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

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

CAIO MATEUS DA SILVA

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

Abril - 2019

CAIO MATEUS DA SILVA

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

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

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro

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

Rio Claro – SP

Abril – 2019

S586a

Silva, Caio Mateus da

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

71 f. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

ERRATA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: CAIO MATEUS DA SILVA

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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



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



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



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

Rio Claro, 27 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

PBS: tampão salino-fosfatado

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGF β R: receptor β de PDGF

PPAR: proliferador de peroxissomo

SBF: soro bovino fetal

SREBP-1: fator de transcrição regulador de esteróis

TGF- β : fator de crescimento transformador β

TIMPs: Inibidores de metaloproteinases

TRAIL: receptores de morte como o ligante indutor de apoptose

α -SMA: alfa-actina de músculo liso

SUMÁRIO

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

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

Referências	55
--------------------------	-----------

CAPÍTULO II. Silimarina retorna metabolismo de lipídeos à homeostase em co-cultivo de células hepáticas (HepG2) e CEHs (LX-2) controlando efeito de acúmulo de ácidos graxos ocasionado pelo DMSO	60
--	-----------

Resumo	60
---------------------	-----------

Abstract.....	61
----------------------	-----------

1. Introdução	62
----------------------------	-----------

2. Métodos	63
-------------------------	-----------

3. Resultados	64
----------------------------	-----------

3.1 LX-2 modula o metabolismo lipídico do co-cultivo: silimarina e DMSO possuem efeitos antagônicos	64
---	----

3.2 Silimarina retorna atividade transcricional à homeostase no co-cultivo	64
--	----

4. Discussão	65
---------------------------	-----------

Legenda da Figura.....	67
-------------------------------	-----------

Figura.....	68
--------------------	-----------

Referências	69
--------------------------	-----------

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
----------------------------------	-----------

INTRODUÇÃO

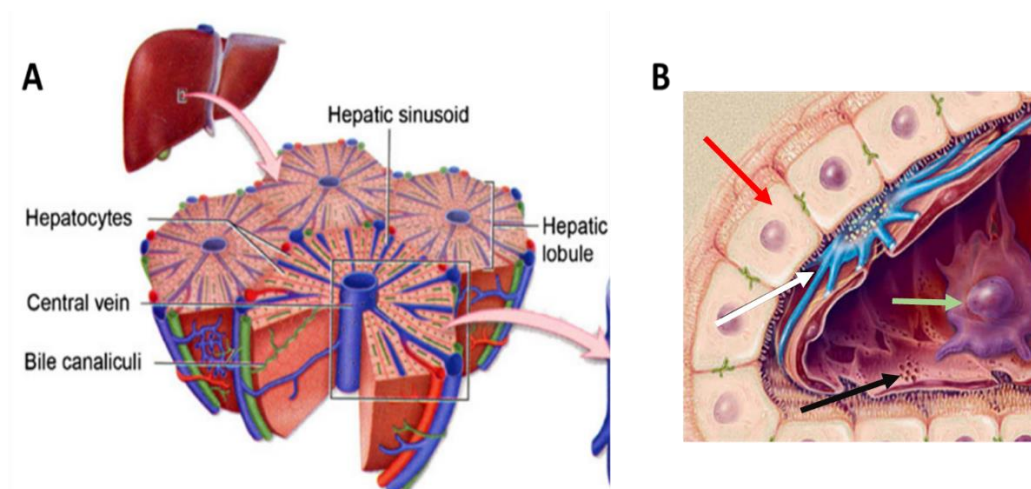
1.1 O fígado e sua arquitetura celular

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

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

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

Figura 1 – Representação histológica do fígado



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

1.2 Fibrose hepática e seus elementos

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

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

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

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

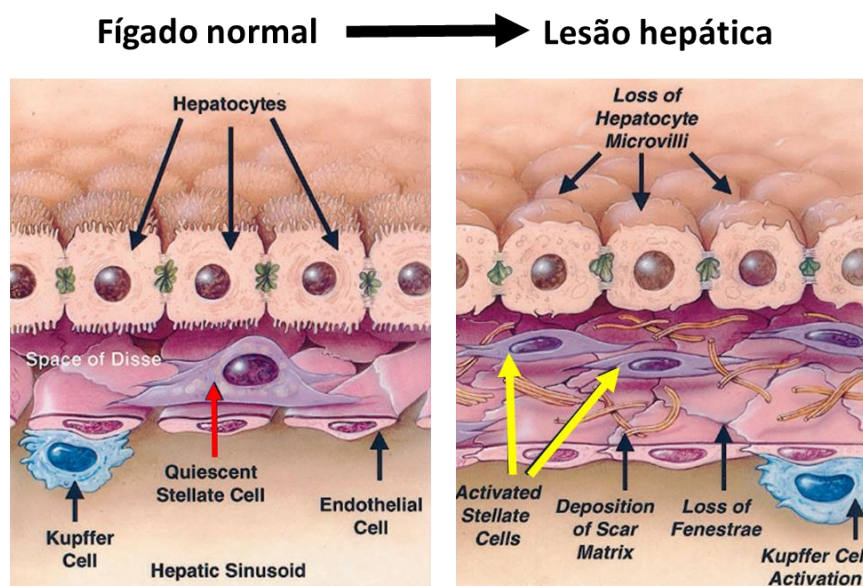
A instalação do processo fibrótico faz com que as diversas células hepáticas respondam de maneira diferenciada aos estímulos que culminam no dano no tecido hepático. Após lesões hepáticas, o processo de recuperação do órgão estimula os hepatócitos mantidos em fase G0 a elevar suas taxas de proliferação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

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

1.3 Células estreladas hepáticas e seu processo de ativação

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

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



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

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

Durante a fase de perpetuação, as CEHs alteram de maneira sistêmica seu comportamento celular, tornando-se células mais contráteis, proliferativas e sintetizadoras (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Nesse processo de fibrogênese, o colágeno é o principal componente depositado pelas CEHs e é controlado por uma família de genes como *col1a1* e *col1a2*. Ainda nesse contexto, em um fígado saudável há um controle na deposição e degradação de compostos da MEC, através de uma família de proteínas denominadas metaloproteinases (MMP) e de proteínas que inibem suas atividades (TIMPs). Durante a lesão hepática, além da deposição do

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

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

1.4 Células estreladas hepáticas na resolução da fibrose

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

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

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

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

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

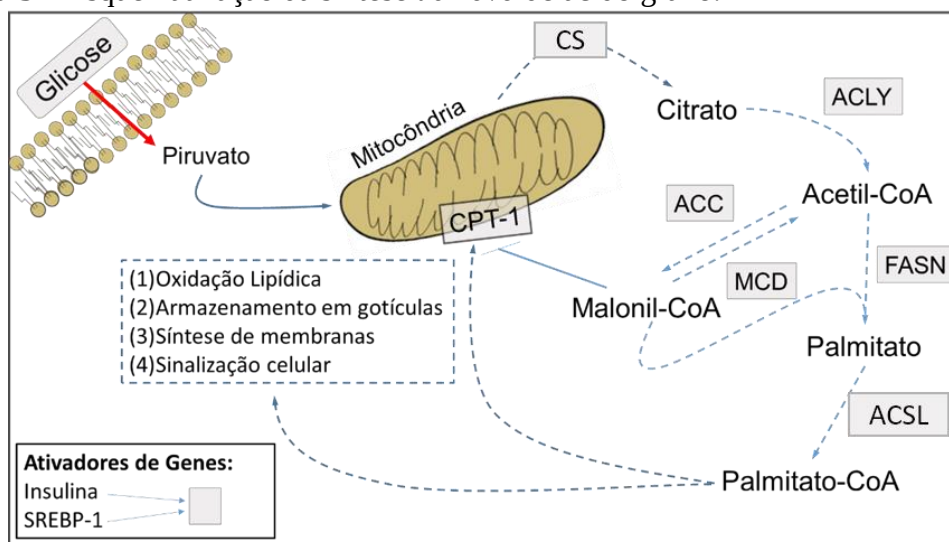
O metabolismo de lipídeos se apresenta como uma maneira complementar para as CEHs obter energia para seu processo de ativação durante estímulos fibrogênicos. Nesse tópico, será aprofundada a discussão sobre o metabolismo de lipídeos, de sua síntese à oxidação. Além disso, é demonstrado resumidamente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

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

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

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

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

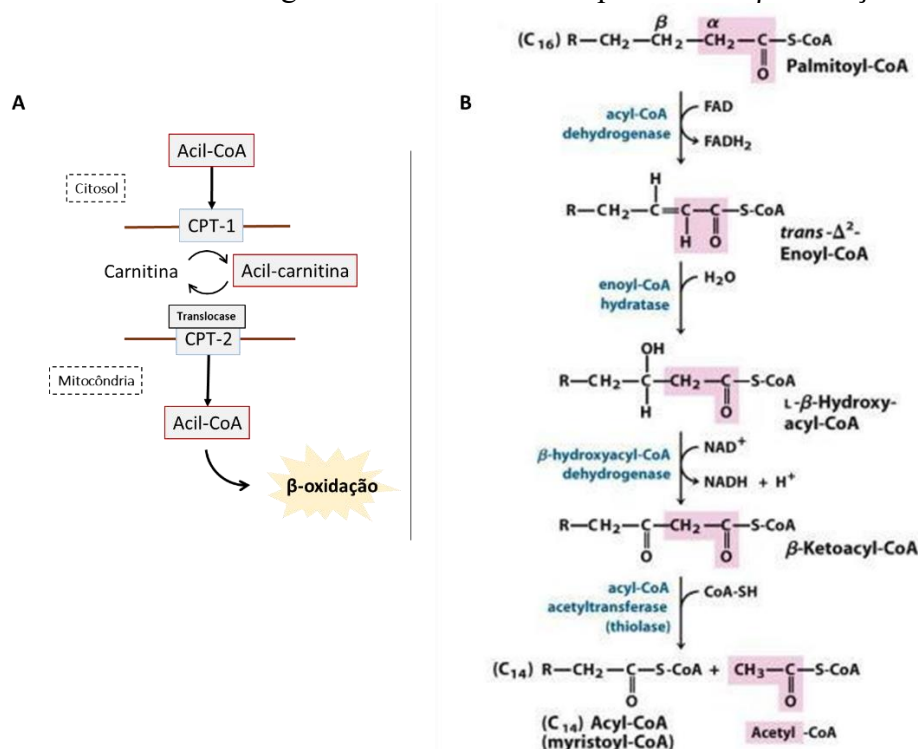


O citrato, derivado da mitocôndria é convertido em acetil-CoA e transformado em malonil-CoA. A enzima FASN é responsável pela síntese dos ácidos graxos, gerando palmitato. CS: citrato sintase; ACLY: ATP citrato liase; ACC: acetil-CoA carboxilase; MCD: malonil-CoA carboxilase; CPT-1: carnitina palmitoil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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Fonte: Site Ervanarium

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

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

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

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

Referências

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

CONG, M.; IWAISAKO, K.; JIANG, C.; KISSELEVA, T. Cell signals influencing hepatic fibrosis. **International Journal of Hepatology**, p. 1–18, 2012.

D'AMBROSIO, D. N. Physiology and pathophysiology of retinoid and lipid storage in mouse hepatic stellate cell lipid droplets. **Columbia University Academic Commons**, 2011.

DAS, N.; MANDALA, A.; NAAZ, S.; GIRI, S.; JAIN, M.; BANDYOPADHYAY, D.; REITER, R. J.; ROY, S. S. Melatonin protects against lipid-induced mitochondrial dysfunction in hepatocytes and inhibits stellate cell activation during hepatic fibrosis in mice. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 4, p. e12404, 2017.

DE LUCA, V.; SALIM, V.; ATSUMI, S. M.; YU, F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658–1661, 2012.

DU, K.; HYUN, J.; PREMONT, R. T.; CHOI, S. S.; MICHELOTTI, G. A.; SWIDERSKA-SYN, M.; DALTON, G. D.; THELEN, E.; RIZI, B. S.; JUNG, Y.; DIEHL, A. M. Hedgehog-YAP signaling pathway regulates glutaminolysis to control activation of hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 154, n. 5, p. 1465–1479, 2018.

EL-AGROUDY, N. N.; EL-NAGA, R. N.; EL-RAZEQ, R. A.; EL-DEMERDASH, E. Forskolin, a hedgehog signalling inhibitor, attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 22, p. 3248–3260, 2016.

EL TAGHDOUINI, A.; NAJIMI, M.; SANCHO-BRU, P.; SOKAL, E.; VAN GRUNSVEN, L. A. In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 8, n. 1, p. 14, 2015.

ELLIS, E. L.; MANN, D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1171–1180, 2012.

EZHILARASAN, D.; EVRAERTS, J.; BRICE, S.; BUC-CALDERON, P.; KARTHIKEYAN, S.; SOKAL, E.; NAJIMI, M. Silibinin inhibits proliferation and migration of human hepatic stellate LX-2 cells. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, p. 1–8, 2016.

EZHILARASAN, D.; EVRAERTS, J.; SID, B.; CALDERON, P. B.; KARTHIKEYAN, S.; SOKAL, E.; NAJIMI, M. Silibinin induces hepatic stellate cell cycle arrest via enhancing p53/p27 and inhibiting Akt downstream signaling protein expression. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v. 16, n. 1, p. 80–87, 2017.

FARZAEI, M.; ZOBEIRI, M.; PARVIZI, F.; EL-SENDUNY, F.; MARMOUZI, I.; COY-BARRERA, E.; NASERI, R.; NABAVI, S.; RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 855, 2018.

FEDERICO, A.; DALLIO, M.; LOGUERCIO, C. Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

FENG, B.; MENG, R.; HUANG, B.; SHEN, S.; BI, Y.; ZHU, D. Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. **Free Radical Research**, v. 50, n. 3, p. 314–327, 2016.

FERENCI, P.; SCHERZER, T. M.; KERSCHNER, H.; RUTTER, K.; BEINHARDT, S.; HOFER, H.; SCHÖNIGER-HEKELE, M.; HOLZMANN, H.; STEINDL-MUNDA, P. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis c not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1561–1567, 2008.

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

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

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

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

- WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis and the microenvironment: Fertile soil for hepatocellular carcinoma development. **Gene Expression**, v. 16, p. 77–84, 2014.
- WANG, Y.; LIU, N.; SU, X.; ZHOU, G.; SUN, G.; DU, F.; BIAN, X.; WANG, B. Epigallocatechin-3-gallate attenuates transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition via Nrf2 regulation in renal tubular epithelial cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, n. C, p. 260–267, 2015.
- WEI, L.; CHEN, Q.; GUO, A.; FAN, J.; WANG, R.; ZHANG, H. Asiatic acid attenuates CCl₄ - induced liver fibrosis in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR and Bcl-2/Bax signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 60, n. April, p. 1–8, 2018.
- WISECAVER, J. H.; BOROWSKY, A. T.; TZIN, V.; JANDER, G.; KLIEBENSTEIN, D. J. A global coexpression network approach for connecting genes to specialized metabolic pathways in plants. **The Plant Cell**, v. 29, n. May, p. 944–959, 2017.
- WU, Y.; LIU, X.; ZHOU, Q.; HUANG, C.; MENG, X.; XU, F.; LI, J. Silent information regulator 1 (SIRT1) ameliorates liver fibrosis via promoting activated stellate cell apoptosis and reversion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 2, p. 163–176, 2015.
- WURIE, H. R.; BUCKETT, L.; ZAMMIT, V. A. Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells. **FEBS Journal**, v. 279, n. 17, p. 3033–3047, 2012.
- XU, D.; LI, X.; LI, Y.; LIU, Y.; HUANG, C.; MENG, X.; LI, J. TIPE2 attenuates liver fibrosis by reversing the activated hepatic stellate cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 1, p. 199–206, 2018.
- XU, L.; HUI, A. Y.; ALBANIS, E.; ARTHUR, M. J.; O'BYRNE, S. M.; BLANER, W. S.; MUKHERJEE, P.; FRIEDMAN, S. L.; ENG, F. J. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 142–151, 2005.
- YAO, H.; QIAO, Y. J.; ZHAO, Y. L.; TAO, X. F.; XU, L. N.; YIN, L. H.; QI, Y.; PENG, J. Y. Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 30, p. 6890–6905, 2016.
- YIN, L.; GUO, X.; ZHANG, C.; CAI, Z.; XU, C. In silico analysis of expression data during the early priming stage of liver regeneration after partial hepatectomy in rat. **Oncotarget**, v. 9, n. 14, p. 11794–11804, 2018.
- YONEDA, A.; SAKAI-SAWADA, K.; NIITSU, Y.; TAMURA, Y. Vitamin A and insulin are required for the maintenance of hepatic stellate cell quiescence. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 8–17, 2016.
- YOSHIDA, K.; MATSUZAKI, K. Differential regulation of TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1–7, 2012.
- YU, H.; YAO, Y.; BU, F.; CHEN, Y.; WU, Y.; YANG, Y.; CHEN, X.; ZHU, Y.; WANG, Q.; PAN, X.; MENG, X.; HUANG, C.; LI, J. Blockade of YAP alleviates hepatic fibrosis through accelerating apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells. **Molecular Immunology**, v. 107, p. 29–40, 2019.
- YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

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

CAPÍTULO I. Silimarina protege células estreladas hepáticas (LX-2) de estresse gerado por dimetil-sulfóxido, reduz sinalização pró-fibrótica e modula metabolismo de lipídeos

Resumo

A fibrose hepática é uma resposta do órgão frente a lesões crônicas e pode ser reversível em diversos quadros clínicos. Os estímulos para a progressão da fibrose ocorrem principalmente pelo processo de ativação das células estreladas hepáticas. Durante esses processos, o metabolismo lipídico celular é alterado e alguns autores demonstraram o potencial de reversão da fibrose hepática através do controle desse metabolismo. Na busca por terapias, a silimarina apresenta grande potencial no tratamento de doenças hepáticas. O objetivo desse estudo foi demonstrar o potencial hepatoprotetor e antifibrótico da silimarina em cultura de células estreladas hepáticas (LX-2). Nossos resultados demonstraram um elevado potencial hepatoprotetor da silimarina, reduzindo aspectos celulares da fibrose e também os níveis proteicos de α -SMA e outros fatores pró-fibrogênicos. Além de reduzir a sinalização gênica relacionada com a oxidação de lipídeos causada pelo solvente dimetil-sulfóxido. Também foi observado que elevadas doses de silimarina (150 μ M) conduzem o metabolismo das LX-2 para um acúmulo lipídico de ácidos graxos e triglicerídeos. Conclui-se que a silimarina apresenta um efeito hepatoprotetor, onde 100 μ M de silimarina é capaz de reduzir a sinalização fibrogênica e restaurar a homeostase celular, enquanto que 150 μ M controla o metabolismo lipídico frente à toxicidade apresentada pelo DMSO.

Palavras-chave: DMSO, β -oxidação, metabolismo lipídico, fibrogênese, planta medicinal

Abstract

Liver fibrosis is an organ response to chronic injury and may be reversible in many clinical conditions. The stimuli for the progression of hepatic fibrosis occurs mainly through the activation of hepatic stellate cells. During these processes, cellular lipid metabolism is altered and some authors have demonstrated the potential for reversal of hepatic fibrosis by controlling this metabolism. In the search for therapies, silymarin presents great potential in the treatment of liver diseases. The aim of this study was to demonstrate the hepatoprotective and antifibrotic potential of silymarin in cultured hepatic stellate cells (LX-2). The results demonstrated a high hepatoprotective potential of silymarin, reducing cellular aspects of fibrosis and the protein levels of α -SMA and other pro-fibrogenic factors. In addition to reducing gene signaling related to the oxidation of lipids caused by the dimethyl sulfoxide solvent. It has also been observed that high doses of silymarin (150 μ M) lead the metabolism of LX-2 to a lipid accumulation of fatty acids and triglycerides. It is concluded that silymarin has a hepatoprotective effect, where 100 μ M silymarin is able to reduce fibrogenic signaling and restore cellular homeostasis, whereas 150 μ M controls the lipid metabolism against the toxicity presented by DMSO.

Key words: DMSO, β -oxidation, lipid metabolism, fibrogenesis, medicinal plant

1. Introdução

A fibrose é uma resposta do fígado frente à lesões crônicas, reversível em grande parte das patofisiologias quando em estágios iniciais de comprometimento do órgão (EBRAHIMI; NADERIAN; SOHRABPOUR, 2018; HUANG; DENG; LIANG, 2017; SCHUPPAN et al., 2018). O evento inicial para a progressão do quadro fibrótico é a transdiferenciação das células estreladas hepáticas (CEHs), de seu fenótipo quiescente para o ativado (HIGASHI; FRIEDMAN; HOSHIDA, 2017). Durante esse processo as células se tornam fibrogênicas, proliferadoras e aumentam a síntese de compostos da matriz extracelular (MEC) (BAIOCCHINI et al., 2016; REEVES, HELEN; FRIEDMAN, 2002). Esse desequilíbrio na produção de compostos da MEC leva à fibrose do órgão e eventualmente à cirrose ou hepatocarcinoma (LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008; WALLACE; FRIEDMAN, 2014).

As CEHs em seu estado quiescente, caracteristicamente, apresentam gotículas lipídicas (LD) ricas em retinol em seu citoplasma. Contudo, durante o processo de ativação celular, as LDs reduzem em número e tamanho, sugerindo alterações no metabolismo de lipídeos (BLANER et al., 2009; JING et al., 2013; TESTERINK et al., 2012). Estudos demonstram que as CEHs ativadas alteram a síntese de lipídeos conduzindo a um acúmulo de triglicerídeos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (MOLENAAR; VAANDRAGER; HELMS, 2017; TASCHLER et al., 2015; TUOHETAHUNTILA et al., 2015, 2016). Outros estudos, por sua vez, sugerem que a alteração no metabolismo lipídico das CEHs contribui para a obtenção da energia necessária durante a transdiferenciação e progressão do quadro fibrótico (HERNÁNDEZ-GEA et al., 2012; JING et al., 2013; LEE et al., 2017). O controle desse metabolismo pode colaborar para o retorno da quiescência celular, auxiliando no desenvolvimento de terapias que revertam e/ou controlem a fibrose hepática (DAVIS; KRAMER; DAVIDSON, 1990; NOYAN; CAVUSOGLU; ZEHR MINBAY, 2006; YONEDA et al., 2016).

Plantas medicinais podem ser uma alternativa economicamente mais viável e com grande potencial inovador para a busca por terapias que controlem a fibrose hepática (ALVES; ROSA, 2007; CHIN et al., 2006; THOMFORD et al., 2018). Entre as plantas com efeitos sobre as doenças hepáticas, a silimarina apresenta destaque. Esse fitoterápico consiste em uma mistura de compostos (flavolignanos e flavonoides) presentes na planta medicinal *Silybum marianum* (EL-NAHAS et al., 2017; LA GRANGE et al., 1999; VARGAS-MENDOZA et al., 2014). Em sua composição, as moléculas mais abundantes são a silibinina e suas isoformas como a isosilibinina e silidianina (BIJAK, 2017). A silimarina é também descrita como antioxidante,

anti-inflamatória e anti-proliferativa (EZHILARASAN et al., 2017; FENG et al., 2016; TRAPPOLIERE et al., 2009). Além disso, estudos *in vivo* apontam efeitos positivos em tratamentos com a silimarina no controle de doenças do fígado como esteatose, infecções com o vírus da hepatite e em estágios iniciais da fibrose hepática (CLICHICI et al., 2015; FERENCI et al., 2008; VECCHIONE et al., 2016). Assim, baseado em suas propriedades, a silimarina apresenta potencial para a reversão de patologias do fígado. Muitas vezes, o solvente para a silimarina utilizado em análises celulares é o dimetil-sulfóxido (DMSO). O DMSO ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), é um solvente de compostos orgânicos muito utilizado em estudos farmacológicos vista sua baixa interação com diversos compostos. Entretanto, o DMSO apresenta elevada toxicidade em diversos tipos de células (DA VIOLANTE et al., 2002; SINGH; MCKENZIE; MA, 2017; YI et al., 2017). Particularmente, no metabolismo de lipídeos em células hepáticas (HEpG2) o DMSO reduz os níveis de lipídeos drasticamente através da ativação de mecanismos de autofagia (SONG et al., 2012). Nesse trabalho, evidenciamos os efeitos da silimarina e do solvente DMSO em cultura de células estreladas hepáticas (LX-2), avaliando marcadores celulares e moleculares na reversão da fibrose hepática e os efeitos dos tratamentos em diversos aspectos do metabolismo de lipídeos dessas células. Em síntese, foi observado que 100 μM de silimarina apresenta efeitos hepatoprotetores, reduzindo a sinalização pró-fibrogênica e protegendo as células dos efeitos adversos do DMSO. Enquanto que a maior concentração (150 μM), conduziu as células para um acúmulo de triglicerídeos e ácidos graxos de cadeias longas.

2. Material e métodos

2.1 Cultura de células

Células da linhagem hepática estrelada LX-2 foram crescidas em meio DMEM (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*), suplementado com soro bovino fetal (SBF) e antibióticos a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Particularmente, a linhagem LX-2 é capaz de se transdiferenciar, mediante alterações na concentração de SBF. Células cultivadas na presença de 2% SBF, se transdiferenciam para um fenótipo quiescido, enquanto que, na presença de 10% SBF, se apresentam no fenótipo ativado (XU et al., 2005).

2.2 Tratamento com silimarina e desenho experimental

A silimarina em extrato comercial em pó foi utilizada (Merck). A silimarina foi diluída em dimetil-sulfóxido (DMSO) P.A para preparar uma solução estoque na concentração de 10 mM e congelada até o uso (EZHILARASAN et al., 2016).

As células ativadas foram consideradas como o grupo celular para a fibrose e também o controle experimental. As células quiescidas foram consideradas como grupo de avaliação para a reversão da fibrose.

Os efeitos da silimarina nas culturas foram avaliados em células ativadas. Para obter as concentrações avaliadas, a solução estoque foi diluída em meio de cultura até as concentrações finais de 100 μM e 150 μM . Os grupos celulares cultivados na presença de DMSO, diluídos em meio de cultura nas concentrações de 1% e 1,5% (v/v) foram incluídas, visto que o volume final de DMSO presente no meio se equivalia ao volume nas culturas com silimarina.

É importante ressaltar que a concentração de 100 μM é compatível com as doses séricas observadas após a administração oral em humanos e além disso testamos uma dose superior de 150 μM (WEN et al., 2007). Para os ensaios subsequentes, as culturas com os tratamentos foram incubadas por um intervalo de 24 horas.

2.3 Ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em placas de 96 poços, onde 4×10^3 células foram incubadas por 24 horas e tratadas como descrito no item 2.2. A metodologia para as análises foi adaptada de Mosmann, (1983). Após os tratamentos, Brometo Tiazolil Azul De Tetrazolio (MTT, *Merck*) foi adicionado na concentração de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ em cada poço e incubado durante a noite na temperatura de 37° C. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. Os resultados foram obtidos em leitor de microplacas (Biochrom EZ Read 400) na absorbância de 570 nm. As células ativadas (10% SBF) foram consideradas o controle para células vivas, seria considerado citotóxico se menos de 70% das células sobrevivessem.

Para as análises de genotoxicidade, 2×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços, seguido dos tratamentos descritos em 2.2. Como controle positivo para genotoxicidade foi utilizado o tratamento com metil-metano sulfonato 40 mM (MMS, *Merck*). Para a realização subsequente do ensaio, a metodologia do cometa alcalino, descrita em Roberto et al., (2016) foi utilizada. A suspensão de células obtidas após os tratamentos foi depositada em lâminas cobertas com agarose e lisadas em solução tampão (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e pH 10.0). Os lisados, passaram por eletroforese em tampão alcalino (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, pH >13.0), neutralizados (0.4 M Trizma Hydrochloride, pH 7.5) e fixados em etanol absoluto. Foram analisados aproximadamente 50 nucleóides por lâmina, utilizando o software Comet Assay IV™.

2.4 Microscopia de fluorescência e contraste de fase

Durante a realização dos ensaios de microscopia 4×10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares e incubadas previamente aos tratamentos por um intervalo de 24 horas para fixação das células nas lamínulas. Os tratamentos celulares em seguida ocorreram como descrito (item 2.2).

Para as análises de fluorescências, as células foram fixadas em solução contendo paraformaldeído (1,37%) e Triton X-100 (0,05%) por 5 minutos. Os filamentos de actina foram marcados com faloidina-TRICT a 100 µg/ mL por duas horas. O núcleo celular foi contra-corado com 3,33 ng/ mL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI, *Sigma-Aldrich*) por 3 minutos. As lamínulas coradas foram analisadas com o microscópio BX51 Olympus e sistema fotográfico digital DP71 com os filtros correspondentes definidos. A metodologia foi adaptada de da Silva et al., (2016).

As análises da morfologia celular e das gotículas lipídicas foram conduzidas em microscopia de contraste de fase. As células LX-2 foram fixadas em solução de formol-cálcio (18,5% formaldeído e 0,455 M de CaCl_2). As gotículas de lipídeos foram marcadas utilizando-se solução de 0,7% de Oil red O (*Merck*) preparado em propileno glicol e o núcleo celular corado com solução hematoxilina de Harris. As imagens foram obtidas no microscópio BX51 Olympus e sistema fotográfico digital DP71, as gotículas de lipídeos foram quantificadas relativamente utilizando o software *Image-J* (<http://rsbweb.nih.gov>) e a metodologia adotada de (DE OLIVEIRA DA SILVA et al., 2018).

2.5 Rastreo de ácidos graxos fluorescentes

Na realização desse experimento, células LX-2 foram cultivadas em placas de 24 poços de acordo com o descrito no item 2.4. Os tratamentos foram realizados como descrito no item 2.2 e conjuntamente ao meio de cultura foi adicionado 1 µM de BODIPY™ 558/568 C12 (4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid) (*Thermo Fisher Scientific*). Essa molécula é um análogo de ácido graxo saturado com cadeia de 12 carbonos conjugado a um fluoróforo, muito utilizado para entender absorção e esterificação de ácidos graxos (KOLAHİ et al., 2016; RAMBOLD; COHEN; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2015). As culturas foram mantidas na presença do ácido graxo C12 por 16 horas. Para rastrear os ácidos graxos marcados com C12 o método de *pulse-chase* foi realizado. Então, o C12 foi retirado e as células lavadas com meio de cultivo, em seguida, as mesmas foram mantidas com meio fresco por mais 1 hora ou 8 horas. Durante esse momento um novo tratamento com silimarina e DMSO foi realizado. Um grupo celular adicional foi tratado com Etomoxir 25 µM (2[6(4-

chlorophenoxy) hexyl] oxirane-2-carboxylate), essa molécula é um inibidor da enzima CPT-1 e bloqueia a oxidação lipídica mitocondrial, sendo assim, um controle negativo para β -oxidação. Por fim, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído (1,37%) e Triton X-100 (0,05%) por 5 minutos.

Para acompanhar se os ácidos graxos obtidos através da incorporação do C12 foram metabolizados, as lamínulas com as células fixadas tiveram suas gotículas de lipídeos marcadas com BODIPY™ 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (*Thermo Fisher Scientific*), essa molécula é um fluoróforo de 18 carbonos que se incorpora a lipídeos neutros. A marcação com BODIPY™ 493/503, na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ diluído em tampão salino-fosfatado (PBS) foi realizada durante 20 minutos. Após a marcação, sucessivas lavagens com PBS 0,5x foram realizadas e o núcleo celular contra corado com DAPI (3,33 ng/ mL).

As imagens obtidas através do microscópio BX51 Olympus e sistema fotográfico digital DP71 foram quantificadas afim de obter um coeficiente de Pearson para sobreposição do C12 e as gotículas de lipídeos. Para isso o programa Image J (NIH) e o plug-in “JACoP” foram utilizados. Um aumento no coeficiente de Pearson, ao longo do tempo demonstra a capacidade da célula de metabolizar o C12 incorporado e acumulá-lo na forma de gotículas de lipídeos. A intensidade de fluorescência nas imagens obtidas foi medida através da função “*Mean gray value*” do programa Image J. Essa medida converte cada pixel da imagem em uma escala de cinza e soma todos os valores e os divide pela área total em pixel da imagem.

2.6 Extração de RNA total e PCR em tempo real

Para as análises transcricionais, o RNA total dos diferentes grupos celulares foi extraído utilizando o reagente TRIZOL® (*Thermo Fisher Scientific*), adaptando-se o protocolo do fornecedor do reagente. Em seguida, 200 ng de RNA total foi transcrita para cDNA utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*®, *Thermo Fisher Scientific*). Para as reações de PCR, os reagentes *SYBR Green/Rox qPCR Master MIX* (*Thermo Fisher Scientific*) e o ciclador A&B – *StepOnePlus™*, foram utilizados. O gene β -actina foi definido como normalizador e utilizado a técnica de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Os genes analisados e oligonucleotídeos utilizados são apresentados na Tabela 1. O método adotado para a realização dos ensaios e análise dos dados foi retirado de DA SILVA; DOS SANTOS; MORAES (2016).

2.7 Mensuração de triglicerídeos totais

Para essas análises, 5×10^5 células foram crescidas em garrafas de 75 cm² e os tratamentos seguiram as especificações descritas no item 2.2. As células foram coletadas por tripsinização e ressuspensas em 100 µL de PBS contendo 0,68 mM de EDTA. A mensuração dos triglicerídeos totais foi realizada através de sistema enzimático-colorimétrico e medidas em espectrofotômetro (TRINDER, 1969) utilizando o reagente comercial Triglicerídeos Liquiform (Labtest), seguindo recomendações do fabricante.

2.8 Quantificação de ácidos graxos via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)

Para as análises de GC/MS as células crescidas em placas de 6 poços (2×10^5) cultivadas e tratadas como descritos no item 2.2 foram coletadas em tubos livres de ácidos graxos (AG). Previamente as análises de cromatografia, as amostras foram processadas seguindo metodologia de esterificação de AGs descrita em Fischer and Speier (1985). Os AGs obtidos foram quantificados no equipamento GCMS-QP2010 *Plus* (Shimadzu Scientific Instruments, Japão) com auxílio de injetor de amostra AOC-20i. (Shimadzu Scientific Instruments). O espectrômetro de massa foi operado no modo de ionização de elétrons a 70 eV, com um alcance de varredura de 40 a 500 m/z. Uma curva padrão para quantificação dos AGs foi obtida usando concentrações conhecidas (0,5 ppm a 10 ppm) de ácido palmítico, esteárico, oleico e araquidônico (Merck).

2.9 Western blot

As análises de *western blot* foram realizadas seguindo protocolo descrito em Da Silva et al., (2016). Para os ensaios, 100 µg de proteína foram separadas em gel de poliacrilamida a 10%, exceto para a proteína FASN em que o gel utilizado foi de 6%, seguido de transferência das proteínas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), bloqueio em *Blotto* (5% leite-desnatado e TBS-T) e incubadas com anticorpos primários e secundários específicos. Nesses ensaios foram utilizados os anticorpos anti-actina α SMA (Merck, USA) incubados por 48 horas. Todos os anticorpos seguintes foram incubados por 36 horas: anti-MLYCD (ABCAM, UK), anti-ACSL4 (Thermo Fisher Scientific), anti-FASN e anti- β -actina (Cell Signaling, USA). Os anticorpos secundários conjugados a horseradish peroxidase (HRP) (Cayman Chemical, USA) foram incubados, por 3 horas. A imunoreatividade dos anticorpos foi detectada através de kit de reação quimioluminescente e exposto em filme de raio-X (ECL – GE Healthcare Life Sciences). Para a quantificação relativa dos níveis de proteína, o software

Image J (<http://rsbweb.nih.gov>) (SCHNEIDER et al., 2012) foi utilizado, tomando como normalizador os níveis proteicos de β -actina.

2.10 Análises dos dados

Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad versão 5.0 (Prism Inc.). Os dados são expressos em média e desvio padrão. Para todos os ensaios foram realizadas análises de ANOVA simples, e testes *post-hoc* de Tukey para confirmar a diferença estatística entre as médias dos tratamentos. O valor de $p < 0,05$ foi determinado para significância estatística.

3. Resultados

3.1 Silimarina controla o estresse celular gerado por dimetil-sulfóxido e reduz a sinalização pró-fibrogênica nas células LX-2

Os tratamentos com silimarina e o solvente DMSO nas concentrações testadas não apresentaram efeitos citotóxicos às células LX-2 (Figura 1A). Contudo, microscopias de contraste de fase demonstraram que o tratamento com a silimarina altera a morfologia das células (Figura 1B). Os ensaios de genotoxicidade nas culturas de células tratadas com DMSO apresentaram um leve aumento na fragmentação do material genético ao se observar a medida de comprimento da cauda do nucleóide. Entretanto, quando as células são incubadas com as diferentes concentrações de silimarina investigadas, observamos reduções nas medidas de comprimento da cauda dos nucleóides, em comparação com o padrão observado nas culturas incubadas somente com DMSO (Figura 1C).

Para se avaliar potenciais efeitos protetores e antifibrosantes da silimarina nas LX-2, microscopias de fluorescência foram realizadas e foi possível observar que as LX-2 quiescidas possuem filamentos de actina homogêneos e organizados, enquanto que nas CEHs ativadas, muitas fibras de actina estão presentes de maneira desorganizada por todo o citoplasma. As células tratadas com o volume de DMSO 1% não apresentaram alterações quando comparadas com as LX-2 ativadas. Contudo, o tratamento com 100 μ M de silimarina é capaz de retornar a morfologia dos filamentos de actina próximo ao observado nas células quiescidas (2% SBF). Em contraste, as culturas tratadas com 1,5% de DMSO apresentaram um citoesqueleto amplamente despolimerizado, sem fibras evidentes, mas muito corado. As células condicionadas com 150 μ M de silimarina não foram capazes de reverter o efeito do volume do solvente correspondente utilizado (DMSO 1,5%) (Figura 1D).

Complementando as análises, foram avaliados genes relevantes no processo de transdiferenciação e sinalização pró-fibrogênica. Os tratamentos com 100 μM de silimarina é capaz de reduzir a expressão de *TGF- β 1*, *PDGF*, *Col1A2* e *Vimentina*, modulando a alta expressão apresentada nos tratamentos com DMSO 1%. Contudo, para essa mesma concentração não houve alterações nos níveis de expressão do gene *TGF- β 2* e *Col1A1*.

As culturas, incubadas com 150 μM de silimarina, apresentaram resultados divergentes no perfil transcricional dos genes analisados. Ao mesmo tempo que *TGF- β 1* tem sua expressão reduzida quando comparada com o DMSO 1,5%, o inverso é observado para os genes *TGF- β 2* e *PDGF*. Enquanto que os outros genes analisados não alteraram seus níveis de expressão em relação ao tratamento com DMSO 1,5%. Porém, cabe observar que o tratamento com 1,5% de DMSO, nas culturas, foram responsáveis por elevar a expressão da maioria dos genes marcadores do processo de fibrose em relação as células ativadas (Figura 1E). Paralelamente, ao se analisar os níveis transcricionais do gene α -SMA, elemento relevante no processo de ativação das CEHs, não são observadas alterações nos níveis de expressão gênica nos diferentes grupos de células ativadas, independentemente do tratamento celular realizado. Entretanto, os níveis proteicos de α -SMA confirmaram o observado nos ensaios celulares, demonstrando que o tratamento com 100 μM de silimarina reduz a síntese dessa proteína, enquanto que as outras condições testadas não apresentaram tal variação nos níveis de α -SMA (Figura 1F).

3.2 Silimarina reverte efeito de redução lipídica causada pelo dimetil-sulfóxido e conduz a linhagem de células LX-2 para um acúmulo de ácidos graxos e triglicerídeos

Avaliamos os efeitos da silimarina no perfil de gotículas de lipídeos das CEHs através de ensaios de microscopia. Nos ensaios, as células LX-2 quando quiescidas, demonstram um acúmulo de gotículas lipídicas em seu citoplasma, enquanto que as células ativadas reduzem a capacidade de armazenar gotículas (Figura 2A). Os resultados também apresentam uma perda drástica no acúmulo de gotículas de lipídeos nas culturas ativadas tratadas com ambas as concentrações de DMSO. Opostamente, os tratamentos com silimarina de maneira dose-dependente aumentaram os níveis de gotículas armazenadas no citoplasma: para 100 μM de silimarina o número de gotículas permaneceu próximo ao encontrado nas células LX-2 ativadas; ao mesmo tempo, o tratamento com 150 μM de silimarina, restaurou o total de gotículas, comparativamente às células quiescidas (Figura 2A). Complementando os resultados anteriores, a mensuração de triglicerídeos (TGs) é relevante para o processo de ativação das CEHs e demonstra que as LX-2 ativadas acumulam intracelularmente essas moléculas em relação às células quiescidas. Assim, como nos ensaios de microscopia para as gotículas de

lipídeos, as diferentes concentrações de DMSO reduzem drasticamente os níveis de triglicerídeos. E para os tratamentos com silimarina: 100 μ M conduz as células para um leve acúmulo nos níveis de triglicerídeos e 150 μ M eleva significativamente os níveis de TG, superando os níveis encontrados nas CEHs ativadas (Figura 2B).

O perfil de ácidos graxos (palmítico, esteárico, oleico e araquidônico) nas LX-2 foi medido através de GC/MS e demonstram que não há alterações nos níveis dos AGs avaliados entre as células ativadas e quiescidas. Comparando o tratamento de 100 μ M de silimarina com as células tratadas com DMSO 1% não foi observado alterações estatisticamente significantes nos níveis de ácido palmítico, esteárico e oleico. Para 100 μ M de silimarina, somente o ácido araquidônico foi elevado. Para as células cultivadas na presença de 150 μ M de silimarina houve um acúmulo estatisticamente significativo em todos os AGs analisados. As células incubadas na presença de DMSO, em ambas as concentrações tiveram uma redução nos níveis dos AGs insaturados, oleico e araquidônico (Figura 2C). Os tratamentos com ambas as concentrações de DMSO também aumentaram o nível de AGs saturados excretados para o meio onde as CEHs foram cultivadas (Figura 2D).

3.3 A silimarina de maneira diferencial reduz oxidação de ácidos graxos geradas pelo DMSO

A sobreposição entre as fotos do BODIPY-C12 e das gotículas de lipídeos nas células quiescentes demonstram um aumento no valor do coeficiente de Pearson estatisticamente significativo ($p < 0,05$) ao longo do tempo, o que indica a capacidade da célula em metabolizar o C12 incorporado e acumula-lo na forma de gotículas de lipídeos (Figura 3A). Para as células ativadas não há uma alteração no valor do coeficiente no decorrer do tempo sugerindo que a capacidade de incorporar o BODIPY-C12 em forma de gotículas é limitada. As células tratadas com DMSO 1% esterificam rapidamente o ácido-graxo C12 incorporado, mas ao longo do tempo essa sobreposição com a gotícula é perdida. O tratamento com 100 μ M de silimarina, reverte esses efeitos do DMSO, mantendo a incorporação e esterificação dos lipídeos como encontrado nas LX-2 ativadas. O condicionamento das células com DMSO 1,5% após uma hora sem o BODIPY-C12 nas culturas demonstra o mesmo padrão encontrado nas células ativadas. Porém, após o período de 8 horas, nota-se uma baixa sobreposição entre o C12 incorporado e as gotículas. Os tratamentos com silimarina na concentração de 150 μ M após o período de 1 hora sem o BODIPY-C12 presente no meio de cultivo eleva o valor do coeficiente de Pearson em relação ao DMSO 1,5% e as células ativadas. Esse resultado indica que a silimarina, nessa concentração, altera o metabolismo celular para uma esterificação rápida do C12 e armazenamento na forma de gotículas. Ao bloquear os efeitos da β -oxidação nas células

ativadas, através de uma molécula inibidora de CPT-1 (Etomoxir), foi observado uma alta co-localização entre o C12 incorporado e as gotículas de lipídeos (Figura 3A). Avaliando diretamente as microscopias nos tratamentos com ambas as concentrações de DMSO após 8 horas sem o C12, observamos algumas partes da célula com coloração do BODIPY-C12 difusa e não associada com gotículas de lipídeos (Figura 3B). Nos tratamentos com silimarina, somente na concentração de 150 μ M essas áreas foram notadas (Figura 3B). Complementando as análises, aferimos a intensidade de fluorescência do BODIPY-C12 nas imagens obtidas. Os tratamentos com DMSO possuem menor intensidade de fluorescência em comparação com a silimarina. Os tratamentos com silimarina restauram os níveis de fluorescência próximo ao das outras condições (Figura 3C).

3.4 Silimarina provoca um aumento na expressão de genes de síntese lipídica e opostamente reduz genes de oxidação lipídica na linhagem LX-2

Alguns genes relevantes na síntese de lipídeos (*MLYCD*, *FASN*, *ACSL4*, *OXSM* e *ELOVL7*) e início da oxidação lipídica (*CS* e *CPT-1*) foram investigados. Em relação ao gene *MLYCD*, seu perfil transcricional demonstra um elevada expressão no tratamento com 150 μ M de silimarina, enquanto que comparativamente, os outros tratamentos não apresentam alterações em relação as células ativadas. O nível proteico de *MLYCD* exibe disparidades em relação ao transcricional, de maneira dose-dependente, há um aumento nos níveis dos tratamentos com silimarina e estatisticamente essas alterações são diferentes das encontradas nos cultivos somente com o DMSO (Figura 4A). Para o gene *FASN*, seus níveis transcricionais são extremamente reduzidos em LX-2 cultivadas em 10% SBF em todos os tratamentos. Contudo, observamos que somente o tratamento com DMSO 1% é capaz de aumentar a presença dessa enzima nas culturas. Em seguida, analisamos a expressão de genes adjacentes na síntese de lipídeos, como *OXSM* e *ELOVL7*. Em nossos ensaios, observamos o mesmo padrão para o DMSO 1% nesses genes, quando comparado a *FASN*. Contudo, o tratamento com 150 μ M de silimarina, diferentemente do encontrado em *FASN* tem sua expressão elevada nos genes *OXSM* e *ELVOL7* (Figura 4B). Para *ACSL-4*, os tratamentos com silimarina são responsáveis pela redução nos níveis transcricionais e proteicos, em comparação com os níveis encontrados nas culturas tratadas com o solvente. Ao mesmo tempo, o DMSO aumenta os níveis de *ACSL-4* acima do observado nas células quiescidas e ativadas (Figura 4C). Por fim, para os genes de *CS* e *CPT-1*, vimos que os tratamentos com DMSO eleva os níveis de expressão acima do observado nas células controles, enquanto que a silimarina é responsável por manter o nível

transcricional próximo ao encontrado nas células ativadas. Além disso, os níveis transcricionais de *CPT-1* e *CS* apresentam o mesmo padrão observado em *ACSL4* (Figura 4D).

4 Discussão

Baseado em nossas análises, as concentrações testadas de silimarina e de DMSO não apresentam citotoxicidade às células LX-2 em nossos ensaios, corroborando resultados anteriores descritos na literatura (Ezhilarasan et al., 2016; ZHANG et al., 2013). Porém, como demonstrado na Figura 1A, as análises de genotoxicidade apontaram fragmentações no material genético nas células LX-2 incubadas com as diferentes concentrações de DMSO. Fragmentação de DNA essa que não foi detectada quando as células foram incubadas com o solvente DMSO na presença de silimarina, apontando para seu efeito protetor e redutor de danos celulares. Esse efeito antígeno-tóxico da silimarina também foi demonstrado em hepatócitos (HepG2) (ANGELI et al., 2010).

Um aspecto clássico na transdiferenciação das células LX-2 para seu fenótipo ativado é o remodelamento de seu citoesqueleto tornando-o mais polimerizado e aumentando a expressão de marcadores pró-fibrogênicos e pró-inflamatórios. Os resultados demonstram que o tratamento com 1% de DMSO não é capaz de interferir no fenótipo fibrosado das LX-2 ou alterar os níveis proteicos de α -SMA (Figura 1B e 1D). Porém, é responsável por modular a resposta transcricional de alguns genes pró-inflamatórios (Figura 1C). Nas células cultivadas com 1,5% de DMSO, comparativamente, é encontrado um padrão de elevada despolimerização do citoesqueleto, o que pode sugerir um estresse celular intenso. Em relação ao perfil de expressão gênica para esse tratamento, tanto *TGF- β 1*, *Vimentina* e *PDGF* tiveram seus níveis de expressão elevados, ao passo que *TGF- β 2* também teve uma drástica redução em seus níveis. Essas instabilidades na expressão dos genes avaliados podem favorecer a progressão do quadro fibrótico e gerar um ambiente tóxico para as células. Esses resultados sobre os efeitos pró-fibróticos do DMSO em nossos tratamentos é corroborado em trabalhos que demonstram o potencial do solvente em aumentar os níveis de TGF- β e aumentar a síntese de diferentes tipos de colágenos em CEHs e outras células (HUANG et al., 2016; ZENG et al., 2010). Quando as células são cultivadas na presença de 100 μ M de silimarina, o composto demonstra seu potencial protetor contra as alterações causadas pelo DMSO. O tratamento é capaz de reduzir a polimerização do citoesqueleto nas LX-2 ativadas e normalizar os níveis proteicos de α -SMA em relação as células quiescentes, além de reduzir a expressão de alguns genes pró-fibróticos analisados. Nossos tratamentos com silimarina nessa concentração entram em acordo com o observado em diversos estudos realizados em modelos *in vitro* e *in vivo* na redução da síntese

proteica de α -SMA (CLICHICI et al., 2015; KABIR et al., 2014; KIM et al., 2012). Sabe-se também que a silimarina é capaz de reduzir a síntese de colágenos e citocinas como TGF- β em modelos in vivo de fibrose (JIA et al., 2001; LOVELACE et al., 2015; MATA-SANTOS et al., 2014). Contudo, em nosso estudo não foi observado uma redução nos níveis de transcritos para *Col1A1* ou *TGF- β 2* o que sugere a atuação direta da silimarina no produto desses genes. Quando as células foram cultivadas na presença de 150 μ M de silimarina houve uma leve diferença de expressão entre os genes *TGF- β 1*, *TGF- β 2* e *PDGF*, em relação ao volume de solvente usado. Porém, não houve alterações na morfologia celular e em parte do perfil gênico analisado (*Vimentina*, *Col1A1*, *Col1A2*). Analisando isso, é sugerido então que os compostos da planta não consigam modular os aspectos negativos das elevadas concentrações do DMSO em relação ao citoesqueleto celular.

Outro aspecto importante para a reversão da fibrose hepática é o controle do metabolismo de lipídeos nas CEHs ativadas e caracteristicamente o retorno das gotículas de lipídeos para o seu citoplasma (TRAUTWEIN et al., 2015; YOON; FRIEDMAN; LEE, 2016). Em nossos ensaios, foi observado que ambas as concentrações de DMSO reduzem os níveis de gotículas de lipídeos, triglicerídeos e ácidos graxos longos insaturados nas células LX-2, além de, secretar AGs para fora da célula (Figura2). Em congruência ao que foi observado, as duas concentrações de DMSO incorporam menos C₁₂ nas células e não armazenam o ácido graxo fluorescente em forma de gotículas (Figura 3). Além disso, os níveis de expressão de genes relacionados com a atividade mitocondrial (*CS*) e o transporte de ácidos graxos para a mitocôndria (*CPT-1*) são elevados nas duas concentrações de DMSO (Figura 4). De maneira geral, com os resultados foi possível inferir que há um desequilíbrio no metabolismo lipídico dessas células e possivelmente um processo de oxidação lipídica nas CEHs tratadas com DMSO. Na literatura é descrito que outros tipos de células hepáticas tratadas com DMSO possuem uma redução em seus níveis de lipídeos através da ativação de rotas metabólicas de autofagia (SONG et al., 2012). No estudo de Rambold e colaboradores (2015) é demonstrado que defeitos no processo de fusão mitocondrial podem facilitar a excreção de ácidos graxos das células, como está acontecendo com as células cultivadas com DMSO. Essas alterações metabólicas descontroladas pode elevar a presença de espécies reativas ao oxigênio (EROs) no metabolismo celular, consequentemente, causar uma progressão no quadro fibrótico através de estresse oxidativo, alterações mitocondriais e através de estresse do retículo endoplasmático (ASHRAF; SHEIKH, 2015; CICHÓŻ-LACH; MICHALAK, 2014; MANSOURI; GATTOLLIAT; ASSELAH, 2018; MORRY; NGAMCHERDTRAKUL; YANTASEE, 2017). Em relação ao tratamento com 100 μ M de silimarina, o mesmo é responsável por trazer todos os aspectos analisados no

metabolismo lipídico das CEHs (gotículas, triglicerídeos, AGs e sinalização oxidativa) próximo ao nível homeostático encontrado nas células ativadas. Nas células em que 150 μ M de silimarina estava presente o metabolismo lipídico foi redirecionado para o acúmulo de ácidos graxos e alteração na sinalização de genes relacionados com a síntese lipídica. Nessa sinalização, genes alternativos de síntese lipídica como *OXSM* e *ELOVL7* foram elevados. Esses genes são conhecidos por sintetizar ácidos graxos de cadeias longas e insaturados (RODRÍGUEZ-CRUZ et al., 2012). O aumento no pool de ácidos graxos pela silimarina pode contribuir para um ambiente mais lipotóxico em células hepáticas aumentando a sinalização pró-fibrótica e pró-inflamatória (DUAN; LIU; WU, 2017; LI et al., 2018a). Em relação aos ácidos graxos saturados, seu acúmulo pode também exacerbar os processos de apoptose através de um estresse do retículo endoplasmático (WEI et al., 2006). Em contrapartida, o acúmulo de triglicerídeos e do ácido araquidônico nos tratamentos com 150 μ M de silimarina pode ser uma estratégia celular para contribuir com a manutenção da homeostase celular. É importante ressaltar que a maior concentração DMSO (1,5%) pode estar comprometendo o funcionamento das mitocôndrias, e esse processo força a silimarina a conduzir as LX-2 para um acúmulo de ácidos graxos evitando um acúmulo de ácidos graxos livres (RAMBOLD; COHEN; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2015). Esse acúmulo evita um ambiente celular lipotóxico causado pela redução excessiva de AGs pelos tratamentos com DMSO (Listenberger et al., 2003) ou contribui para a síntese de eicosanoides e aumenta a atividade transcricional de genes responsáveis por processos pró-inflamatórios (Macdonald et al., 2001; Saito et al., 2015). A figura 5 sumariza os efeitos do DMSO e da silimarina na linhagem de células estreladas hepáticas LX-2.

Em conclusão, nossos resultados em conjunto, expõem os efeitos adversos do DMSO para ensaios com CEHs, em concentrações a partir de 1%. E confirmam o potencial medicinal da silimarina no controle de aspectos da fibrose hepática em um contexto de hepatoproteção. Contudo, diversos estudos com cultura de células demonstram efeitos positivos da silimarina com tratamentos até 100 μ M da planta (EZHILARASAN et al., 2016; TRAPPOLIERE et al., 2009; VECCHIONE et al., 2016), em nosso trabalho demonstramos que uma maior concentração (150 μ M) é capaz de alterar o metabolismo lipídico das células levando ao acúmulo de ácidos graxos o que pode ter implicações negativas para a progressão do quadro fibrótico.

Agradecimentos

Agradecemos a professora Dra. Marin Aparecida Marin Morales, pela máquina de qPCR e o técnico Sebastião Zanão, do laboratório de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (UNESP) – pela ajuda com o protocolo e manuseio do equipamento de cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Esse trabalho foi apoiado por recursos de pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2013/21186-7 e 2018/05286-3). Os autores declaram que não houve conflito de interesses.

Legendas das Figuras

Figura 1. Efeito da silimarina na redução da sinalização pró-fibrogênica nas células LX-2 e controle do estresse celular gerado por dimetil-sulfóxido. A) Ensaio de citotoxicidade (MTT) para diferentes os grupos de células LX-2 após os tratamentos de 24 horas com silimarina e solvente dimetil-sulfóxido. B) Microscopia de contraste de fase demonstrando a alteração morfológica causada pela silimarina. C) Ensaio de genotoxicidade (Cometa alcalino) – em evidencia o comprimento da cauda dos nucleóides. D) Microscopias de fluorescência marcando filamentos de actina para os grupos celulares tratados ou não com silimarina e DMSO. E) Painel geral de transcritos gênicos envolvidos em processos pró-fibrogênicos para as células LX-2 por qRT-PCR. F) Nível de mRNA e proteína de α -SMA, das células LX-2. Os gráficos apresentados representam a média e o desvio padrão dos experimentos e possuem valor de $p < 0,05$. O colchete sob as barras representa a comparação par-a-par entre os tratamentos e o asterico= $p < 0,05$ e ns= não significativo estatisticamente.

Figura 2. A silimarina reverte o efeito do dimetil-sulfóxido na redução dos lipídeos nas células LX-2 e as conduz para um acúmulo de triglicerídeos e ácidos graxos. A) Distribuição de gotículas lipídicas para os grupos de células LX-2 em marcação com *Red Oil* e suas quantificações relativas. B) Ensaio bioquímico de mensuração de triglicerídeos intracelulares. C) Quantificação de ácidos graxos intracelulares por GC/MS. D) Quantificação de ácidos graxos presentes no meio de cultura coletado após os tratamentos com silimarina e DMSO por GC/MS. Os gráficos apresentados representam a média e o desvio padrão dos experimentos e possuem valor de $p < 0,05$. Para as imagens A, B e C o colchete e o asterisco representam $p < 0,05$ para a comparação par-a-par entre os tratamentos. O asterisco sob as barras na imagem D comparam estatisticamente os valores da média em relação ao controle e representam $p < 0,05$.

Figura 3. Rastreo de ácido graxo fluorescente. A) O coeficiente de Pearson quantifica a sobreposição entre as imagens obtidas com BODIPY 558/568 C12 e as gotículas de lipídeos marcadas com BODIPY™ 493/503 em diferentes períodos de tempo. B) Microscopias de fluorescência marcando BODIPY 558/568 C12 e a sobreposição entre as gotículas e o núcleo celular para os diferentes tratamentos celulares. As setas brancas indicam regiões onde uma possível oxidação de lipídeos está ocorrendo. C) Nível de intensidade do C12, obtido através das médias dos valores de cinza para o total de pixel encontrado em cada tratamento avaliado. O colchete sob as barras representa a comparação par-a-par entre os tratamentos e o asterico= $p < 0,05$ e ns= não significativo estatisticamente.

Figura 4. Perfil de expressão de genes relacionados com síntese e oxidação de lipídeos nas células LX-2. A) Nível de mRNA e proteico de MLYCD. B) Expressão de genes relevantes na síntese de lipídeos e nível proteico de FASN. C) Nível de mRNA e proteico de ACSL-4. D) Transcritos de genes relevantes na oxidação de lipídeos em diferentes condições celulares obtidos por qRT-PCR. Os gráficos apresentados representam a média e o desvio padrão dos experimentos e possuem valor de $p < 0,05$. O colchete sob as barras representa a comparação par-a-par entre os tratamentos e o asterico= $p < 0,05$ e ns= não significativo estatisticamente.

Figura 5. Representação gráfica dos efeitos da silimarina e do DMSO nas células LX-2. 1) As células LX-2 em seu fenótipo ativado quando cultivadas na presença de 100 μM retornam à homeostase e trazem seu fenótipo mais próximo ao encontrado nas células quiescidas. 2) O tratamento com silimarina na concentração de 150 μM conduz as células LX-2 a um acúmulo de ácidos graxos. 3) Nas células LX-2 o DMSO apresenta efeitos adversos para o metabolismo, na concentração acima de 1%

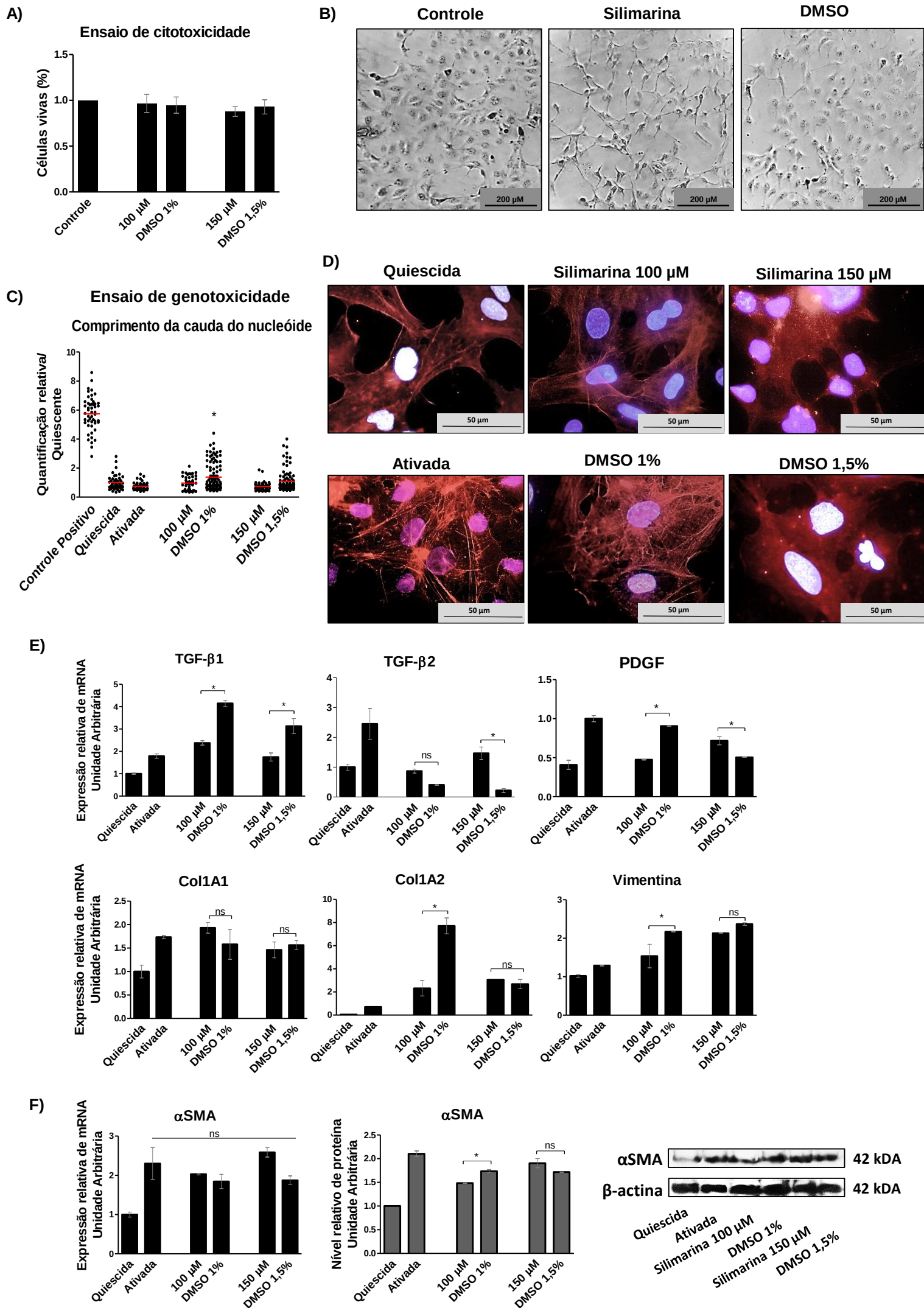
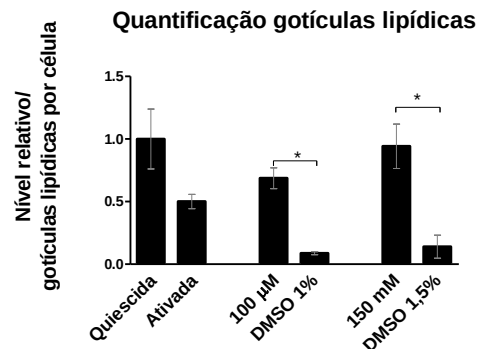
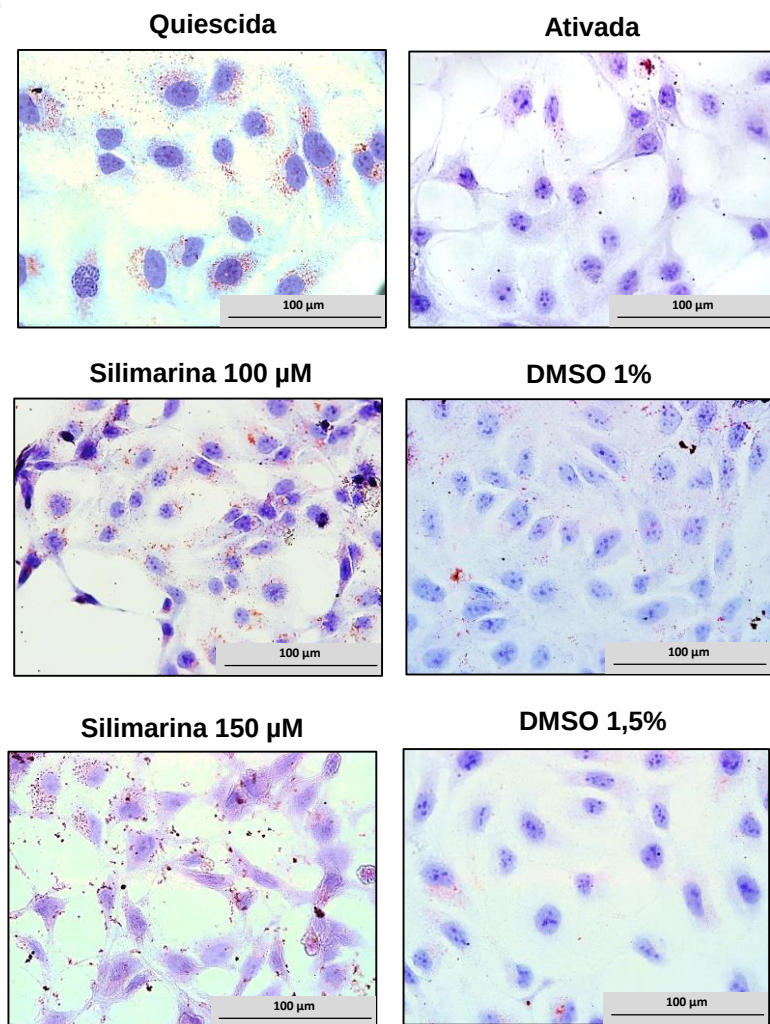


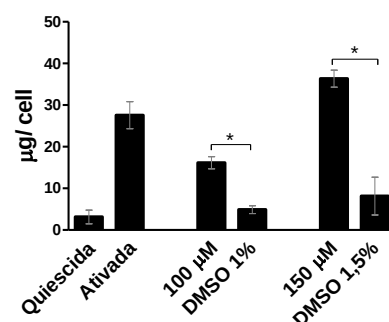
Figura 1

A)

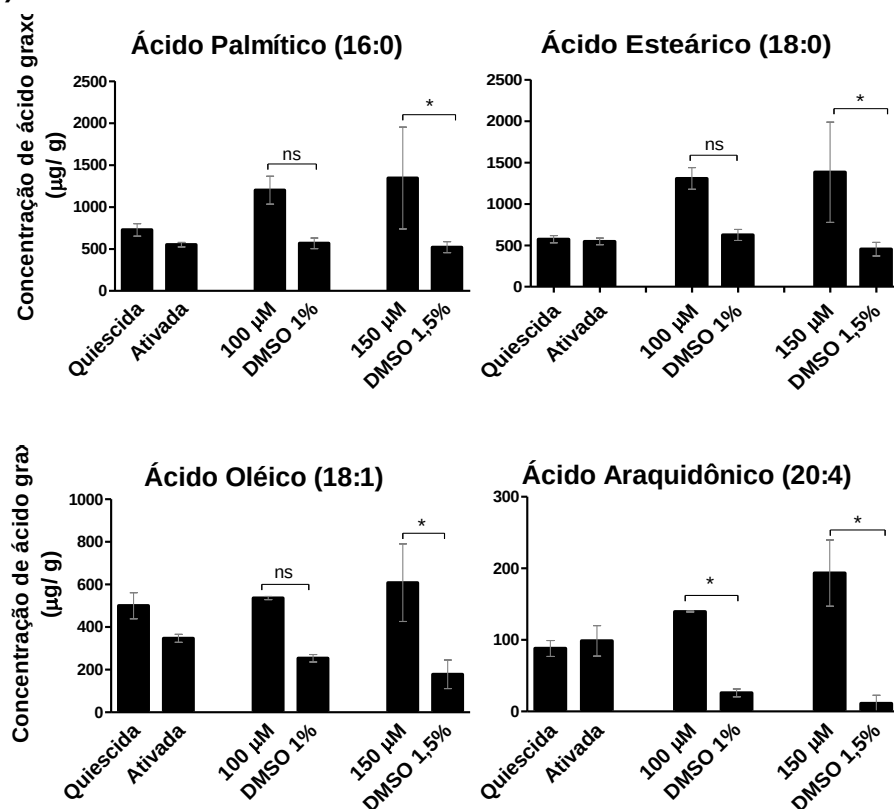


B)

Ensaio Bioquímico
Triglicerídeos intracelular



C)



D)

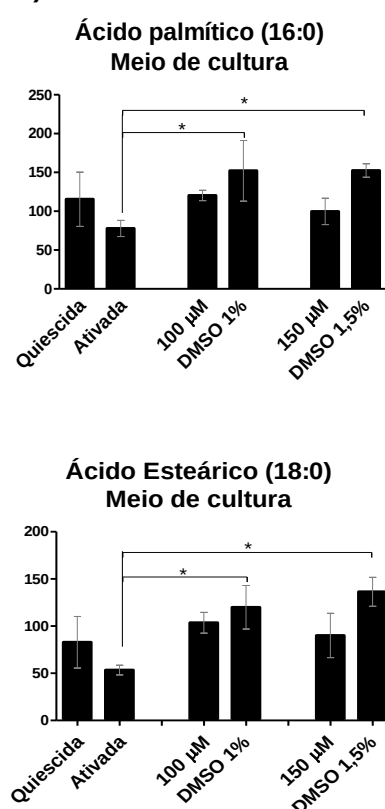


Figura 2

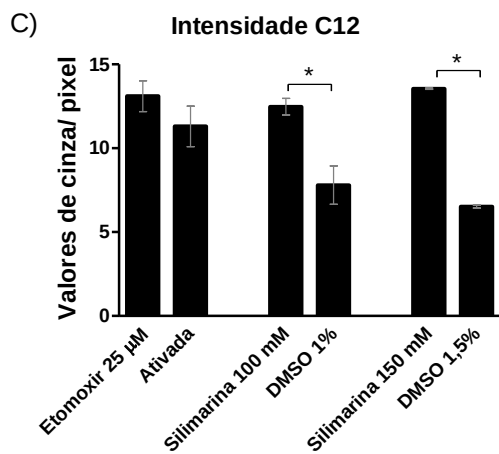
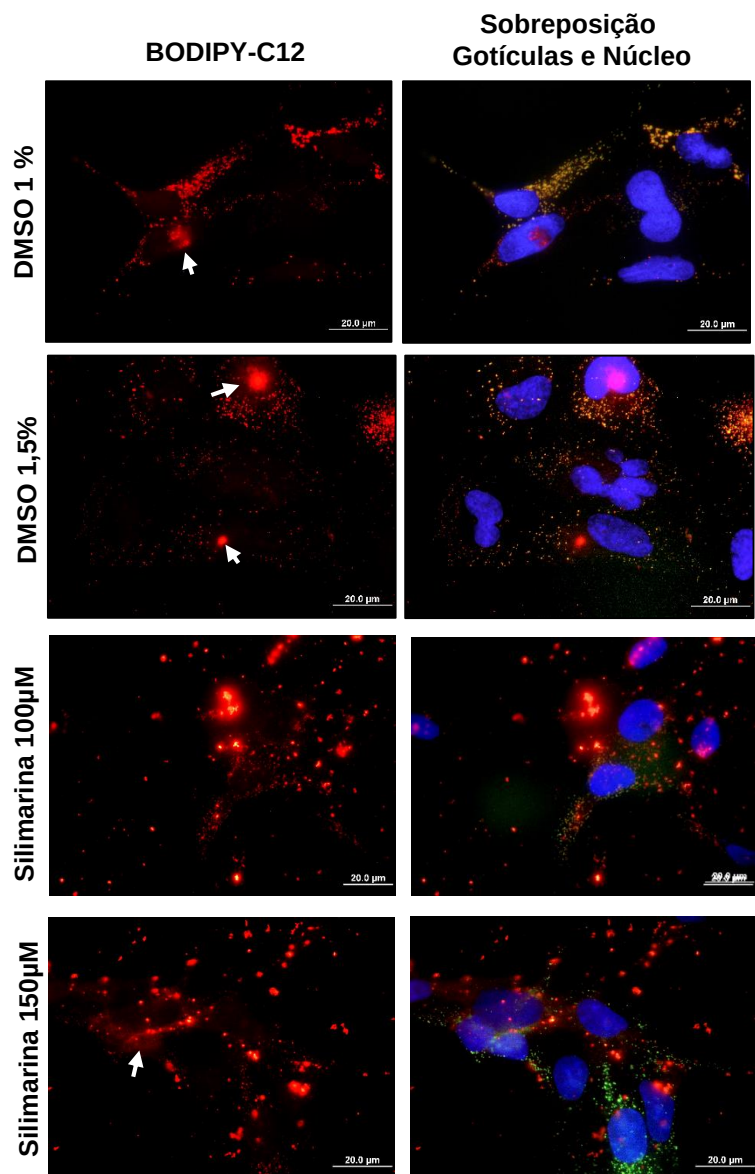
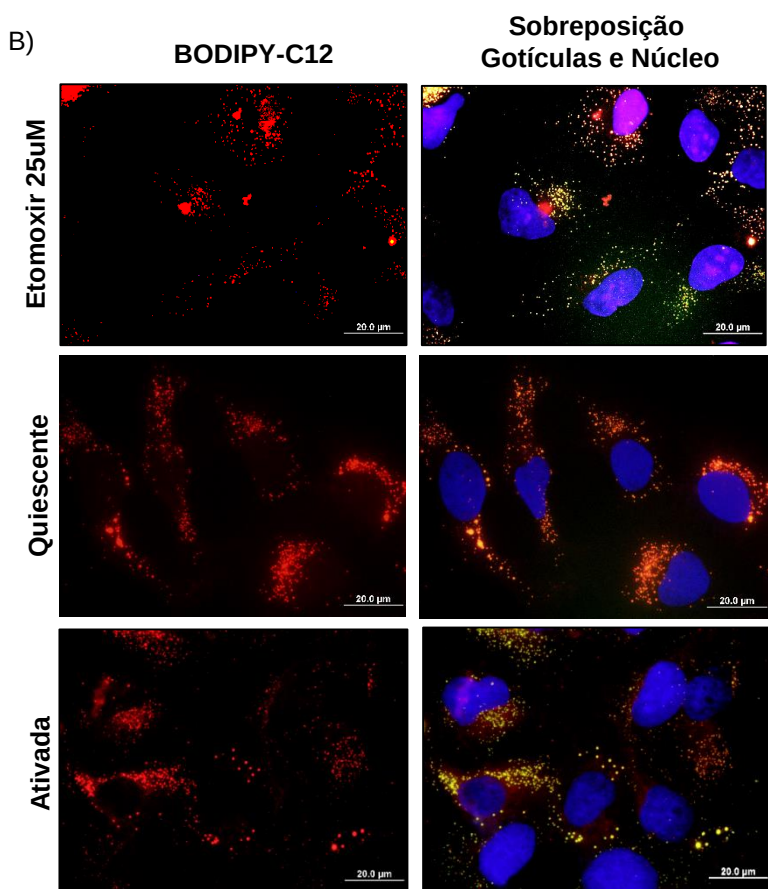
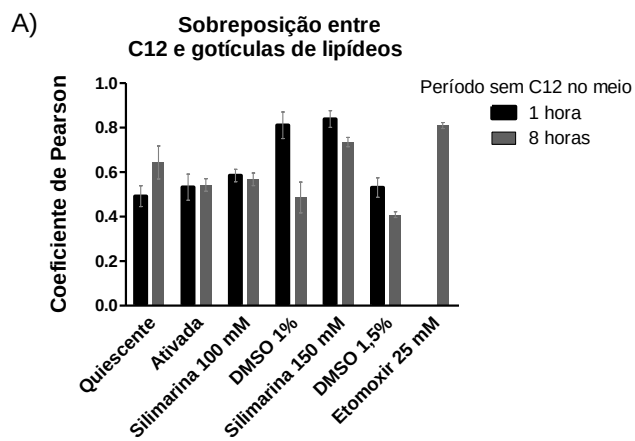


Figura 3

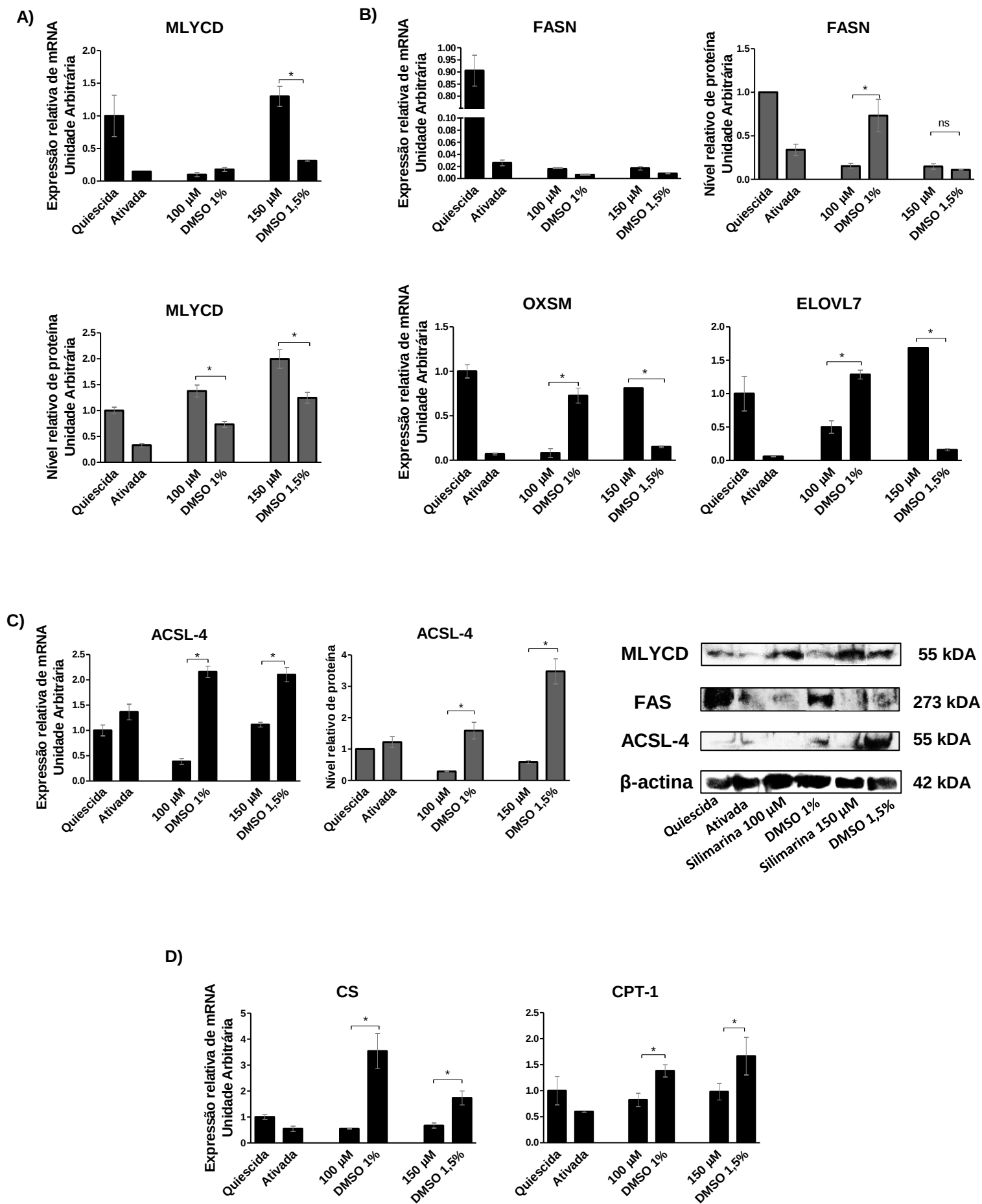


Figura 4

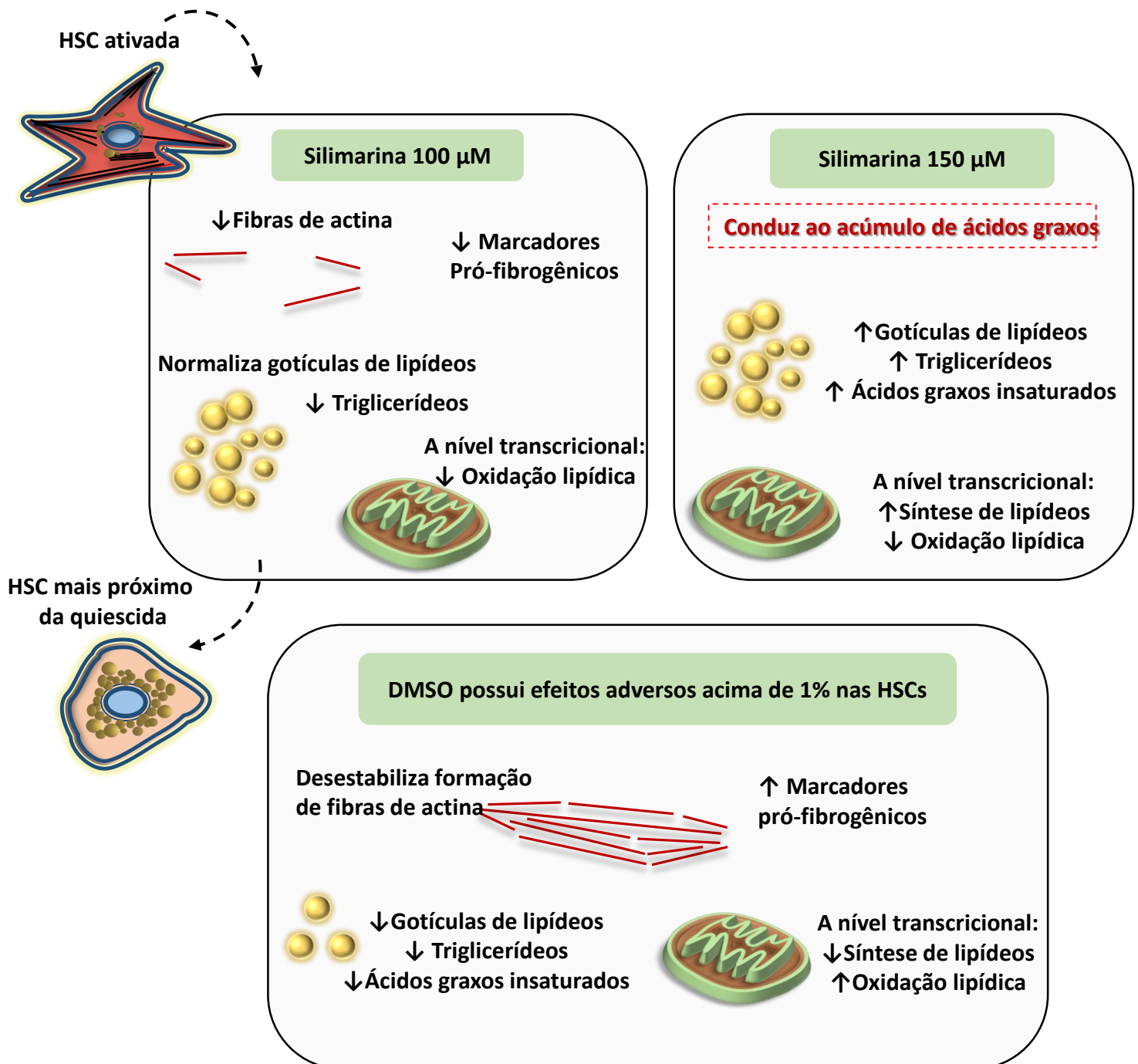


Figura 5

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos usados nos ensaios.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Anti-sense (5'-3')
β-actina	5' - CGGGACCTGACTGACTAC	5'- CTCCTTAATGTCACGCAC
α-SMA	5'- AATCCTGACCCTGAAGTACC	5'- TAGAAAGAGTGGTGCCAGAT
TGF-β1	5'- CCCTGGACACCAACTATTGC	5'- GTCCTTGC GGAAGTCAATGT
Pdgfd	5' - CCCAGGAATTACTCGGTCAA	5' - ACAGCCACAATTCCTCCAC
Col1A2	5' - AGCTGTTGGTAACGCTGGTC	5' - CAGGATTACCAGGAGGTCCA
CS	5' - CCATCCACAGTGACCATGAG	5' - GCTGCAAAGGACAGGTAAGG
Cpt1	5' - ATCGACCCCTCGTTAGGAAT	5' - ATCGACCCCTCGTTAGGAAT
Acsl-4	5' - ATGGATGATTGCAGCACAGA	5' - CTGCTTCTTTGCCAAGTGTG
Mlycd	5' - GACATCTCCAGCAACATCCA	5' - CTGGGTCAAGCTGATGGAAT
Fasn	5' - TCCTGCTGACCAAGAAGTCC	5' - CTTGCTCCTTGAAGCCATCT
Oxsm	5' - TGCTGCTTATGTGCCAAGAG	5' - ATGGTGGGAGAAGACATGGA
Elovl7	5' - TAGCCAAGTGACTTTCCTTC	5' - CTGTATTTAGAAGGGCATGG
Atgl	5' - GGTGGCATTTCAGACAACCT	5' - GATGTTGGTGGAGCTGTCCT

Referências

- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. M. L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 3, p. 14, 2007.
- ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, v. 49, n. 12, p. 1405–1418, 2015.
- ASMIS, L. et al. DMSO inhibits human platelet activation through cyclooxygenase-1 inhibition. A novel agent for drug eluting stents? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 4, p. 1629–1633, 2010.
- BAIOCCHINI, A. et al. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.
- BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1942, 2017.
- BLANER, W. S. et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 467–473, 2009.
- CHAUDHARY, G. D. et al. Herbs as liver savers – A review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 1, p. 397–408, 2010.
- CHIN, Y.-W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E239-53, 2006.
- CICHOŻ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 25, p. 8082–8091, 2014.
- CLICHICI, S. et al. Silymarin Inhibits the Progression of Fibrosis in the Early Stages of Liver Injury in CCl 4 -Treated Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 3, p. 290–298, 2015.
- 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. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 411, n. 1–2, p. 363–371, 2016.
- DA VIOLANTE, G. et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1600–1603, 2002.
- DAVIS, B. H.; KRAMER, R. T.; DAVIDSON, N. O. Retinoic acid modulates rat ITO cell-proliferation, collagen, and transforming growth-factor-beta production. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, p. 2062–2070, 1990.
- DE OLIVEIRA DA SILVA, B. et al. Altered global microRNA expression in hepatic stellate cells LX-2 by angiotensin-(1–7) and miRNA-1914-5p identification as regulator of pro-fibrogenic elements and lipid metabolism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 98, p. 137-155, 2018.
- DUAN, N.-N.; LIU, X.-J.; WU, J. Palmitic acid elicits hepatic stellate cell activation through inflammasomes and hedgehog signaling. **Life Sciences**, v. 176, p. 42–53, 2017.

- EBRAHIMI, H.; NADERIAN, M.; SOHRABPOUR, A. A. New concepts on reversibility and targeting of liver fibrosis; a review article. **Middle East Journal of Digestive Diseases**, v. 10, n. 3, p. 133–148, 14 2018.
- EL-NAHAS, A. E. et al. Silymarin-loaded Eudragit nanoparticles: formulation, characterization, and hepatoprotective and toxicity evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3076–3086, 17 2017.
- EZHILARASAN, D. et al. Silibinin inhibits proliferation and migration of human hepatic stellate lx-2 cells. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 6, n. 3, p. 167–174, 2016.
- EZHILARASAN, D. et al. Silibinin induces hepatic stellate cell cycle arrest via enhancing p53/p27 and inhibiting Akt downstream signaling protein expression. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v. 16, n. 1, p. 80–87, 2017.
- FENG, B. et al. Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. **Free Radical Research**, v. 50, n. 3, p. 314–327, 2016.
- FERENCI, P. et al. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis c not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1561–1567, 2008.
- FISCHER, E.; SPEIER, A. Darstellung der Ester. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 28, n. 3, p. 3252–3258, 1985.
- HEBLING, J. et al. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. **Dental Materials**, v. 31, n. 4, p. 399–405, 2015.
- HERNÁNDEZ-GEA, V. et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. **Gastroenterology**, v. 142, n. 4, p. 938–946, 2012.
- HIGASHI, T.; FRIEDMAN, S. L.; HOSHIDA, Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 27–42, 2017.
- HUANG, Y.; DENG, X.; LIANG, J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis. **Experimental Cell Research**, v. 352, n. 2, p. 420–426, 2017.
- JING, X. Y. et al. Roles of the lipid metabolism in hepatic stellate cells activation. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 28, n. 4, p. 233–236, 2013.
- KOLAH, K. et al. Real-Time Tracking of BODIPY-C12 long-chain fatty acid in human term placenta reveals unique lipid dynamics in cytotrophoblast cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.
- LA GRANGE, L. et al. Protective effects of the flavonoid mixture, silymarin, on fetal rat brain and liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 1, p. 53–61, 1999.
- LEE, Y.-S. et al. Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3710, 2017.
- LEE, Y. A.; WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. **Gut**, v. 64, n. 5, p. 830–841, 2015.
- LI, Y. et al. Saturated Fatty Acid Combined with Lipopolysaccharide Stimulates a Strong Inflammatory Response in Hepatocytes in vivo and in vitro. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 10, 2018.
- MANSOURI, A.; GATTOLLIAT, C.-H.; ASSELAH, T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, p. 629–647, 2018.

- MOLENAAR, M. R.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B. Some Lipid Droplets Are More Equal Than Others: Different Metabolic Lipid Droplet Pools in Hepatic Stellate Cells. **Lipid Insights**, v. 10, p. 1–3, 2017.
- MORRY, J.; NGAMCHERDTRAKUL, W.; YANTASEE, W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. **Redox Biology**, v. 11, p. 240–253, 2017.
- 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.
- NOYAN, S.; CAVUSOGLU, I.; ZEHRA MINBAY, F. The effect of vitamin A on CCl₄-induced hepatic injuries in rats: A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. **Acta Histochemica**, v. 107, n. 6, p. 421–434, 2006.
- RAMBOLD, A. S.; COHEN, S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. **Developmental Cell**, v. 32, n. 6, p. 678–692, 2015.
- REEVES, HELEN, L.; FRIEDMAN, S. L. Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 808–826, 2002.
- ROBERTO, M. M. et al. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 9–15, 2016.
- RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ, R.; SÁNCHEZ GARCÍA, A. M.; LÓPEZ-ALARCÓN, M. Coexisting role of fasting or feeding and dietary lipids in the control of gene expression of enzymes involved in the synthesis of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. **Gene**, v. 496, n. 1, p. 28–36, 2012.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, p. 671–675, 2012.
- SCHUPPAN, D. et al. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. **Matrix Biology**, v. 68–69, p. 435–451, 2018.
- SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838–851, 2008.
- SIDDIQUI, M. et al. Comparative effectiveness of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) and Glycerol as cryoprotective agent in preserving Vero cells. **The Bangladesh Veterinarian**, v. 32, n. 2, p. 35–41, 2015.
- SONG, Y. M. et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. **Autophagy**, v. 8, n. 7, p. 1085–1097, 2012.
- TASCHLER, U. et al. Adipose triglyceride lipase is involved in the mobilization of triglyceride and retinoid stores of hepatic stellate cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 7, p. 937–945, 2015.
- TESTERINK, N. et al. Replacement of retinyl esters by polyunsaturated triacylglycerol species in lipid droplets of hepatic stellate cells during activation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
- THOMFORD, N. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

- TRAPPOLIERE, M. et al. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1102–1111, 2009.
- TRAUTWEIN, C. et al. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. S1, p. S15–S24, 2015.
- TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine**, v. 6, n. 1, p. 24–27, 1969.
- TUOHETAHUNTILA, M. et al. Role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 in formation of polyunsaturated lipid species in hepatic stellate cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 2, p. 220–230, 2015.
- TUOHETAHUNTILA, M. et al. ATGL and DGAT1 are involved in the turnover of newly synthesized triacylglycerols in hepatic stellate cells. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 7, p. 1162–1174, 2016.
- TZENG, J. I. et al. Silymarin decreases connective tissue growth factor to improve liver fibrosis in rats treated with carbon tetrachloride. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 7, p. 1023–1028, 2013.
- VARGAS-MENDOZA, N. et al. Hepatoprotective effect of Silymarin. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 3, p. 1–18, 2014.
- VECCHIONE, G. et al. Silybin counteracts lipid excess and oxidative stress in cultured steatotic hepatic cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 26, p. 6016–6026, 2016.
- WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis and the microenvironment: Fertile soil for hepatocellular carcinoma development. **Gene Expression**, v. 16, p. 77–84, 2014.
- WEI, Y. et al. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 2, p. 275–281, 2006.
- WEISKIRCHEN, R. Hepatoprotective and Anti-fibrotic Agents: It's Time to Take the Next Step. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–40, 2016.
- WEN, Z. et al. Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Administration of Milk Thistle Extract. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 1, p. 65–72, 2007.
- 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.
- YONEDA, A. et al. Vitamin A and insulin are required for the maintenance of hepatic stellate cell quiescence. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 8–17, 2016.
- YOON, Y. J.; FRIEDMAN, S. L.; LEE, Y. A. Antifibrotic Therapies: Where Are We Now? **Seminars in Liver Disease**, v. 36, n. 1, p. 83–98, 2016.
- YUAN, C. et al. Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- ZHANG, S.; YANG, Y.; LIANG, Z.; DUAN, W.; YANG, J.; YAN, J.; WANG, N.; FENG, W.; DING, M.; NIE, Y.; JIN, Z. Silybin-mediated inhibition of notch signaling exerts antitumor activity in human hepatocellular carcinoma cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

ZENG, X. et al. Dimethyl sulfoxide decrease type-i and -iii collagen synthesis in human hepatic stellate cells and human foreskin fibroblasts. **Advanced Science Letters**, v. 3, n. 4, p. 496–499, 2010.

CAPÍTULO II. Silimarina retorna metabolismo de lipídeos à homeostase em co-cultivo de células hepáticas (HepG2) e CEHs (LX-2) controlando efeito de acúmulo de ácidos graxos ocasionado pelo DMSO

Resumo

O metabolismo de lipídeos é de grande importância para a manutenção da homeostase hepática. Alterações que descontrolam esse metabolismo e conduzam ao acúmulo de gordura podem acarretar quadros patológicos como a esteatose. Como observado anteriormente, o DMSO apresenta a capacidade de reduzir drasticamente os níveis de lipídeos nas células estreladas hepáticas (LX-2). Tratamentos com 150 μ M de silimarina revertem esses efeitos nas células LX-2, conduzindo-as ao acúmulo de ácidos graxos insaturados e triglicerídeos. Para confirmar que esse acúmulo de ácidos graxos é uma maneira encontrada pelas células de manter a homeostase, um modelo de co-cultivo entre células hepáticas (HepG2) e células estreladas hepáticas (LX-2) foi proposto. O objetivo desse trabalho foi demonstrar que 150 μ M de silimarina é capaz de reverter os efeitos negativos do DMSO no metabolismo de lipídeos nas co-culturas sem ocasionar o aumento excessivo nos níveis de ácidos graxos. Os resultados demonstram que no co-cultivo o DMSO eleva os níveis de ácidos graxos, não altera a quantidade de gotículas de lipídeos e elevam a expressão de genes relacionados à síntese de lipídeos. Inversamente o tratamento com 150 μ M de silimarina reduz a quantidade de ácidos graxos e normaliza a expressão da maioria dos genes em relação ao controle. Considerando que o acúmulo de lipídeos em células hepáticas é prejudicial, é concluído que o DMSO possui efeitos negativos para células hepáticas. Ao mesmo tempo, evidencia-se que a silimarina tem elevado potencial medicinal auxiliando na hepatoproteção contra agentes tóxicos ao fígado.

Palavras-chave: Hepatoproteção, metabolismo lipídico, gotículas lipídicas, co-cultura

Abstract

Liver metabolism has great significance in maintaining hepatic homeostasis. Changes that disrupt this metabolism and conduct to accumulation of fat can lead to pathological conditions such as steatosis. In the previous chapter, as demonstrated, DMSO dramatically reduced lipid levels in hepatic stellate cells (LX-2). Treatments with 150 μ M silymarin reverted these effects to LX-2 cells, leading to the accumulation of unsaturated fatty acids and triglycerides. To confirm that this accumulation of fatty acids was an approach found by the cells to maintain homeostasis, a model of co-cultivation between hepatic cells (HepG2) and hepatic stellate cells (LX-2) has been proposed. The aim of this study was to demonstrate that 150 μ M of silymarin is able to reverse the negative effects of DMSO on lipid metabolism in the co-cultures without causing an excessive increase in fatty acid levels. The results demonstrate that in the co-culture the DMSO treatments increases the levels of fatty acids, and does not alter the amount of lipid droplets, then elevates the expression of genes related to lipid synthesis. On the other hand, the treatment with 150 μ M of silymarin reduces the amount of fatty acids and normalizes the expression of most genes in relation to the control. Whereas the accumulation of lipids in liver cells is harmful, it is concluded that the DMSO has negative effects on liver cells. At the same time, it is evident that the silymarin has a high medicinal potential, aiding in hepatoprotection against liver toxicants.

Key words: Hepatoprotection, lipid metabolism, lipid droplets, co-culture

1. Introdução

O metabolismo lipídico é de grande importância para a manutenção da homeostase hepática. Sabe-se que o desequilíbrio nesse metabolismo pode conduzir: (1) ao acúmulo de gordura no fígado e acarretar quadros patológicos como resistência à insulina e esteatose hepática (RECCIA et al., 2017); (2) à redução excessiva nos níveis lipídicos através de processos oxidativos, podendo gerar ácidos graxos livres e conduzir as células para processos inflamatórios, alterações mitocondriais, estresse oxidativo e sinalização apoptótica (LI et al., 2016; MANSOURI; GATTOLLIAT; ASSELAH, 2018). Essas alterações lipídicas podem agravar quadros clínicos conduzindo à cirrose ou câncer de fígado.

Como observado no capítulo anterior, o dimetil-sulfóxido (DMSO) apresenta uma elevada capacidade de redução nos níveis de lipídeos nas células LX-2. Essa redução é ocasionada por uma modulação negativa nos níveis transcricionais de genes relacionados com síntese e alta expressão de genes que indicam oxidação de ácidos graxos (AGs).

Embora o DMSO seja muito utilizado em ensaios celulares é descrita sua toxicidade em diversos tipos de células (DA VIOLANTE et al., 2002; SINGH; MCKENZIE; MA, 2017; YI et al., 2017). Além de sua toxicidade, é visto que em linfócitos o DMSO reduz a taxa de proliferação dessas células alterando fatores de crescimento como $TNF\alpha$ (DE ABREU COSTA et al., 2017). A toxicidade do DMSO é ampla e os autores Yuan et al., (2014) demonstraram que em células neuronais a molécula danifica a mitocôndria reduzindo sua funcionalidade e alterando seu potencial de membrana, o que conduz a produção de espécies reativas ao oxigênio (YUAN et al., 2014). Em relação ao metabolismo de lipídeos, o grupo de Song et al., (2012) demonstra que o DMSO é capaz de reduzir os níveis de lipídeos em células hepáticas (HepG2) tratadas com elevadas doses de palmitato através de mecanismos de autofagia.

Nesse sentido, foi observado anteriormente, que o tratamento com 150 μM de silimarina reverte o efeito do DMSO e como estratégia celular eleva os níveis de ácidos graxos aumentando a sinalização gênica de síntese. Para confirmar os efeitos hepatoprotetores da silimarina e seu potencial na modulação do metabolismo lipídico foi utilizado um modelo de co-cultivo com hepatócitos (HepG2) e CEHs (LX-2). Enquanto que culturas celulares em monocamada permitem uma investigação precisa de mecanismos, experimentos com co-cultivos demonstram análises mais integrativas, visto a capacidade de simular o microambiente celular (MIKI et al., 2012).

Foi hipotetizado que a silimarina seja capaz de reverter os efeitos negativos do DMSO no metabolismo de lipídeos nas co-culturas sem ocasionar o aumento excessivo nos níveis de

ácidos graxos. Sendo assim, de maneira mais integrativa, através do co-cultivo, foi investigado os efeitos da silimarina no metabolismo lipídico.

2. Métodos

Para analisar os efeitos hepatoprotetores da silimarina de maneira mais abrangente foi estabelecido um modelo de co-cultivo entre as células LX-2 e HepG2 (ATCC® HB-8064) adaptando o protocolo descrito em Song et al., (2016). A proporção entre células no co-cultivo foi definido em 7:3 (HepG2:LX-2), visto que, as células estreladas hepáticas representam entre 5-8% das células presentes no fígado. Os experimentos foram realizados com células HepG2 que são hepatócitos derivados de hepatocarcinoma, contudo, essas células preservam diversas características genótípicas encontradas em hepatócitos normais (GERETS et al., 2012).

Para a realização de todos os ensaios, células LX-2 ativadas e HepG2 foram cultivadas separadamente em meio de cultivo DMEM, somente na presença de 10% SBF. As células foram mantidas em estufa à 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Previamente à realização dos tratamentos com 150 µM de silimarina e 1,5% de DMSO, ambas as linhagens foram tripsinizadas e contadas. Em seguida, respeitando as proporções estabelecidas, as células foram cultivadas conjuntamente em garrafas plásticas por 24 horas para adesão ao plástico. Os tratamentos com os compostos foram realizados em seguida, por 24 horas de acordo com o descrito no *item 2.2 do capítulo 1*.

Posteriormente, foram analisados os níveis de gotículas lipídicas, concentrações dos ácidos graxos (palmitico, oleico e araquidônico) por GC/MS e os níveis transcricionais de genes relacionados com a síntese e início de processos oxidativos. As análises foram realizadas tanto para as células HepG2, quanto para o co-cultivo. Os métodos seguiram os protocolos descritos nos itens 2.4, 2.8 e 2.6 do *capítulo 1*, respectivamente.

Para a interpretação dos resultados a análise estatística ANOVA foi realizada para cada grupo de células separadamente (HepG2 e Co-cultivo). O teste post-hoc de *Tukey* foi realizado para comparar a estatística entre cada tratamento, o asterisco (*) sobre as barras indicam significância estatística com o controle. O valor de significância estatística $p > 0,05$ foi adotado para ambos os testes. Os gráficos foram construídos comparativamente entre os dois grupos de células, contudo, para a expressão gênica os níveis relativos foram normalizados entre o controle de cada tipo celular.

3. Resultados

3.1 LX-2 modula o metabolismo lipídico do co-cultivo: silimarina e DMSO possuem efeitos antagônicos

Inicialmente, abordando unicamente as células HepG2, observa-se que os tratamentos com silimarina e DMSO não são capazes de alterar aspectos celulares como as concentrações de ácido palmítico e oleico. Com exceção, a silimarina é capaz de reduzir os níveis de ácido araquidônico nessas células (Figura 1A). A quantidade de gotículas de lipídeos nessas células não são alteradas com os tratamentos (Figura 1B).

Contudo, os ensaios celulares realizados evidenciam o forte efeito modulador que as CEHs (LX-2) possuem no metabolismo lipídico. O co-cultivo de células HepG2 conjuntamente com as LX-2 estimulam um aumento nas concentrações de ácido palmítico e oleico, enquanto que, há uma redução no ácido araquidônico (Figura 1A). Os resultados mostram também, uma drástica redução nos níveis de gotículas armazenadas no citoplasma do co-cultivo quando comparada às células HepG2 cultivadas sozinhas (Figura 1B).

Observando exclusivamente o co-cultivo, os resultados mostram que o tratamento com DMSO é capaz de elevar as concentrações de todos os ácidos graxos analisados em relação ao controle. Ao mesmo tempo, os tratamentos com silimarina reduzem drasticamente os níveis desses AGs (Figura 1A). Observando-se os níveis de gotículas, apesar do DMSO elevar os níveis de AGs não há um aumento na quantidade de gotículas em relação ao controle. Nesse sentido, a silimarina eleva o número de gotículas presentes no citoplasma em relação ao controle da co-cultura (Figura 1B).

3.2 Silimarina retorna atividade transcricional à homeostase no co-cultivo

Ao contrário do observado, nos ensaios celulares, tanto o DMSO quanto a silimarina reduzem a quantidade de moléculas de mRNA relacionados a síntese de lipídeos (Figura 1C). Em relação aos genes que demonstram atividade mitocondrial, há uma redução nos níveis de CS e ACSL-4 para ambos os tratamentos. Contudo, para o gene CPT-1 a silimarina é responsável pelo aumento da expressão em relação ao controle (Figura 1D).

Os resultados da expressão gênica para o co-cultivo demonstram um alinhamento com o observado nos ensaios celulares. Para o grupo de células tratadas com o DMSO, todos os genes analisados relacionados com a síntese lipídica tiveram seus níveis transcricionais elevados em relação ao controle. Da mesma maneira, é observado o efeito da silimarina normalizando ou reduzindo a expressão desses genes (Figura 1C). Em relação aos genes que indicam atividade mitocondrial é visto: (1) para o gene CS o tratamento com DMSO eleva sua expressão, enquanto

que a silimarina reduz próximo ao encontrado no controle; (2) o gene *ACSL-4* não possui alterações significativas em relação ao controle; (3) o gene *CPT-1* em ambas as condições de tratamento possuem uma leve redução em seu nível transcricional (Figura 1D).

4. Discussão

No trabalho anterior, foi observado os efeitos do DMSO (1,5%) e da silimarina (150 μ M) no metabolismo lipídico das células LX-2. Sendo assim, para confirmar o potencial hepatoprotetor da silimarina contra os efeitos do DMSO no metabolismo de lipídeos, um modelo de co-cultivo de células hepáticas foi estabelecido para análises mais integrativas.

Observa-se que as CEHs (LX-2) apresentam uma elevada capacidade de modulação do metabolismo lipídico, visto que, a monocultura de HepG2 não respondeu aos ensaios celulares com o solvente e a silimarina.

Inversamente ao observado nas monoculturas de LX-2, o DMSO eleva os níveis de ácidos graxos nos co-cultivos. É descrito na literatura, que um aumento nos níveis de lipídeos no fígado em especial nos hepatócitos pode iniciar uma sinalização fibrogênica e inflamatória (WOBSER et al., 2009). Além disso, sabe-se que o acúmulo crônico de lipídeos no fígado pode provocar o surgimento de patologias como esteatose hepática (RECCIA et al., 2017). Na literatura, também é descrito que o acúmulo de ácidos graxos saturados como o palmítico conduz células hepáticas à lipoapoptose através da despolarização da membrana mitocondrial (MALHI et al., 2006). Sendo assim, a silimarina se mostra protetora reduzindo esses ácidos graxos e elevando os níveis de gotículas de lipídeos.

Comparativamente ao encontrado no capítulo anterior, os tratamentos com silimarina na LX-2 também demonstram um aumento nas quantidades de gotículas e nos níveis de triglicerídeos. Sabe-se que o acúmulo de ácidos graxos livres em forma de triglicerídeos (lipídeos neutros) auxilia na prevenção de um ambiente lipotóxico (LISTENBERGER et al., 2003). Sugere-se então, que em relação ao co-cultivo a maior quantidade de gotículas de lipídeos presente é uma indicação de que a célula está armazenando lipídeos de forma neutra, não permitindo que ácidos graxos livres causem estresse oxidativo às células (GRASSELLI et al., 2016; LISTENBERGER et al., 2003).

Em relação ao ácido araquidônico, o AG é precursor de moléculas como eicosanoides e prostaglandinas que podem gerar moléculas pró-inflamatórias (TUOHETAHUNTILA et al., 2015). Além disso, ácidos graxos de cadeia longa são moléculas essenciais para a formação de membranas e moléculas sinalizadoras (HARAYAMA; RIEZMAN, 2018). Como observado no capítulo anterior, a monocultura de LX-2 cultivada com 150 μ M de silimarina elevava suas

concentrações de ácido araquidônico. No presente trabalho, observa-se que a silimarina reduz os níveis desse AG tanto na monocultura de HepG2 como no co-cultivo. Sabe-se que a silimarina apresenta um efeito anti-inflamatório inibindo a via de NF- κ B e *FOXO* (LOVELACE et al., 2015). É visto também, que a silimarina tem efeito direto na redução do ácido araquidônico em plaquetas sanguíneas, inibindo a via metabólica da enzima ciclo-oxigenase (COX) (BIJAK; SALUK-BIJAK, 2017). Sugere-se então, que o acúmulo de ácido araquidônico em conjunto com o aumento nos níveis de triglicerídeos na LX-2 foi uma forma de hepatoproteção modulada pela silimarina. Visto que uma redução drástica nos níveis de lipídeos forçadas pelo DMSO poderiam aumentar os níveis de ácidos graxos livres que gerariam um ambiente lipotóxico para as células.

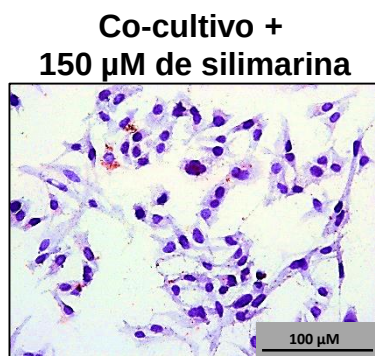
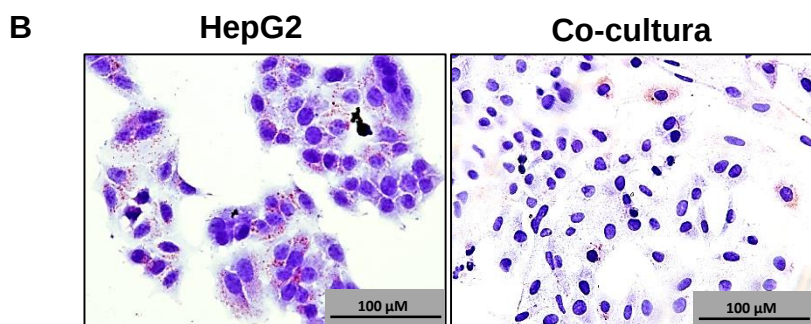
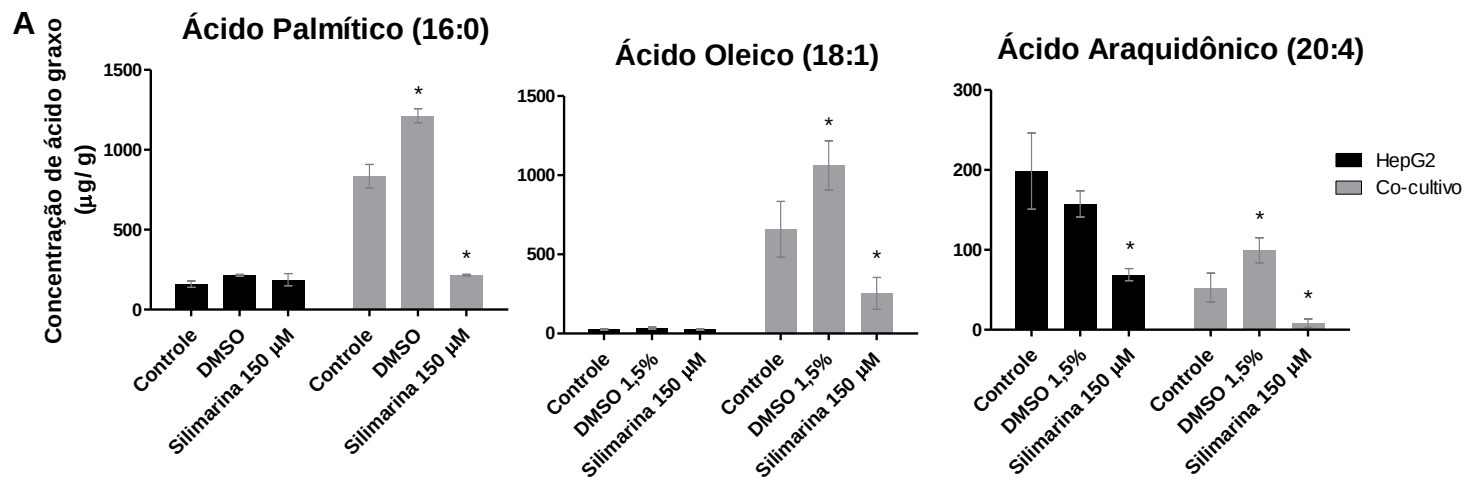
Os níveis transcricionais dos genes de síntese e oxidação lipídica na monocultura de HepG2 não correspondem ao observado nos ensaios celulares. A linhagem celular HepG2 mesmo amplamente aceita como modelo de hepatócito é uma linhagem tumoral, nesse sentido, essas células são capazes de modular seu metabolismo para sobreviver (CURRIE ET AL., 2013; RÖHRIG; SCHULZE, 2016). Contudo, quando as células são cultivadas em conjunto com as LX-2 o encontrado na expressão gênica corresponde com o encontrado nos ensaios celulares. Novamente, demonstrando o forte efeito modulador das CEHs sobre o metabolismo lipídico.

Levando em consideração que a linhagem HepG2 é tumoral, o tratamento com silimarina como observado reduz a sinalização de síntese e os níveis de ácidos graxos. Nesse cenário, a silimarina poderia auxiliar no controle do metabolismo energético, o que para o câncer pode reduzir a proliferação celular. É descrito na literatura que a silimarina é capaz de ativar vias de apoptose, reduzir migração e adesão em células HepG2 (ZHANG et al., 2013).

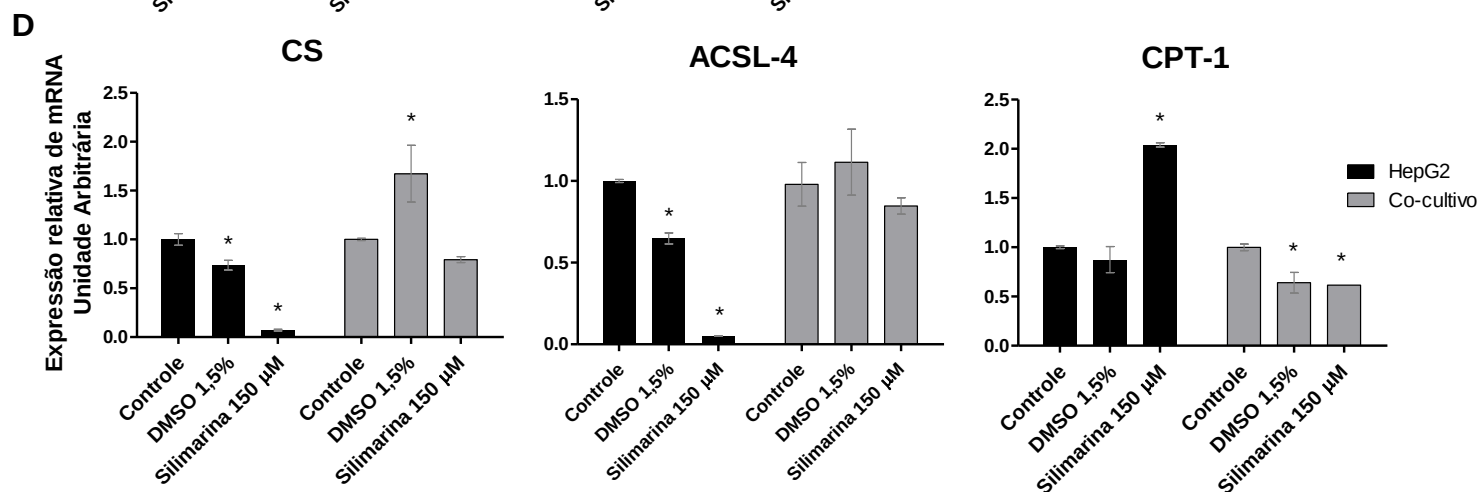
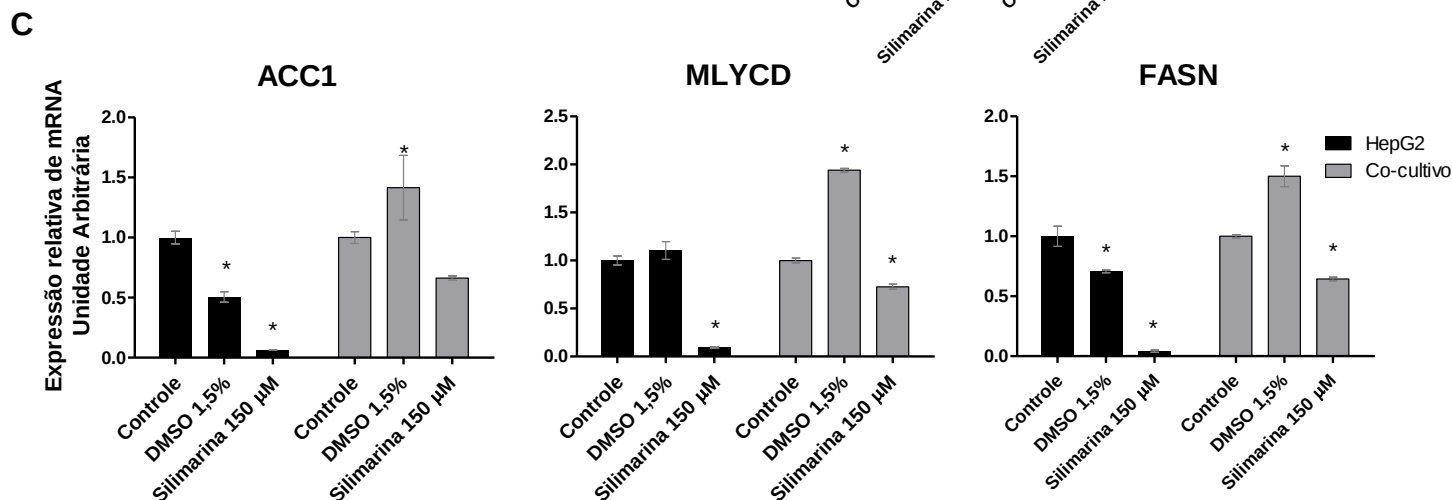
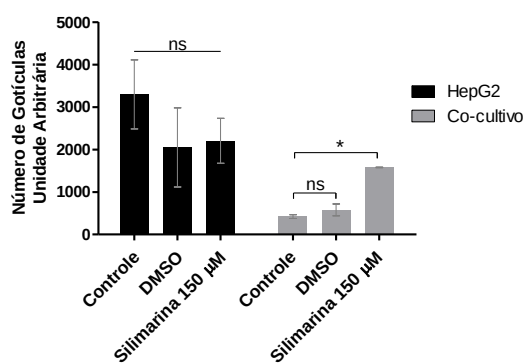
Por fim, os resultados em conjunto auxiliam na afirmação de que o DMSO possui efeitos negativos para células hepáticas. E ao mesmo tempo, evidenciam que a silimarina tem elevado potencial medicinal auxiliando na hepatoproteção contra agentes tóxicos ao fígado. Nesse contexto, a silimarina pode ser um agente utilizado em conjunto com outras terapias, auxiliando contra efeitos adversos de medicamentos ao fígado.

Legenda da Figura

Figura 1. Efeitos da silimarina e DMSO na modulação do metabolismo de lipídeos em culturas de HepG2 e co-cultivo (HepG2:LX-2). A) Quantificação de ácidos graxos intracelulares por GC/MS nos diferentes grupos de células. B) Distribuição das gotículas de lipídeos marcadas com *Red Oil* e quantificação relativa para ambas as células. C) Perfil transcricional de genes relacionados com a síntese de lipídeos. D) Expressão de genes relacionados com o início da β -oxidação. Os gráficos apresentados representam a média e o desvio padrão dos experimentos e possuem valor de $p < 0,05$. O asterisco (*) sob as barras indicam significância estatística com o controle.



Quantificação gotículas lipídicas



Referências

- BIJAK, M.; SALUK-BIJAK, J. Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.
- CURRIE, E.; SCHULZE, A.; ZECHNER, R.; WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153–161, 2013.
- DA VIOLANTE, G. et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1600–1603, 2002.
- DE ABREU COSTA, L. et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- α , IFN-, and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–10, 2017.
- GERETS, H. H. J. et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 69–87, 2012.
- GRASSELLI, E. et al. Triglyceride mobilization from lipid droplets sustains the anti-steatotic action of iodothyronines in cultured rat hepatocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.
- HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 281–296, 2018.
- LI, S. et al. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–21, 2016.
- LISTENBERGER, L. L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 6, p. 3077–3082, 2003.
- LOVELACE, E. S. et al. Silymarin Suppresses Cellular Inflammation by Inducing Reparative Stress Signaling. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 1990–2000, 2015.
- MALHI, H. et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 17, p. 12093–12101, 2006.

MANSOURI, A.; GATTOLLIAT, C.-H.; ASSELAH, T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, p. 629–647, 2018.

MIKI, Y. et al. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 3–5, p. 68–75, 2012.

RECCIA, I. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. **Metabolism**, v. 72, p. 94–108, 2017.

RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 732–749, 2016.

SINGH, M.; MCKENZIE, K.; MA, X. Effect of dimethyl sulfoxide on in vitro proliferation of skin fibroblast cells. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 1944–328578, 2017.

SONG, Y. et al. Activated hepatic stellate cells play pivotal roles in hepatocellular carcinoma cell chemoresistance and migration in multicellular tumor spheroids. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36750, 2016.

SONG, Y. M. et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. **Autophagy**, v. 8, n. 7, p. 1085–1097, 2012.

TUOHETAHUNTILA, M.; SPEE, B.; KRUITWAGEN, H. S.; WUBBOLTS, R.; BROUWERS, J. F.; VAN DE LEST, C. H.; MOLENAAR, M. R.; HOUWELING, M.; HELMS, J. B.; VAANDRAGER, A. B. Role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 in formation of polyunsaturated lipid species in hepatic stellate cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 2, p. 220–230, 2015.

WOBSER, H. et al. Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. **Cell Research**, v. 19, n. 8, p. 996–1005, 2009.

YI, X. et al. Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 4, p. 485–494, 2017.

YUAN, C. et al. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107447, 19 set. 2014.

ZHANG, S. et al. Silybin-mediated inhibition of notch signaling exerts antitumor activity in human hepatocellular carcinoma cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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