fibrose hepática. Nas análises de microscopia de luz, as células LX-2 crescidas em 10% de SBF tratadas com silimarina na concentração de 100 μ M, bem como as células LX-2 crescidas em 10% de SBF tratadas com silimarina na concentração de 150 μ M, apresentaram a reversão da morfologia característica de células lesionadas, apresentando um formato estrelado, compatível com uma célula saudável. Outro ponto importante, foi de que as células tratadas com DMSO, em ambas as concentrações correspondentes com as silimarinas, demonstraram as características das células sob completo estresse celular, considerando-se as significativas alterações na morfologia celular, diferentemente do padrão morfológico encontrados nas células tratadas com a silimarina (previamente dissolvida em DMSO). Dessa maneira, os resultados sugerem que a silimarina está protegendo as células contra os efeitos negativos causados pelo DMSO. Destaca-se também a presença das gotículas de lipídeos nas células tratadas com silimarina 150 μ M, corroborando ainda mais com a hipótese de que a silimarina estaria ajudando a reverter o quadro fibrosante.

As microscopias de fluorescência, também apresentam um quadro favorável ao uso da silimarina. Células LX-2 crescidas em 10% de SBF tratadas com silimarina demonstram uma crescente despolimerização dos filamentos de actina, sendo que essa despolimerização atinge seu pico com as células tratadas com silimarina na concentração de 150 μ M, enquanto que nos tratamentos com as concentrações respectivas de DMSO, essa despolimerização é desorganizada. Mudanças nos núcleos das células também foram verificadas nos tratamentos com DMSO, demonstrando ainda mais a citotoxicidade desse composto.

Quanto os resultados do nível de expressão gênica, os genes correlatos à fibrose hepática, quando tratados com silimarina apresentam variações quanto a eficácia do extrato. Quanto ao gene α -SMA, o qual é responsável pela contração das pontas nas áreas traumatizadas (CHERNG, et al., 2008), a silimarina na concentração de 100 μ M, indica um efeito positivo do extrato e a silimarina 150 μ M, apesar de a priori levar a crer que está causando um efeito negativo, ao analisar os dados de DMSO é possível verificar que esse efeito aparentemente negativo da silimarina 150 μ M, pode estar sendo causado por ele. Outro gene em que essa

mesma situação ocorre, é o gene *CTGF*, indutor da síntese e da secreção de proteínas da MEC, indutor da diferenciação de MFB e aumento da síntese de colágeno (BRIGSTOCK, 2009). Como ocorreu no gene α -SMA, a silimarina 100 μ M e 150 μ M, demonstraram um efeito aparentemente negativo, porém como avaliado no gene descrito anteriormente, isso pode estar relacionado à toxicidade do DMSO e não ao extrato.

No entanto, ao analisar os genes *COL1A1*, responsável por diminuir a fibrose hepática (ZHANG, et al. 2014) e o gene *MCP1*, responsável pelo recrutamento e ativação dos monócitos, leucócitos, células T e basófilos para o local das lesões, além de regular a adesão de moléculas e citocinas próinflamatória e geram produção de ROS (PINZANI, et al., 2004; SEKI, et al., 2009; MANDREKAR et al., 2011), verifica-se um efeito negativo no tratamento das células feito com ambas as concentrações de silimarina, sendo que esse resultado não pode ser causado pelo DMSO, já que esse ao ser comparado com a célula na condição quiescente apresenta uma discrepância estatística menos acentuada que a sua respectiva concentração de silimarina.

Quanto ao gene *TGF- β 1*, responsável pela diferenciação das células estreladas em miofibroblastos (OLIVEIRA, 2009), a silimarina e o DMSO não estão afetando negativamente a reversão da fibrose, pois ocorre um aumento na expressão do gene em todas as condições investigadas, o que sugere que o aumento da expressão se deve ao próprio mecanismos indutor de fibrose.

Em síntese, é possível avaliar que ambas as concentrações de silimarina apresentam pontos favoráveis, porém, aparentemente, a silimarina na concentração de 150 μ M estaria desempenhando um papel mais esperançoso no tratamento da fibrose hepática, pois, além de reorganizar o citoesqueleto, estaria também atuando no mecanismo de lipídeos.

Novos estudos sobre a atuação da silimarina na reversão da fibrose hepática são de grande interesse científico, uma vez que aparentemente a silimarina teria a capacidade de melhorar o quadro de fibrose e até levar a uma possível reversão desse quadro.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J.D (1997). **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Porto Alegre/RS: Editora Artes Médicas.
- Alcoolismo e cirrose alcoólica. Disponível em <http://pt.slideshare.net/mrmattos/alcoolismo-e-cirrose-alcolica> acesso em 28 de julho de 2016.
- ALVES, C. Perfil clínico-epidemiológico da cirrose, 2013.
- ANDRADE, Z. et al. Regressão da fibrose hepática. 2005.
- ANTÔNIO, H.; DOS SANTOS, M. A. T. A. Efeitos da silimarina na fase aguda da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*.
- ARROYO, J. et al. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. In: **Anales de la Facultad de Medicina**. UNMSM. Facultad de Medicina, 2012. p. 85-91.
- ARROYO, M.; NAZAR, R. Rol de TGF- β 1 en la fibrosis de la piel inducida por radioterapia en cáncer de cabeza y cuello.
- ASSIS JÚNIOR, E. Efeito protetor da silimarina sobre a esteato-hepatite não alcoólica experimental induzida por irinotecano. 2014.
- ASSIS, M. F. L. et al. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cad. saúde colet.,(Rio J.)**, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.
- BITKO, V.; GARMON, N. E.; CAO, T.; ESTRADA, B.; OAKES, J. E.; LAUSH, R. N.; BARIK, S. Activation of cytokines and nf-kappa b in corneal epithelial cells infected by respiratory syncytial virus: potencial relevance in ocular inflammation and respiratory infection. **BMC Microbiology**. v. 4, n. 28, p. 1 - 11, 2004.
- BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 19, p. 1286-1292, 1994.
- BOSISIO, E.; BENELLI, C.; PIROLA, O. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. **Pharmacological Research**, v. 25, n. 2, p. 147-159, 1992.
- BIERNACKA, A.; DOBACZEWSKI, M.; FRANGOGIANNIS, N. G. TGF- β signaling in fibrosis. **Growth factors**, v. 29, n. 5, p. 196-202, 2011.
- BRIGSTOCK, D. R. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. **Journal of cell communication and signaling**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2010.
- BRIGSTOCK, D. R. Strategies for blocking the fibrogenic actions of connective tissue growth factor (CCN2): From pharmacological inhibition in vitro to targeted siRNA therapy in vivo. **Journal of cell communication and signaling**, v. 3, n. 1, p. 5-18, 2009.

CASTRO, C. Avaliação do efeito anti-inflamatório da silibinina sobre monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, infectados in vitro com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*. 2009.

CESARINO, V. Avaliação do efeito antiinflamatório da silimarina em linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para a máxima e mínima resposta inflamatória aguda. 2010.

CHEN, Y. et al. CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 12, p. 5635-5646, 2004.

CHERNG, S.; YOUNG, J.; MA, H. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). **J Am Sci**, v. 4, n. 4, p. 7-9, 2008.

COMINETTI, M. R. Cultura celular. **Associação Ampla UFSCar/UNESP**, 2010.

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

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. (1991) Micropropagation in: Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H. (eds). **Micropropagation: Technology and Application**. London, Kluwer Acad. Publishers;

DIXIT, N. et al. Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. **Indian journal of pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 172, 2007.

FERREIRA, A. Hepatotoxicidade: há evidências para o uso de hepatoprotetores?. **Reunião com Expertos em Hepatotoxicidade da Sociedade Brasileira de Hepatologia: Analgésicos, Antitérmicos, Insumos Vegetais, Fitoterápicos, Homeopáticos e AINEs**, v. 30, n. Supl 1, p. 06-47, 2011.

FLORA, K. et al. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 93, n. 2, p. 139-143, 1998.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. **Wiley – Liss**, 4. ed., 2000. 577p.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008.

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

GEOFFREY M. C.: **The Cell, a molecular approach**; second edition;

GONÇALVES, D.; FERNANDES, F.; OLIVEIRA, H.; CARMESIM, I.; TEIXEIRA, L. Cultura celular. **Faculdade de Medicina Universidade do Porto**. 2005.

GOTTLIEB, O. R. Lignóides de plantas amazônicas: investigações biológicas e químicas. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 333-344, 1988.

GRESSNER, O. A.; GAO, C. Monitoring fibrogenic progression in the liver. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, p. 111-122, 2014.

GURLEY, B. J. et al. Effect of milk thistle (*Silybum marianum*) and black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 34, n. 1, p. 69-74, 2006.

GUTIÉRREZ-RUIZ, M. et al. Liver fibrosis: searching for cell model answers. **Liver International**, v. 27, n. 4, p. 434-439, 2007.

HENDERSON, N. C.; IREDALE, J. P. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. **Clinical Science**, v. 112, n. 5, p. 265-280, 2007.

HIKINO, H. et al. Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits. **Planta medica**, v. 50, n. 03, p. 248-250, 1984.

JÚNIOR, H. Silimarina. **Diagn Tratamento**. 2012.

KIM, N. et al. Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). **Organic & biomolecular chemistry**, v. 1, n. 10, p. 1684-1689, 2003.

KOBUNE, F.; SAKATA, H.; SUGIURA, A. Marmoset lymphoblastoid cell as a sensitive host for isolation of measles virus. *Journal of Virology*. v. 64, n. 2, p. 700 - 705, 1990.

LEASK, A.; ABRAHAM, D. J. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. **Journal of cell science**, v. 119, n. 23, p. 4803-4810, 2006.

MACIEL C. ELF teste – um novo biomarcador sanguíneo ara avaliação de fibrose hepática. 2014.

MAIA, J. Ativação das células hepáticas estreladas e fibrose hepática em crianças portadoras de hepatite autoimune tipo 1: estudo imuno-histoquímico de biópsias hepáticas pareadas antes do tratamento e após a remissão clínica. 2009.

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

MENG, F. et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 765-776. e3, 2012.

MIGITA, N. A. Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012.

MOLLOY, J. W. et al. Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 429-436, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, S. L. A. Análise de elementos moduladores dos níveis da enzima COX-2 em células H9c2 infectadas com *Trypanosoma cruzi*; cepa Berenice-62. 2014.

OLIVEIRA, F. dos S. A contribuição do fator transformador de crescimento beta 1-TGF- β 1 na fibrose hepática: estudos in vivo e in vitro. 2009.

PALMERI, M. L. et al. Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis using acoustic radiation force-based shear stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 3, p. 666-672, 2011.

PARKER, R. C. Methods of tissue culture. 3. ed. **New York: Medical Division of Harper & Brothers, Copyright**, 1961. 358 p.

PINZANI, M.; ROMBOUTS, K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. **Digestive and liver disease**, v. 36, n. 4, p. 231-242, 2004.

RACHFAL, A. W.; BRIGSTOCK, D. R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. **Hepatology research**, v. 26, n. 1, p. 1-9, 2003.

RAJALA, M. S.; RAJALA, R. V. S.; ASTLEY, R. A.; BUTT, A. L.; CHODOSH, J. Corneal cell survival in adenovirus type 19 infection requires phosphoinositide 3-kinase/ akt activation. **Journal of Virology**. v. 79, n. 19, p. 12332 - 12341, 2005.

ROCKEY, D. C.; WEYMOUTH, N.; SHI, Z. Smooth muscle α actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77166, 2013.

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

SEKI, E. et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 50, n. 1, p. 185-197, 2009.

SHAKER, E.; MAHMOUD, H.; MNAA, S. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 803-806, 2010.

SONNENBICHLER, J. et al. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle Silybum marianum on kidney cells. **Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 3, p. 1375-1383, 1999.

STRACHAN, T. ; ANDREW P. Read Human: *Molecular Genetics*; **BIOS Scientific Publishers Limited**; 1996; USA

TAKEDA PHARMA LTDA. Silybum marianum (Compositae), fruto (silimarina). Disponível em: <http://www.takedabrasil.com/~media/Countries/br/Files/PDFs/bulas/bulas_para_profissionais_de_saude/legalon_profissional_de_saude.pdf> Acesso em: 13 de junho de 2016.

VAN DE BOVENKAMP, M. et al. Liver fibrosis in vitro: cell culture models and precision-cut liver slices. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 4, p. 545-557, 2007.

VENUGOPAL, S. K. et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 1, p. G101-G106, 2010.

WANG, B. et al. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 421, n. 1, p. 4-8, 2012.

WASLEY, G. D.; MAY, J. W. Animal cell culture methods. 1. ed., **Oxford: Blackell Scientific Publication**, 1970. 194 p.

WIJAYAGUNAWARDANE, M.; WIJERATHNE, C.; HERATH, C. Indigenous Herbal Recipes for Treatment of Liver Cirrhosis. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 270-276, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health**. World Health Organization, 2014.

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

ZHANG, W. et al. [Construction and validation of a dual-luciferase reporter gene system for screening and evaluating anti-liver fibrosis drugs that inhibit transcription of the gene encoding collagen I, chain $\alpha 1$]. **Zhonghua gan zang bing za zhi= Zhonghua ganzangbing zazhi= Chinese journal of hepatology**, v. 22, n. 10, p. 747-751, 2014.

Orientada: Fernanda Rangel Gonçalves

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