

PUCCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

FABIANA GARBACHI DE OLIVEIRA MENDES OURIQUES

**EFEITO ANTIFIBRÓTICO DO EXTRATO AQUOSO DA *Pluchea sagittalis* (Lam.)
Cabrera SOBRE LINHAGEM CELULAR GRX**

Porto Alegre

2015

FABIANA GARBACHI DE OLIVEIRA MENDES OURIQUES

**EFEITO ANTIFIBRÓTICO DO EXTRATO AQUOSO DA *Pluchea sagittalis* (Lam.)
Cabrerá SOBRE LINHAGEM CELULAR GRX**

Projeto de Pesquisa apresentado como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2015

“Quem anda sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado dos amigos, com certeza vai mais longe.”

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria e satisfação que concluo minha dissertação de mestrado.

Nestes últimos dois anos muitas coisas aconteceram, coisas boas, coisas ruins...que me fizeram refletir depois que tudo passou, que o mais importante na vida é não desistir do que se quer, mesmo que aquilo muitas vezes pareça impossível. O segredo é respirar fundo, levantar a cabeça e trabalhar! E foi o que fiz!

Neste caminho, muitas pessoas especiais estiveram ao meu lado, foram elas peças fundamentais para que eu chegasse até aqui, e é para elas que dedico todo o meu amor, carinho e gratidão!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, que me estendeu a mão, num momento difícil. Obrigada, por confiar em mim, e assumir um compromisso tendo tantas outras coisas. Obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e o senhor é parte essencial desse trabalho.

Aos professores Doutores, membros da banca examinadora, Ana Ligia Bender, Edyane Cardoso Lopes e Pablo Machado pelas importantes contribuições e sugestões que aprimoraram este trabalho.

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que me proporcionou a oportunidade de cursar o Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, seus professores e secretários, em especial a prof^a. Dr^a. Fernanda Morrone por toda atenção e carinho.

Ao Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, seus professores e colaboradores, em especial a prof^a. Dr^a. Fernanda Bordignon que me proporcionaram a realização deste trabalho.

A Paula Caruso, querida reparto contigo a alegria desse momento, esse trabalho não é só meu, é NOSSO. Obrigada por toda dedicação, empenho, carinho e comprometimento com que te dedicastes a este trabalho, sem o qual não teria sido possível sem a tua ajuda. Você esteve ao meu lado durante esses meses e não mediu esforços para me ajudar, sempre com muita paciência e profissionalismo. Como te disse, jamais esquecerei do teu jeitinho, da cultura de células, das nossas GRXs...foi tudo muito bom, foram 4 meses muito intensos que

deixarão saudades e marcas no meu coração. Obrigada por tudo, mas principalmente pela tua amizade e apoio que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Quero em 2018 estar na primeira fila de pé te aplaudindo no dia da tua formatura. Sucesso querida!

A Gabriela Viegas pela atenção, apoio, amizade e profissionalismo. Obrigada.

A Juliana R. Marques, pela ajuda, carinho, pelas palavras de incentivo e principalmente pelo sorriso amigo. Adorei te conhecer JUJU!

Aos colegas do laboratório, Eduardo, Rafinha, João, Bruno, Kelly, Gabriele, Bianca, Henrique, Anderson, obrigada por terem me recebido tão bem! Obrigada, pelo carinho, paciência, companheirismo. Obrigada, pelos ensinamentos, aprendi muito com vocês! Os levarei em meu coração!

Aos meus queridos colegas de mestrado, pelos momentos incríveis que vivemos juntos, foi maravilhoso conhecer e ver o crescimento de cada um.

Aos meus pais, vocês foram essenciais, o alicerce para o meu crescimento, ao longo da vida vocês me conduziram mostrando a cada momento, compreensão, amor, dedicação e paciência. A vocês, todo o meu respeito, gratidão e amor.

Querida mãe, o que seria da minha vida se eu não te tivesse comigo? Não sei. Jamais teria conseguido chegar até aqui! Jamais conseguiria trabalhar e estudar se não tivesse a tua ajuda, cuidando de mim e de minha família em minha ausência. Sempre disposta a ajudar, sempre com aquela palavra de carinho e conforto. Minha parceria incondicional na vida. Obrigada mãe por tudo e por tanto!

Pai me fazes ver todos os dias que nunca é tarde para recomeçar. Depois de uma vida de muito trabalho, depois de formar os filhos, foi atrás do seu sonho e realizou, hoje fazes aquilo que sempre quisestes, ser advogado. Quanto orgulho e admiração sinto por ti!

Ao meu esposo, obrigada pelo amor, parceria e incentivo. Contigo vivi os momentos mais importantes de minha vida! Obrigada pela preocupação em me veres feliz e realizada profissionalmente, sabes o quanto é importante para mim a minha profissão. Obrigada por estes 20 anos de convívio. Te amo.

Ao meu filho João Pedro, amor da minha vida. É por ti para ti que tento cada dia ser melhor. Trouxestes para minha vida e de nossa família muita alegria. O que mais desejo é que tu sejas um homem feliz. Quando for adulto e leres este trabalho a mensagem que quero deixar-te é que o mais importante na vida é se fazer o que se gosta com amor e dedicação, é não desistir frente as adversidades, e se realmente tiveres que desistir, faça com a certeza que tentastes tudo que foi possível. Ame e respeite as pessoas como elas são, saiba valorizar cada

minuto e cada pessoa que entrar em tua vida. Filho amado, o que quero deixar para ti não são bens materiais, é o gosto pela vida, pelas pessoas e pelos estudos, porque somente ele nos abre portas e concretiza sonhos. Te amo infinito.

Ao meu filho do coração Jr., obrigada pelo amor e carinho, obrigada pela confiança que depositastes em mim quando viestes morar conosco. Estarei sempre ao teu lado quando precisares Sinto muito orgulho em ver teu esforço e dedicação nas coisas que fazes. Sempre acreditei que conseguirias!

A meus irmãos, Juliana e Tiago, obrigada por fazerem parte da minha vida! Como é bom olhar para o lado e ver que tenho pessoas tão especiais que me amam e fariam tudo para me ver feliz. Com vocês vivi e vivo momentos maravilhosos!

“Como galhos de uma árvore, todos crescemos em direções diferentes, mas a nossa raiz continua sendo a mesma”

Amo vocês!

Ao meu cunhado Marcelo, pelo carinho, apoio e incentivo sempre! Obrigada compadre!

A Ana Karine, minha querida e grande amiga, a irmã que a vida me deu. Obrigada pela presença constante em minha vida. Obrigada pelo amor, amizade, carinho e companheirismo. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos juntas fossem eles bons ou ruins, tu estavas lá me apoiando. Teu incentivo, tuas palavras dizendo: “vai amiga que tu consegues”, “que orgulho sinto de ti”, com certeza sempre me fortaleceram e impulsionaram, e é por estas palavras e por toda ajuda que me destes que hoje estou concluindo meu Mestrado. Obrigada amiga, por fazer do MEU SONHO o TEU SONHO. Obrigada amiga, por acreditar em mim me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Te amo.

RESUMO

A fibrose hepática apresenta uma patogênese complexa causada por reparo tecidual inadequado devido à deposição de tecido conectivo. Quando um dano crônico acomete o fígado, a resposta regenerativa falha e os hepatócitos são substituídos por matriz extracelular (ECM) excedente. Assim, o desequilíbrio entre a degradação e a produção de ECM acarretará no acúmulo dessas proteínas que alteram a arquitetura normal do fígado e, conseqüentemente, sua funcionalidade. A principal fonte de ECM é a célula estrelada hepática (HSC) ativada. Sendo assim, na tentativa de elucidar possíveis abordagens terapêuticas para a doença, o objetivo desse trabalho foi avaliar a possível ação antifibrótica do extrato aquoso de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera sobre uma linhagem imortalizada de HSC ativadas (GRX). Nossos resultados demonstraram que as concentrações de 0,039 e 0,078 mg/mL do extrato aquoso de *P. sagittalis* foram capazes de diminuir o crescimento e a proliferação celular. Quanto à avaliação do estresse oxidativo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e controle. A coloração com *oil red* (ORO) mostrou aumento significativo do conteúdo lipídico intracelular após 5 dias de tratamento, indicando efeito *in vitro* sobre a mudança fenotípica em linhagem GRX, do estado ativado para o estado quiescente. Esses resultados foram confirmados pela quantificação colorimétrica de lipídios. Em relação à produção de TGF- β 1 e colágeno total, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Concluindo, o extrato aquoso da *P. sagittalis* diminuiu o crescimento e a proliferação das células GRX e induziu a reversão do fenótipo ativado para quiescente. A diminuição na proliferação celular não ocorreu nem por necrose nem por ativação da apoptose e senescência. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o extrato apresenta um efeito antifibrótico, possivelmente pela via que ativa a reversão do fenótipo.

Palavras-chave: Fibrose hepática. Células Estreladas Hepáticas. *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera.

ABSTRACT

Liver fibrosis is a complex disease that is caused by inappropriate tissue repair due to the deposition of connective tissue. When a chronic lesion affects the liver, regenerative response fails and hepatocytes are replaced with abundant extracellular matrix (ECM). The imbalance between production and degradation of ECM will result in the accumulation of proteins that change normal liver architecture, and thus its functionality. The main source of ECM is the activated hepatic stellate cell (HSC). In order, to clarify possible therapeutic approaches to the disease, the this work aimed to evaluate the possible antifibrotic action of *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera on an activated HSC immortalized lineage (GRX). Our results demonstrated that the *P. sagittalis* aqueous extract at 0.039 and 0.078 mg/mL concentrations was able to reduce cell growth and proliferation. Regarding to oxidative stress evaluation, there was no statistically significant difference between the treated group and the control. Staining with OilRed-O (ORO) showed a statistically significant increase in intracellular lipid content after 5 days of treatment, exerting *in vitro* effect on the GRX phenotypic change of activated towards the quiescent state. These results were confirmed by colorimetric quantification of lipid content. Regarding the TGF- β 1 and collagen production, there were no statistically significant differences observed between the groups. In conclusion, the *P. sagittalis* aqueous extract reduces the growth and proliferation of GRX cells and induces the reversal of activated towards a quiescent phenotype. There was no decrease in cell proliferation either by necrosis or by apoptosis via activation of the senescence. Thus, our data suggest that the extract showed an antifibrotic effect, possibly by activating phenotype reversal.

Keywords: Hepatic fibrosis. Hepatic stellate cell. *Pluchea sagittalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	<i>Smooth Muscle α-Actin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Médium</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cells</i>
IL-10	<i>Interleukin-10</i>
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase-9</i>
NMA	<i>Nuclear Morphometric Analysis</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
ORO	<i>OilRed-O</i>
TBARS	<i>Acid Reactive Substances</i>
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Fator</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 FIBROSE HEPÁTICA	10
1.2 CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS.....	11
1.2.1 Localização e função	11
1.2.2 O papel das células estreladas hepáticas na patogênese da fibrose hepática	12
1.3 O PAPEL DE TGF-B1, COLÁGENO NA FIBROGÊNESE HEPÁTICA	13
1.4 A LINHAGEM CELULAR GRX	14
1.5 PLUCHEA SAGITALLIS	15
1.5.1 Características da <i>pluchea sagitallis</i>	15
1.5.2 Uso de plantas medicinais no tratamento da fibrose hepática	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 ARTIGO CIENTÍFICO	20
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIBROSE HEPÁTICA

Dentre as diversas doenças com significativa morbidade e mortalidade, considerada mundialmente como uma questão de saúde pública, está a fibrose hepática (DUVAL *et al.*, 2014a). Há previsão de um aumento da prevalência de doenças hepáticas crônicas, parcialmente devido ao aumento da obesidade e da síndrome metabólica, especialmente em países desenvolvidos (LIM; KIM, 2008).

A fibrose hepática é causada por reparo tecidual inadequado devido à deposição de tecido conectivo, resultante de danos hepáticos crônicos. Dentre esses estão: danos devido ao consumo de álcool, à hepatite viral crônica, a doenças autoimunes, a parasitas, a doenças metabólicas e a toxinas ou outras drogas. Quando não há um controle adequado da fibrose, o resultado pode ser a progressão para a cirrose (DUVAL *et al.*, 2014a). A cirrose é o estágio final da lesão hepática crônica que resulta em uma série de consequências, de modo a produzir um importante impacto na qualidade e na expectativa de vida das pessoas acometidas. Em 2001, estimou-se que 771 mil óbitos deveriam-se à cirrose, e existe previsão de que, em 2020, esta que atualmente é considerada a 14ª principal causa de morte em todo o mundo, ocupará a 12ª posição entre os motivos de óbito (LIM; KIM, 2008). Contrastando com o conceito tradicional de que a cirrose é um estado irreversível, existe evidência significativa de que pode ser reversível (ELLIS; MANN, 2012).

É de extrema importância salientar que, embora muitas vezes utilizados indiferenciadamente, os termos fibrose e cirrose são clinicamente distintos. O primeiro representa um processo de menor importância clínica, com um comprometimento do fígado que não é significativo comparado à cirrose (ELLIS; MANN, 2012).

A fibrose hepática representa uma doença de patogênese complexa. Quando ocorre uma lesão aguda no fígado, as células do parênquima são regeneradas com a finalidade de substituir as células necróticas e apoptóticas. Este processo regenerativo está associado a uma resposta inflamatória e a uma deposição limitada de matriz extracelular (ECM).

Entretanto, quando um dano crônico acomete o fígado, a resposta regenerativa falha e os hepatócitos são substituídos por ECM excedente, cujos compostos são, principalmente, colágeno tipo I, III e IV, fibronectina, elastina, laminina e proteoglicanos. As células

hepáticas estrelas (HSC, do inglês, *Hepatic Stellate Cells*) são as principais fontes de ECM (DUVAL *et al.*, 2014b).

Quanto ao tratamento para a fibrose hepática, ainda não há nenhum padrão, todavia, ações com a finalidade de minimizar o dano hepático, tais como a não ingestão de álcool ou tratamento para hepatite viral, podem controlar a fibrose. Ainda assim, essa abordagem é, muitas vezes, insuficiente para evitar a progressão para a cirrose. Cabe ressaltar que o tratamento da fibrose hepática deveria levar em conta a versatilidade da sua patogênese e atuar sobre todas as vias envolvidas, iniciando com a ativação das HSC e a deposição de ECM (DUVAL *et al.*, 2014a).

1.2 CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS

1.2.1 Localização e função

As HSCs foram descobertas em 1876 por Kuppfer, como sternzellen (célula em forma de estrela) do fígado (HENDERSON; FORBES, 2008), mas somente anos depois foram caracterizadas por Ito e Nemoto (FRIEDMAN, 2008; GEERTS, 2001). Estão localizadas no espaço perissinusoidal de Disse. Seus finos processos citoplasmáticos percorrem esse espaço, englobando a face abluminal do endotélio. Essas células contêm gotículas de gordura e são as responsáveis pelo armazenamento de vitamina A (MCCUSKEY, 1993). A maior parte dessa vitamina, acima de 80%, é captada, armazenada e metabolizada nas HSCs, as quais podem ser identificadas através da autofluorescência (FRIEDMAN, 2008; WINAU *et al.*, 2008).

As células estreladas, que constituem em torno de 15% do número total de células hepáticas (FRIEDMAN, 2000), são as responsáveis pela fibrogênese que ocorre em lesões crônicas do tecido hepático, tais como na cirrose (ROCKEY, 1997). Além das HSCs, fazem parte do conjunto de células hepáticas as células de Kupffer, os hepatócitos, células endoteliais e células epiteliais da via biliar (Figura 1) (VICENTE *et al.*, 1998).

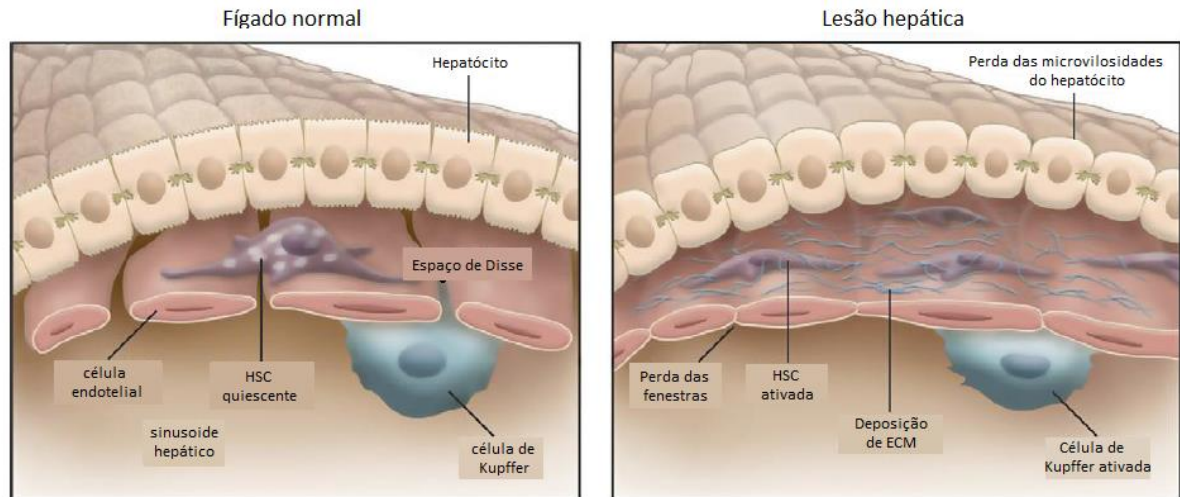


Figura 1 - Função das células residentes no fígado na lesão hepática. As modificações no espaço perissinusoidal de Disse durante o desenvolvimento da fibrose em resposta a algum dano hepático abrangem mudanças tanto no comportamento celular quanto na composição da ECM. A ativação das HSCs leva à síntese de colágeno e, conseqüentemente, à deposição de matriz fibrótica, que é um evento que precede a falência hepática. A ativação das células de Kupffer tem ação parácrina sobre as HSC

Fonte: IREDALE, 2008

Obs.: Adaptado pela autora

1.2.2 O papel das células estreladas hepáticas na patogênese da fibrose hepática

O processo de ativação das HSCs é um evento prévio na fibrogênese hepática. Esse processo leva as células HSCs quiescentes, ricas em vitamina A, a mudarem seu fenótipo para células semelhantes a miofibroblastos. Essas são caracterizadas por apresentarem contratilidade, perda de retinoide, quimiotaxia, proliferação, capacidade de degradação de ECM, ação na fibrogênese, secretação de citocinas pró-inflamatórias e expressão de marcadores para α -actina de músculo liso (α -SMA) (DUVAL *et al.*, 2014b).

A ativação das HSCs é um evento considerado pleiotrópico, uma vez que constitui uma resposta refinadamente programada e ocorre em uma sequência reproduzível. Eventos prévios da ativação fazem parte da etapa denominada de iniciação, também chamada de estágio pré-inflamatório. Nessa etapa, ocorrem eventos transcricionais, estímulo parácrino e modificações iniciais na ECM. A perpetuação, etapa seguinte à ativação, engloba eventos que amplificam o fenótipo ativado através do aumento da expressão e da capacidade de resposta de citocinas. Essa fase da ativação resulta não somente de estímulo parácrino e autócrino, como também do remodelamento acelerado da ECM (Figura 2) (FRIEDMAN, 2000).

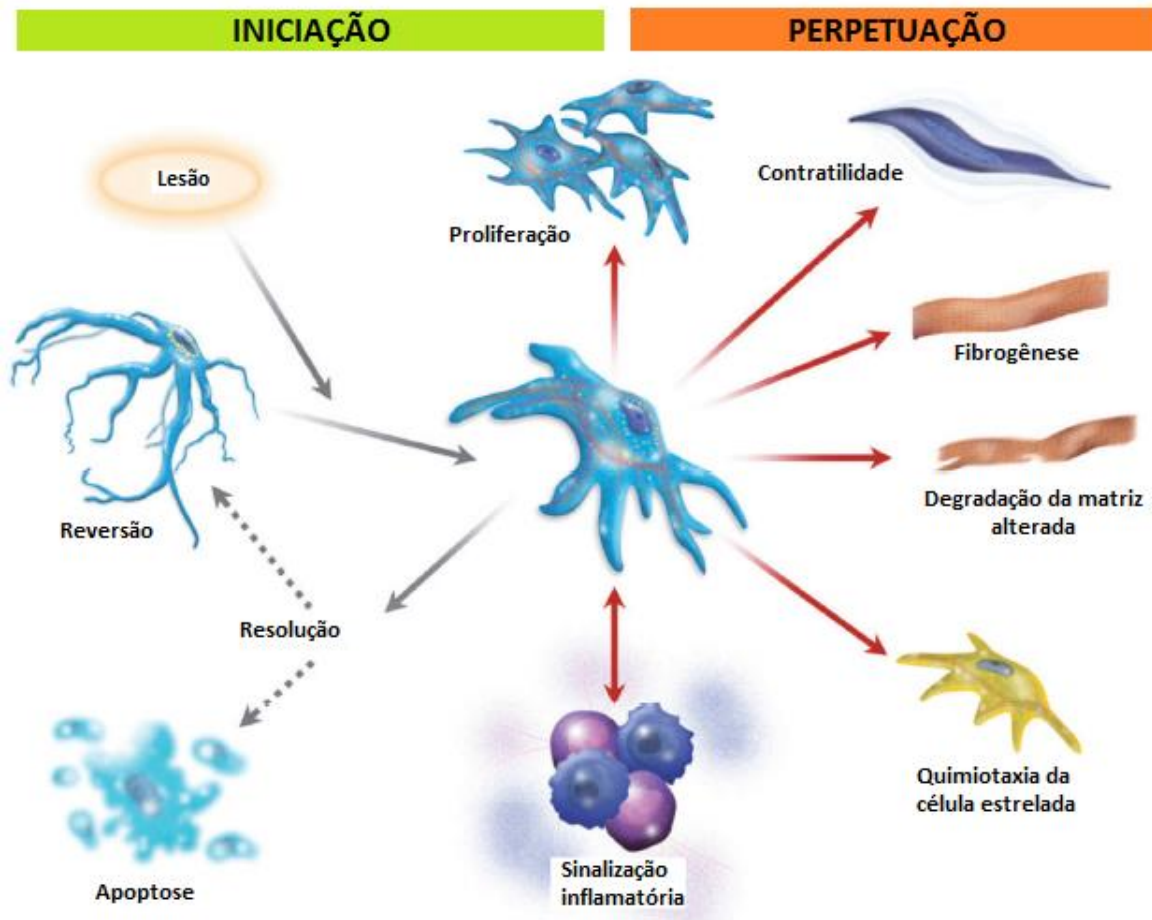


Figura 2 - Caracterização fenotípica da ativação de células estreladas hepáticas (HSC) durante lesão hepática e resolução. Após lesão hepática, as HSCs são submetidas ao processo de ativação, o qual é associado à transição de células quiescentes, ricas em vitamina A, em miofibroblastos contráteis, fibrogênicos e proliferativos. Dentre as principais modificações fenotípicas após a ativação, estão: proliferação, contratilidade, fibrogênese, degradação da matriz extracelular, quimiotaxia, perda do retinol e quimioatração de leucócitos. Durante a resolução da lesão hepática, o destino das HSCs é indefinido, entretanto, pode incluir a reversão ao fenótipo quiescente e/ou a eliminação seletiva por apoptose

Fonte: FRIEDMAN, 2000

Obs.: Adaptado pela autora

1.3 O PAPEL DE TGF- β 1, COLÁGENO NA FIBROGÊNESE HEPÁTICA

Diversos estímulos parácrinos de hepatócitos danificados e outras células vizinhas podem iniciar a ativação das HSCs (FRIEDMAN, 2008). Dentre essas células, estão as células de Kupffer, células imunes e plaquetas. As células de Kupffer expressam o Fator de Transformação do Crescimento (TGF)- β 1, TGF- α , espécies reativas de oxigênio e peróxidos lipídicos. Essas células levam à proliferação celular, à síntese de ECM e à liberação de retinóides e metaloproteinase de matriz (MMP)-9 para síntese de colágeno através da ativação de TGF- β 1 latente (DUVAL *et al.*, 2014a).

O TGF- β 1, que é produzido não somente pelas células de Kupffer, mas também por outras células vizinhas, como as células endoteliais sinusoidais, células epiteliais do ducto biliar e hepatócitos e também pelas HSCs, representa um potente sinal fibrogênico, uma vez que aumenta a produção de colágeno tipo I e outros constituintes da matriz como fibronectina e proteoglicanos (DUVAL *et al.*, 2014a).

As células de Kupffer também possuem a capacidade de inibir a fibrogênese através da produção de interleucina (IL)-10 anti-inflamatória e óxido nítrico (NO), os quais diminuem a síntese de colágeno e aumentam a produção de colagenase. Além disso, reduzem a proliferação e a contratilidade celular a qual, por sua vez, tem influência no controle do fluxo sanguíneo intra-hepático (ROCKEY, 1997).

Dessa forma, todos os estímulos em conjunto são importantes desencadeadores de alterações na composição da ECM que apresenta, principalmente, um aumento de colágenos formadores de fibrilas dos tipos I e III e fibronectina (FRIEDMAN, 2008). Essa nova configuração da ECM induz um novo estímulo fibrogênico, o qual é responsável por exacerbar a fibrose (DUVAL *et al.*, 2014a).

1.4 A LINHAGEM CELULAR GRX

A linhagem celular GRX representa a linhagem de HSC mais antiga existente (HERRMANN; GRESSNER; WEISKIRCHEN, 2007). Essa linhagem foi obtida através de granulomas hepáticos de camundongos da linhagem C3h/HeN infectados com cercarias de *Schistosoma mansoni* (VICENTE *et al.*, 1998; Guimaraes *et al.*, 2006).

As células GRX possuem algumas características de ambos os fenótipos quiescente e ativado, pois encontram-se em estado transicional entre esses dois fenótipos. No entanto, sob condições-padrão de cultivo, expressam o fenótipo de miofibroblastos (representando a HSC ativada), proliferativo e produtor de ECM (SOUZA *et al.*, 2008).

Por apresentarem características morfológicas e bioquímicas das culturas primárias do tecido conjuntivo humano (MONTEIRO; BOROJEVIC, 1987), alto grau de homogeneidade, alta proliferação bem como por serem passíveis de congelamento por longos períodos, esta linhagem celular é considerada um bom modelo de estudo nos processos que envolvem a fibrose hepática (MEANS, 2013).

1.5 PLUCHEA SAGITALLIS

1.5.1 Características da *Pluchea sagittalis*

A *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera é uma planta nativa da América do Sul, compreendendo o sul do Brasil, o Uruguai, o norte da Argentina e o Paraguai. Popularmente, é conhecida como quitoco, madre cravo ou tabacarana (Figura 3) (KISSMANN; GROTH, 1992).

É uma planta anual ou perene, dependendo das condições ambientais. Quanto às suas características morfológicas, é ereta, aromática, herbácea, de caule multialado e quase sem ramificação (LORENZI, 2000). Sua reprodução é por semente e desenvolve-se bem em locais úmidos, inclusive sobre dunas estabilizadas, no litoral. Na Região Sul, floresce durante o verão e início do outono (KISSMANN; GROTH, 1992).

O gênero *Pluchea*, pertencente à família Asteraceae, engloba, aproximadamente, 25.000 espécies no mundo e tem sido utilizado devido a diversas propriedades medicinais (ANDERBERG, 1994; BOTSARIS, 1995). Têm sido descritas importantes propriedades associadas a espécies desse gênero, dentre as quais estão: atividade antioxidante, potencial anti-inflamatório e anti-ulcerogênico. Desta forma, o gênero *Pluchea* parece representar uma promissora fonte de matéria-prima para a investigação de novas drogas terapêuticas (PÉREZ-GARCIA *et al.*, 2001).

Estudos fitoquímicos realizados com a *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera identificaram vários compostos bioativos, dentre eles: flavonóides, fenóis, terpenos, taninos, alcalóides e saponinas (REYES-TREJO; JOSEPH-NATHAN, 1999); (CÓRDOVA; MESA; HILL, 2006; CÓRDOVA *et al.*, 2010). A *P. sagittalis* é comumente utilizada no tratamento de distúrbios digestivos, hepáticos além de ser uma planta carminativa, estimulante aromático, antiespasmódica e antiulcerativa. Em forma de tintura, a *P. sagittalis* é utilizada para tratar erupções cutâneas (LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, extratos ou infusões de partes aéreas da planta têm sido utilizados em diferentes países na medicina tradicional para tratar processos dolorosos e desordens inflamatórias (ANDERBERG, 1994).

Estudos referentes às propriedades farmacológicas da *P. sagittalis*, têm sido descritos na literatura. Os resultados obtidos por Pérez-García *et al.* (1996), com extrato aquoso e hidroalcoólico confirmaram as propriedades antiinflamatórias e antioxidantes da planta, provavelmente correlacionadas à redução de radicais livres (PÉREZ-GARCIA *et al.*, 1996).

Segundo Monks e seus colaboradores (2002), testes *in vitro* demonstraram que o extrato aquoso da *P. sagittalis* apresentou atividade citotóxica frente a linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon HT29 e células neoplásicas de pulmão NCL-H460. Essa atividade se deu, provavelmente, à presença de princípios ativos capazes de inibir a proliferação destas células tumorais.



Figura 3 - *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera
Fonte: KISSMANN; GROTH, 1992

1.5.2 Uso de plantas medicinais no tratamento da fibrose hepática

As propriedades antifibróticas de plantas medicinais têm sido relatadas, principalmente, em modelos de fibrose hepática *in vitro* e *in vivo*. Existem duas possibilidades pelas quais essas plantas, juntamente com seus compostos bioativos, podem atuar na redução da fibrose hepática: via inibição da ativação de HSC e via redução da deposição de ECM (Figura 4) (DUVAL *et al.*, 2014a).

Dentre as vantagens da utilização de plantas medicinais como possíveis agentes antifibróticos estão: maior segurança, melhor custo-efetividade e versatilidade (DUVAL *et al.*, 2014b).

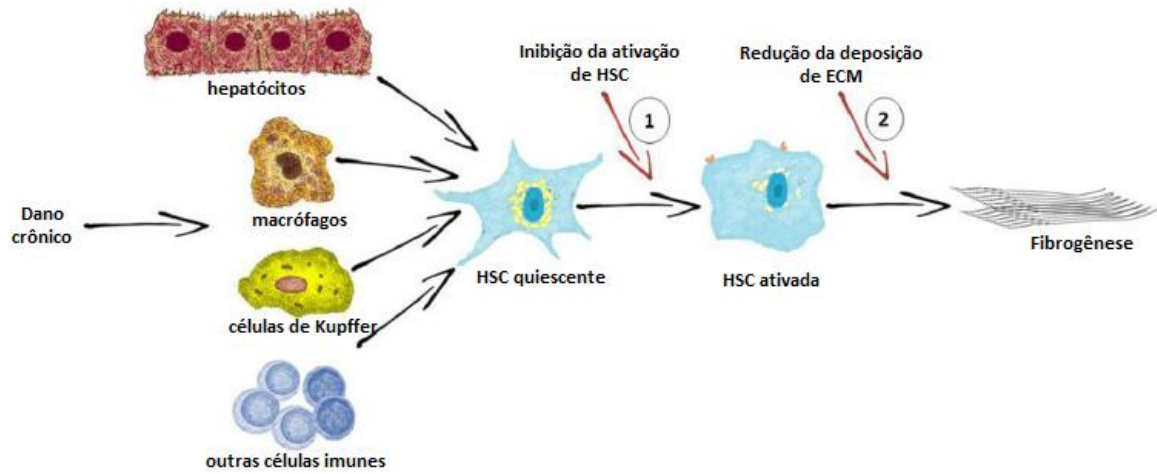


Figura 4 - Plantas medicinais antifibróticas com alvo na ativação de HSC (1) e na deposição de ECM (2). HSC: Células esteladas hepáticas; ECM: matriz extracelular

Fonte: DUVAL *et al.*, 2014

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos significativos avanços na compreensão da patogênese da fibrose hepática nos últimos 20 anos, existe ainda uma grande barreira em traduzir esse vasto conhecimento científico em fármacos antifibróticos para o tratamento dessa doença.

Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus), em 2008, 9.236 mortes por fibrose e cirrose hepática foram registradas no Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde, a cirrose e outras doenças crônicas do fígado compreendem a 4ª causa de morte no país, com uma taxa de mortalidade de 6,9 óbitos/100mil habitantes. Assim sendo, essa doença é um problema de saúde pública. É necessária atenção e medidas efetivas para seu conhecimento, tratamento e prevenção.

Na busca por estratégias de tratamento que unam segurança, custo-efetividade e versatilidade, tendo em vista a complexidade da patogênese da fibrose hepática, surgem as plantas medicinais. No Brasil, existe uma grande variedade de plantas que são utilizadas na medicina natural, devido às suas diferentes propriedades farmacológicas. Essas plantas constituem uma fonte rica de compostos bioativos para a indústria farmacêutica.

As espécies da família Asteraceae têm sido amplamente estudadas por apresentarem compostos químicos de interesse farmacológico. Dentro dessa família, o gênero *Pluchea* engloba, aproximadamente, 25.000 espécies no mundo e têm sido descritas pelas importantes propriedades medicinais associadas a esse gênero. Dentre as várias atividades comprovadas cientificamente estão: efeito anti-inflamatório, antiulcerogênico, potencial antimicrobiano e antioxidante.

Tendo em vista que o gênero *Pluchea* parece representar uma fonte de matéria-prima para investigação de novos fármacos e possui importantes propriedades medicinais, torna-se relevante avaliar seu papel no tratamento de fibrose hepática.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação do extrato aquoso de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera sobre a proliferação das células estreladas ativadas GRX.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação da *P. sagittalis* sobre a reversão do fenótipo;
- Avaliar a formação de colágeno em células GRX expostas ao extrato aquoso da *P. sagittalis*;
- Quantificar lipídios em células GRX expostas ao extrato aquoso da *P. sagittalis*.
- Avaliar a concentração de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células GRX tratadas com extrato aquoso da *P. sagittalis*;
- Verificar a ação da *P. sagittalis* sobre o estresse oxidativo através do TBARS assay kit;
- Avaliar a ação da *P. sagittalis* sobre a proliferação das células GRX.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados do presente trabalho serão submetidos à revista Planta Médica – Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research.

Current impact factor: 2.34

26-Aug-2015

Dear Dr. Caruso,

This is to acknowledge receipt of your manuscript entitled "**ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera AQUEOUS EXTRACT IN GRX CELL LINEAGE**" submitted to Planta Medica. It is receiving full attention. You will be informed in due time on the outcome of the review process.

Your manuscript ID is PLAMED-2015-08-0844-OP.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log into Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/plamed> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/plamed>.

Thank you for submitting your manuscript to Planta Medica.

Sincerely,

Dr. Tess de Bruyne

Editorial Office Planta Medica

tess.debruyne@uantwerpen.be

**ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera
AQUEOUS EXTRACT IN GRX CELL LINEAGE**

Fabiana Garbachi de Oliveira Mendes Ouriques¹, Paula Bacaicoa Caruso^{1*}, Gabriela Viegas Haute¹, Juliana Romeu Marques¹, Pedro Maria de Abreu Ferreira², Fernanda Bordignon Nunes¹, Jarbas Rodrigues de Oliveira¹

Affiliation

1- Cellular Biophysics and Inflammation Laboratory, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

2 - Institute of Biosciences, Department of Botany, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

* Corresponding author.

Correspondence

Correspondences should be addressed to: Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Phone: +555133534147

E-mail: paula.caruso@acad.pucrs.br

ABSTRACT

Liver fibrosis is a complex disease that is caused by inappropriate tissue repair due to the deposition of connective tissue. When a chronic lesion affects the liver, regenerative response fails and hepatocytes are replaced with abundant extracellular matrix (ECM). The imbalance between production and degradation of ECM will result in the accumulation of proteins that change normal liver architecture, and thus its functionality. The main source of ECM is the activated hepatic stellate cell (HSC). In order, to clarify possible therapeutic approaches to the disease, the this work aimed to evaluate the possible antifibrotic action of *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera on an activated HSC immortalized lineage (GRX).

Our results demonstrated that the *P. sagittalis* aqueous extract at 0.039 and 0.078 mg/mL concentrations was able to reduce cell growth and proliferation. Regarding to oxidative stress evaluation, there was no statistically significant difference between the treated group and the control. Staining with OilRed-O (ORO) showed a statistically significant increase in intracellular lipid content after 5 days of treatment, exerting *in vitro* effect on the GRX phenotypic change of activated towards the quiescent state. These results were confirmed by colorimetric quantification of lipid content. Regarding the TGF- β 1 and collagen production, there were no statistically significant differences observed between the groups.

In conclusion, the *P. sagittalis* aqueous extract reduces the growth and proliferation of GRX cells and induces the reversal of activated towards a quiescent phenotype. There was no decrease in cell proliferation either by necrosis or by apoptosis via activation of the senescence. Thus, our data suggest that the extract showed an antifibrotic effect, possibly by activating phenotype reversal.

Keywords: hepatic fibrosis, hepatic stellate cell, *Pluchea sagittalis*.

INTRODUCTION

Hepatic fibrosis, a disease with highly complex etiology, is caused by inappropriate tissue repair due to the deposition of connective tissue, resulting in chronic liver damage. It may be caused by alcohol consumption, chronic viral hepatitis, autoimmune diseases, among others. When there is inappropriate fibrosis control, the result can be a progression to cirrhosis [1].

When an acute injury affects the liver, parenchymal cells are regenerated and this process is associated with the inflammatory response and limited deposition of extracellular matrix (ECM). However, after chronic damage, the regenerative response fails and hepatocytes are replaced by excessive ECM mainly made of collagen of types I, III and IV, fibronectin, elastin, laminin and proteoglycans [1].

The main sources of ECM are the hepatic stellate cells (HSCs) [2], which constitute around 15% of total liver cells [3]. Discovered in 1876 by Kuppfer and located within the perisinusoidal space of Disse, the HSCs contain fat globules and are responsible for storing approximately 80% of vitamin A [4, 5, 6]. These cells play an important role in the fibrogenesis that occurs in chronic lesions of hepatic tissue [7]. The HSCs activation process, when there is phenotypic change from the quiescent state to an activated state, can be divided into initiation, perpetuation and resolution, and is an early event in hepatic fibrogenesis. Several paracrine stimulation of damaged hepatocytes and other neighboring cells can initiate HSCs activation. The activated stellate cells are characterized by increased contractility, retinoid loss, chemotaxis, proliferation, ECM degradation capacity and secretion of pro-inflammatory cytokines. TGF- β 1 produced by liver cells represents a potent fibrogenic signal, since it increases the production of type I collagen and other matrix constituents, such as fibronectin and proteoglycans. Remarkably, this new ECM configuration induces a new fibrogenic stimulus that is responsible for exacerbating fibrosis [1]. The GRX cell line, which represents the activated HSC phenotype has been used as an important tool for the study of the physiology of HSC and liver fibrosis [8, 9]. The *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, that belongs to the Asteraceae family, is a native plant of South America, popularly known as “quitoco”, “madre cravo” or “tabacarana” [10]. Important properties associated with the *Pluchea* gender, have been described including antioxidant activity, and anti-inflammatory and anti-ulcerogenic potential. Phytochemical studies with *P. sagittalis* identified several bioactive compounds, including flavonoids, phenols, terpenes, tannins, alkaloids and saponins

[11, 12, 13]. Regarding to the anti-inflammatory property of *P. sagittalis*, pharmacological studies showed that the aqueous extract has anti-inflammatory activity that is correlated with a reduction of free radicals [14].

The antifibrotic properties of medicinal plants have been mainly reported mainly in models of *in vitro* and *in vivo* liver fibrosis. There are two ways in which these plants together with their bioactive compounds, may act in reducing liver fibrosis: via inhibition of HSC activation and via reduction of ECM deposition [1]. The advantages of using medicinal plants as possible antifibrotic agents include high safety, cost-effectiveness and versatility [1]. Thus, the *Pluchea* genus seems to be a promising source of material on the research of new therapeutic drugs [15].

RESULTS

Viability and cell growth

After 5 days of treatment with *P. sagittalis* aqueous extract, cell viability of GRX lineage was evaluated at 0.039, 0.078, 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 and 2.5 mg/mL concentrations on cell viability of GRX lineage. A significant decrease in cell proliferation was observed with increasing concentrations of the aqueous extract (Fig.1).

Cell toxicity by release of lactate dehydrogenase

In order to evaluate whether the reduction in number of cells treated with *P. sagittalis* aqueous extract was due to cytotoxicity, the lactate dehydrogenase (LDH) released was quantified in the culture medium. Among the concentrations tested, there was a statistically significant difference at 1.25 and 2.5mg/mL concentrations compared to the control, indicating cytotoxicity (Fig.2). Thus, 0.039 and 0.078 mg/mL concentrations of *P. sagittalis* aqueous extract were selected for this study because lower concentrations had already presented an antiproliferative effect.

Apoptosis and senescence assay

Regarding the evaluation of apoptosis and senescence measured by DAPI, there was no statistically significant difference between treated groups and the control group. Thereby apoptotic cells were not detected in the studied groups (Fig. 3).

Oxidative stress assessment

Oxidative stress can damage the cell and, consequently, decrease cellular proliferation, allowing to evaluate MDA formation by MDA by TBARS assay. Our results showed that there was no statistically significant difference between the treated groups and the control group (Fig. 4).

Detection of lipid droplets by Oil Red-O staining and quantification of lipid accumulation

When activated, stellate hepatic cells, alter their phenotype and, therefore, increase their proliferation rate. In order to verify whether antiproliferative mechanism of *P. sagittalis* aqueous extract could be via phenotype regression, we assessed their lipid content. Control cells, which did not receive any treatment, had preserved their myofibroblastic phenotype. However, cells that were treated with *P. sagittalis* aqueous extract at 0.039 and 0.078 mg/mL concentrations showed a reversal of activated to quiescent phenotype.

The phenotype reversal was confirmed by colorimetric quantification of intracellular lipid content. There was a statistically significant increase in intracellular lipid content at 0.078 mg/mL concentration of *P. sagittalis* aqueous extract when compared to the control (Fig. 5).

TGF-β1 Quantification

There was no statistically significant difference in the amount of TGF-β1 between the treated groups and the control group after 5 days of treatment (Fig. 6).

Measurement of collagen content

There was no statistically significant difference in collagen content between the treated groups and the control group after 5 days of treatment, (Fig. 7).

DISCUSSION

Liver fibrosis is a multifactorial process feature by an imbalance of components of ECM synthesis and degradation, resulting in proteins accumulation that change normal liver architecture and, consequently, their functionality. GRX cells represent an interesting study of liver fibrosis model because in basal culture conditions exhibit the myofibroblastic phenotype [16].

This study demonstrated that *P. sagittalis* aqueous extract decreased GRX cells proliferation rate at the tested concentrations. Initially, we evaluated the possible cytotoxic action of the aqueous extract. We found that at 1.25 and 2.5 mg/mL concentrations the extract was toxic to cells, as it caused cell necrosis. This was evidenced by the significant increase of LDH in the cell culture supernatant. Based on these results, we decided to investigate the cellular mechanism involved in the antiproliferative effect of the *P. sagittalis* aqueous extract at 0.039 and 0.078mg/mL concentrations.

Oxidative stress is present in many liver diseases. This process happens due to an imbalance between oxidants and antioxidants, resulting in an excessive increase of free radicals. This fact leads to the oxidation of biomolecules with consequent loss of biological functions and homeostatic imbalances, ending in a powerful oxidative damage to cells and tissues [17]. Our results showed no statistically significant differences in oxidative stress among treated and control groups, demonstrating that the antiproliferative effect did not occur via oxidative stress.

Apoptosis plays an important role in the homeostasis of the liver cells, considering that many diseases that affect their cells are associated with increased apoptosis in hepatocytes, in order to protect against organ inflammation. Therefore, programmed cell death causes the hepatocytes die without causing a potentially damaging inflammatory response [18]. Our results demonstrated that the aqueous extract treatment did not increase the cell death by apoptosis, as well as not changing the senescent cells number, which could decrease cell proliferation by disrupting the cell cycle.

The GRX cell proliferation is related to the myofibroblastic phenotype. Therefore, we histologically analyzed the possible reversal of the phenotype and evaluated the intracellular lipid content. Our results showed an accumulation in intracellular lipid content as evidenced by ORO staining and confirmed by intracellular lipids quantification. For this reason, the *P. sagittalis* aqueous extract acts as a potent inducer of quiescent phenotype. This effect may explain the antiproliferative action of the plant.

TGF- β 1 is the major pro-fibrotic cytokine in chronic hepatic injury. This mediator activates the HSCs, resulting in increased cell proliferation and ECM deposition [19]. Increased TGF- β 1 levels represent a potent fibrogenic signal and its increase is associated with increased collagen production [20]. Ours results showed concentrations of TGF- β 1, when analyzed in supernatant GRX cell line, showed no statistically significant difference, when comparing the groups treated with *P. sagittalis* aqueous extract and the control group. The same occurred when we assessed the collagen concentration. Although these results show no differences between the groups, there was consistency, since TGF- β 1 and collagen are related to each other. According to Ye & Dan [21], the collagen expression and production are decreased when TGF- β 1 synthesis decreases and, consequently, so does the fibrotic process. Our results showed no significant decrease in these parameters, probably because the incubation time of the cells and the studied doses, despite decreasing cell proliferation and GRX cells phenotype reversion were not sufficient to decrease TGF- β 1 and collagen synthesis.

In conclusion, this study demonstrated for the first time a possible antiproliferative effect of *P. sagittalis* in an *in vitro* model of liver fibrosis. The results showed that the plant aqueous extract, at 0.039 and 0.078 mg/mL concentrations, was able to induce reversion from quiescent to activated phenotype in GRX cell line. Based on our findings, this study suggests a possible role for the *P. sagittalis* aqueous extract in liver fibrosis treatment. The findings highlight the importance of further research in this area towards a more efficient and effective

treatment. A better understanding of fibrogenesis inhibition and HSCs pathways activation and deactivation are still challenges to be unraveled, not only have a better understanding of disease pathogenesis, but also to validate the therapeutic use of medicinal plants in liver fibrosis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

P. sagittalis leaves were collected from the Protection Center and Nature Conservation Pro-Mata, at the town of São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brazil, during December 2014. The extracts were inoculated in GRX cell culture.

Cell culture

The murine GRX cell line [8] was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Federal University, Rio de Janeiro, Brazil). The GRX cell line was obtained from liver granuloma in mice of C3h line / HeN infected with *Schistosoma mansoni* cercariae [22, 9]. Under standard cultivation conditions, GRX cells express the myofibroblastic phenotype, proliferative and ECM producer [9, 23].

Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2g/L HEPES buffer, 3.7g/L NaHCO₃ and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Preparation of the aqueous extract of Pluchea sagittalis

Aqueous extracts were prepared with *P. sagittalis* leaves. The aqueous extracts were obtained by adapting the methodology used by Ferris & Zheng [24]. Initially, 2 g of *in nature*

plant leaves in a properly tagged Becker were selected. After cleaning was performed with distilled water, with subsequent drying and, thereafter, 10 mL of distilled water were added and then this solution was placed in a water bath (80°C) for 30 min. Subsequently, the aqueous extract was filtered and stored for centrifugation at 5000 rpm for 10 min. Finally, the aqueous extract was divided into aliquots of 500 uL in 1.5 mL Eppendorf tubes, and stored at -20°C.

Treatment with *Pluchea sagitallis* aqueous extract

The aqueous extract of *P. sagitallis* was in two different concentrations, at 0.039mg/mL and 0.078mg/mL. GRX cells were incubated and the analyses were performed after 5 days of treatment. Based on previous studies, all experiments were repeated three times and in triplicates [25].

Viability and cell growth

Cellular viability and growth were assessed by Tripan blue dye exclusion. The number of cells was determined by the hemocytometer. GRX cells were seeded into 24-well plates (3x10³ cells/well) and treated with *P. sagitallis* aqueous extract (as described above) for 5 days to evaluate the antifibrotic activity. All groups were performed in triplicates. The control group received only DMEM and 5% SFB for 5 days.

Cell toxicity by release of lactate dehydrogenase

We used the determination of lactate dehydrogenase (LDH) in supernatants of cultures as compared to the control group in order to evaluate the cytotoxicity of *P. sagitallis* aqueous extract in GRX cells. The LDH activity was measured by colorimetric assay [26]. Control of cell lysis was checked using 5% Tween.

Oxidative stress assessment

Oxidative stress was assessed by the concentration of MDA (malondialdehyde) in the supernatant of cell cultures by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay kit (Cayman Chemical Company). The TBARS is a well-established method for screening and monitoring of lipid peroxidation. The results are expressed in μM per 1.000 cells.

Apoptosis and senescence assay

The GRX cells apoptosis and senescence was assessed by immunofluorescence microscopy (x200). Cells were stained with DAPI (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) to assess nuclear changes or modifications of cells undergoing apoptosis.

After treatment, the supernatant was removed and cells were washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Next, cells were washed again with PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 30 min and DAPI was added. After 2 min the dye was removed, and the last wash was performed with PBS. Finally, nuclear morphometric analysis (NMA) was performed to quantitatively evaluate the proportion of cells in senescence, apoptosis or nuclear irregularities within this population of *in vitro* cells [27].

Detection of lipid droplets by Oil Red-O staining

Cells were stained with Oil Red-O (ORO) (Sigma) [28] on day 5 to show cell morphology and lipid accumulation. After fixing cells with 10% formaldehyde, ORO (0.35g in 60% isopropanol) was briefly added for 15 min. Intracellular lipid droplets were examined using an inverted light microscope (BestScope, China).

Quantification of lipid accumulation

The procedure is also based on ORO staining of intracellular lipid droplets (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). Cells were briefly fixed with perchloric acid and incubated with ORO dissolved in propylene glycol (2mg/mL) for 2h. The ORO within the lipid droplets was extracted using isopropanol. The absorbance was read at 492nm using an ELISA plate reader. Each sample was normalized to 100000 cells.

TGF- β 1 Quantification

TGF- β 1 concentration was measured, in cell supernatant, on day 5, using a commercially available ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Results were calculated on a standard curve concentration and multiplied for the dilution factor. TGF- β 1 levels were expressed as nanograms per milliliter per 1.000 cells.

Measurement of collagen content

Collagen content in GRX cells was measured using picro-sirius red on day 5. Picro-sirius red was added to cell supernatant to form a collagen-dye complex. After centrifugation, unbound dye was removed and collagen-dye complex dissolved in NaOH. The absorbance was measured at 540nm in an ELISA plate reader. Each sample was normalized to 1.000 cells [29]. Results were calculated on a standard curve concentration. Collagen levels were expressed as the ratio of milligrams of collagen and cells number.

Statistics

Data are reported as mean \pm SD. Each experiment was performed at least three independent times and in triplicates. Statistical testing was performed with Prism 5 software.

Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Duval, F. et al. Protective mechanisms of medicinal plants targeting hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in liver fibrosis. *Chin Med*, v. 9, n. 1, p. 27, 2014a.
- 2 Duval, F. et al. Liver fibrosis and protection mechanisms action of medicinal plants targeting apoptosis of hepatocytes and hepatic stellate cells. *Adv Pharmacol Sci*, v. 2014, p. 373295, 2014b.
- 3 Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, v. 275, n. 4, p. 2247-50, Jan 2000.
- 4 McCuskey, R. S. Functional morphology of the liver with emphasis on microvasculature. In: Tavaloni N, Berk PD eds. *Hepatic transport and bile secretion: physiology and pathophysiology*. New York, Raven Press Ltd; 1-10. 1993.
- 5 Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, v. 134, n. 6, p. 1655-69, May 2008.
- 6 Winau, F. et al. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol*, v. 20, n. 1, p. 68-74, Feb 2008.
- 7 Rockey, D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology*, v. 25, n. 1, p. 2-5, Jan 1997.

- 8 Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourão PA, Emonard H, Grimaldi G, Grimaud JA. 1985. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol* 21:382-90.
- 9 Guimarães, E. L. et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int*, v. 26, n. 4, p. 477-85, May 2006.
- 10 Kissmann, K. G., Groth, D. *Plantas Infestantes e Nocivas*. BASF. Brasileira S/A. 2ª edição, v2, p.798. TOMO II. 1992.
- 11 Reyes-Trejo, B., Joseph-Nathan, P. Modhephene derivatives from *Pluchea sericea*. *Phytochemistry*, 51:75-78, 1999.
- 12 Córdova, W.H.P., Mesa, L.G., Hill, A.L.P. Metabólitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. *Revista Cubana de Farmácia*, 40 (2), 2006.
- 13 Córdova, W.H.P., Tabart, J., Quesada, A.G., Sipel, A., Hill, A.L.P., Kevers, C., Dommes, J. Antioxidant capacity of three Cuban species of the genus *Pluchea* Cass. (Asteraceae). *Journal of Food Biochemistry*, 34:249-261, 2010.14
- 14 Pérez-García, F. et al. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: involvement of an antioxidant mechanism. *Life Sci*, v. 59, n. 24, p. 2033-40, 1996.
- 15 Pérez-García, F. et al. Activity of plant extracts on the respiratory burst and the stress protein synthesis. *Phytomedicine*, v. 8, n. 1, p. 31-8, Jan 2001.
- 16 Lotersztajn, S., Julien, B., Clere, F.T., Grenard, P., Mallat, A.H. 2005. Hepatic fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. *Annu.armacol. Toxicol.* 45:605-28.
- 17 Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-55.

- 18 Neuman, M.G. (2001) Apoptosis in diseases of the liver. *Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science* 38, pp. 109–166.
- 19 Friedman SL. 2008b. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88:125-72.
- 20 Bissell DM, Roulot D, George J. 2001. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 34:859-67.
- 21 Ye Y, Dan Z. 2010. All-trans retinoic acid diminishes collagen production in a hepatic stellate cell line via suppression of active protein-1 and c-Jun N-terminal kinase signal. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 30:726-33.
- 22 Vicente CP, Fortuna VA, Margis R, Trugo L, Borojevic R. 1998. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 187:11-21.
- 23 Souza IC, Martins LA, Coelho BP, Grivicich I, Guaragna RM, Gottfried C, Borojevic R, Guma FC. 2008. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 315:1-7.
- 24 Ferris H, Zheng L. 1999. Plant Sources of Chinese Herbal Remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *J Nematol* 31:241-63.
- 25 Bitencourt S, de Mesquita FC, Caberlon E, da Silva GV, Basso BS, Ferreira GA, de Oliveira JR. 2012. Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell. *Biochem Cell Biol* 90:683-90.
- 26 Spiller F, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007; 60: 473,478.
- 27 Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Lenz G. 2012. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* 7:e42522.

28 Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97:493-7.

29 Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1 Effect of *Pluchea sagittalis* in GRX cells growth, assessed by direct counting on Neubauer's Chamber. Cells were treated with *P. sagittalis* aqueous extract for 5 days. Data represent the mean \pm SD (n=4). Results are expressed as cell number per well. ***p<0.01 compared to control.

Fig 2 Effect of *Pluchea Sagittalis* in lactate dehydrogenase (LDH) release on cell supernatant after 5 days. Data represent the mean \pm SD (n=4). Results are expressed as percentage of LDH. ** p<0.01 and ***p< 0.001 compared to control.

Fig. 3 DAPI Staining to assess nuclear changes of cells undergoing apoptosis and senescence after 5 days of treatment (A) Control, 0.039 and 0.078 mg/mL; (B) Percentage of normal cells and senescent cells.

Fig. 4 TBARS levels in GRX cell line after 5 days of treatment. Data represent the mean \pm SD (n = 4). TBARS levels were the expressed per nanomol per 1000cells.

Fig. 5 A: Oil Red-O (ORO) staining and lipid quantitation of GRX cells at day 5. (A) Control, and cells treated with *Pluchea. sagittalis* aqueous extract at 0.039 and 0.078 mg/mL, respectively. Bar length = 40 μ m. (B) Specific lipid content expressed spectrophotometrically as the ratio of absorbance value obtained for ORO and the cell number. Results are expressed as mean \pm SD. **p<0.01, compared to control.

Fig. 6 ELISA assay of TGF- β 1 in cell supernatant of 5 days treatment. Data represent the mean \pm SD (n=4). TGF- β 1 levels are expressed as nanograms per milliliter per 1000cells.

Fig. 7 Total collagen content in cell supernatant of 5 days treatment. Data represent the mean \pm SD (n=4). Results are expressed as micrograms per milliliter/1000cells.

Fig. 1

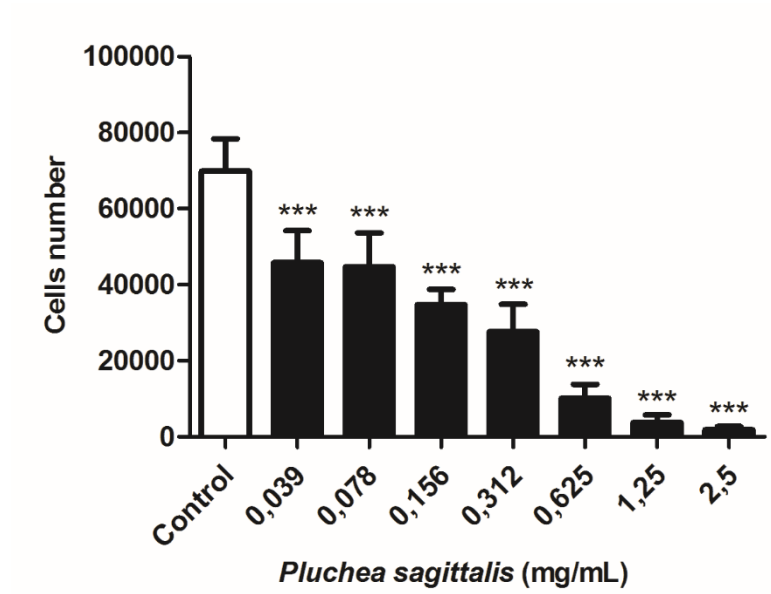


Fig. 2

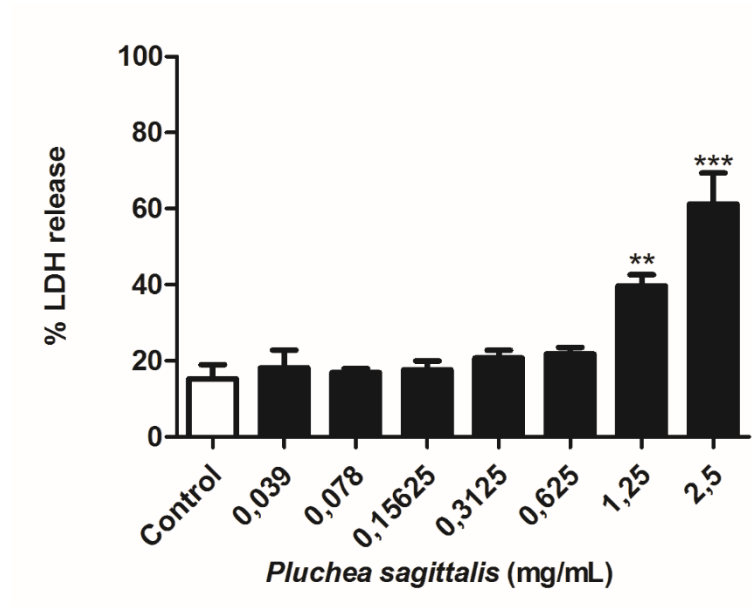
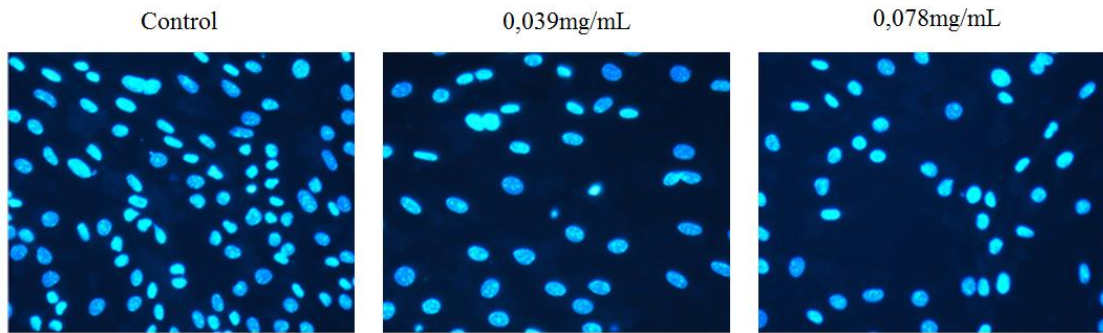


Fig. 3

A



B

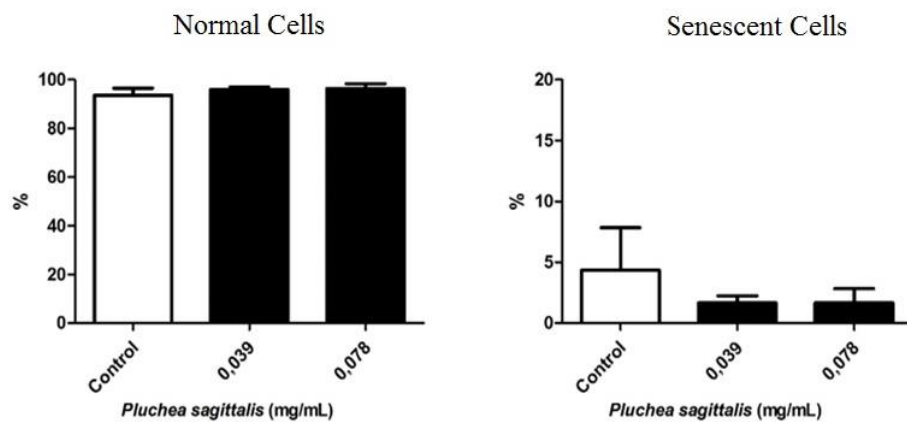


Fig. 4

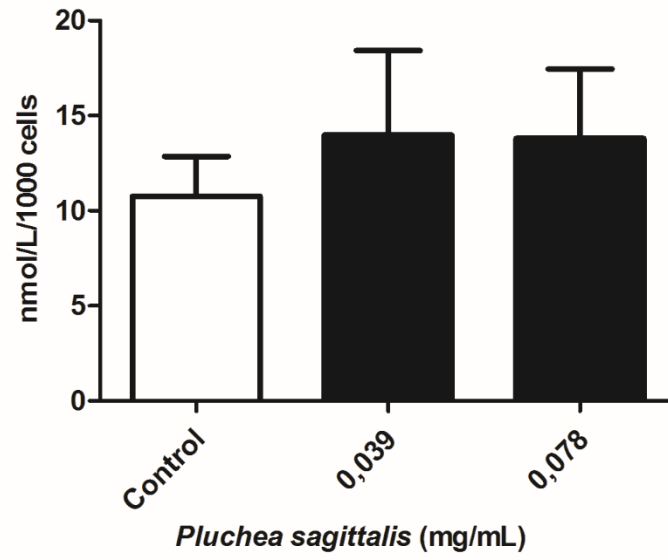
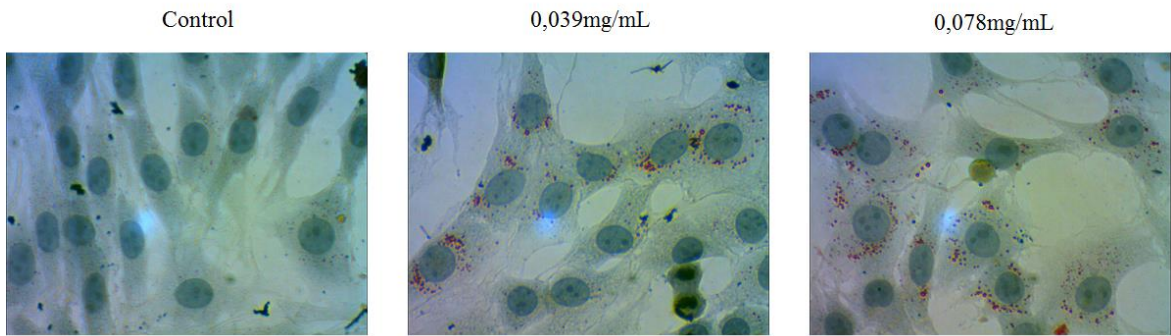


Fig. 5

A



B

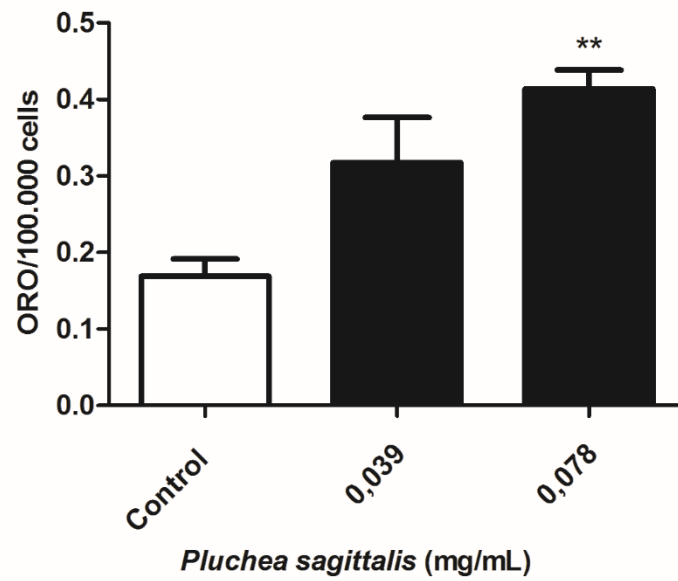


Fig. 6

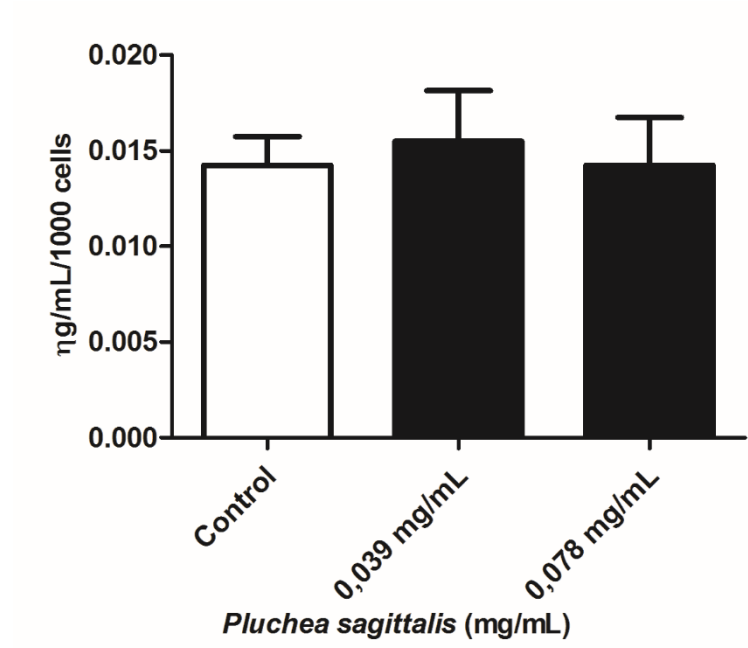
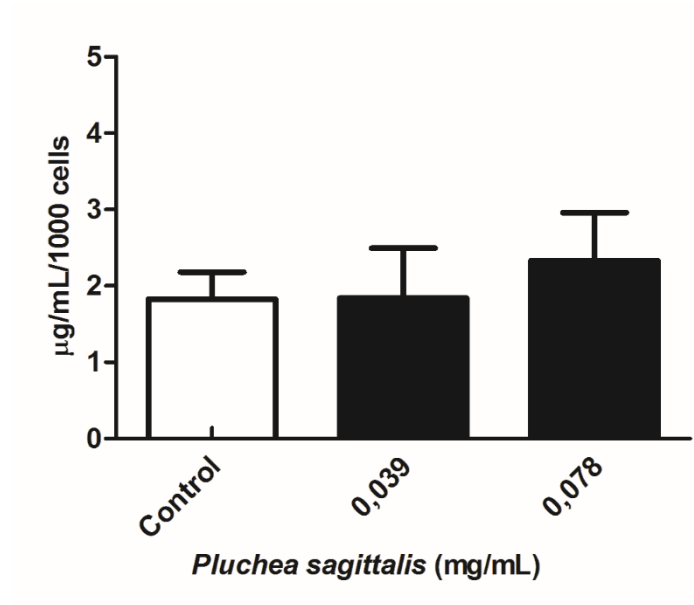


Fig. 7



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as diversas doenças consideradas como questões de saúde pública que acometem a população mundial, está a fibrose hepática. Essa doença está associada à significativa morbidade e mortalidade (DUVAL *et al.*, 2014a). Até o presente momento, não existe um tratamento padronizado. Uma possibilidade mais efetiva é a intervenção através da remoção do agente causador. Entretanto, tem ocorrido nos últimos anos um crescimento nos conhecimentos científicos sobre essa doença, revelando potenciais alvos terapêuticos.

A HSC é um alvo atrativo para o estudo de novos agentes antifibróticos na tentativa de tratar a fibrose em seus diferentes estágios. A redução do processo inflamatório e da resposta imune, a inibição da ativação das HSC, a indução da apoptose das HSCs, a interrupção das atividades fibrogênicas, contráteis, proliferativas e pró-inflamatórias das HSCs, a diminuição da síntese dos componentes da ECM ou o aumento de sua degradação são algumas das possíveis hipóteses para a interrupção do processo fibrótico (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006; Li *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a importância de compostos naturais com propriedades medicinais vem sendo amplamente reconhecida tanto na prevenção, como no tratamento de várias doenças (WEISBURGER; WILLIAMS, 2000). As pesquisas com plantas medicinais envolvem: investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a operação de formulações para produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos. O objetivo do nosso estudo foi avaliar a possível ação do extrato aquoso da *Pluchea sagittalis* sobre a proliferação das células estreladas ativadas GRX e seu efeito terapêutico no tratamento da fibrose hepática, tendo em vista que esta planta já apresenta propriedades farmacológicas cientificamente comprovadas. Através dos resultados, foi possível identificar atividade antiproliferativa *in vitro* das folhas da *P. sagittalis* em linhagens celulares GRX. Portanto, este estudo é um importante passo para a pesquisa de novas drogas antifibróticas. A proposta de prosseguir na pesquisa das propriedades do extrato aquoso da *P. sagittalis* é de fundamental importância para a elucidação de seu

potencial terapêutico tanto para indústria farmacêutica, onde se busca medicamentos eficazes, seguros, quanto para as populações que, eventualmente, já fazem uso medicinal desta planta.

REFERÊNCIAS

ALBANIS, E.; FRIEDMAN, S. L. Antifibrotic agents for liver disease. **Am J Transplant**, New York, v.6, n.1, jan. 2006, p.12-19.

ANDERBERG, A. A. Asteraceae. In: BREMER, K. (ed.). **Cladistics and classification**. Portland, Oregon: Timber Press, 1994, 752p.

BOTSARIS, A. S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995.

CÓRDOVA, W. H. P.; MESA, L. G.; HILL, A. L. P. Metabólitos secundarios y actividad antimicrobiana de *pluchea carolinensis*. **Revista Cubana de Farmácia**, Havana, v.40, n.2, ago. 2006, p.1-4.

_____; TABART, J.; QUESADA, A. G.; SIPEL, A.; HILL, A. L. P.; KEVERS, C.; DOMMES, J. Antioxidant capacity of three Cuban species of the genus *Pluchea* Cass.(Asteraceae). **Journal of Food Biochemistry**, Liège, v.34, s.1, mar. 2010, p.249-261.

DUVAL, F. *et al.* Liver fibrosis and protection mechanisms action of medicinal plants targeting apoptosis of hepatocytes and hepatic stellate cells. **Adv Pharmacol Sci**. v.2014, 2014b, p.373295.

_____. Protective mechanisms of medicinal plants targeting hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in liver fibrosis. **Chin Med**. v.9, n.1, 2014a, p.27.

ELLIS, E. L.; MANN, D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. **J Hepatol**. v.56, n.5, may. 2012, p.1171-80.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**. v.134, n.6, may. 2008, p.1655-69.

_____. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J Biol Chem**. v.275, n.4, jan. 2000, p.2247-50.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Semin Liver Dis**. v.21, n.3, aug. 2001, p.311-35.

GUIMARÃES, E. L. *et al.* Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. **Liver Int.** v.26, n.4, may. 2006, p.477-85.

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

HERRMANN, J.; GRESSNER, A. M.; WEISKIRCHEN, R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? **J Cell Mol Med.** v.11, n.4, jul./aug. 2007, p.704-22.

IREDALE, J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair. **Pharmacol Res.** v.58, n.2, aug. 2008, p.129-36.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. v.2. Tomo II. [s.l]: BASF, 1992.

LIM, Y. S.; KIM, W. R. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. **Clin Liver Dis.** v.12, n.4, nov. 2008, p.733-46.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000.

_____; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MCCUSKEY, R. S. Functional morphology of the liver with emphasis on microvasculature. In: TAVALONI, N.; BERK, P. D. (eds.). **Hepatic transport and bile secretion: physiology and pathophysiology.** New York: Raven Press, 1993.

MEANS, R. T. Hecpidin and iron regulation in health and disease. **Am J Med Sci.** v.345, n.1, jan. 2013, p.57-60.

MONKS, N. R.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MACHADO, K. R.; LIMA, M. F. S.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMAN, N. Vitro Citotoxicity of Extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology.** v.40, n.7, 2002, p.494-500.

MONTEIRO, A. N., Borojevic, R. "In vitro formation of fibrous septa by liver connective tissue cells". In vitro cellular & developmental biology: **Journal of the Tissue Culture Association.** v.23, n.1, 1987, p.10-4.

REYES-TREJO, B.; JOSEPH-NATHAN, P. Modhephene derivates from *Pluchea sericea*. **Phytochemistry**. v.51, 1999, p.75-78.

ROCKEY, D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. **Hepatology**. v.25, n.1, jan. 1997, p.2-5.

SOUZA, I. C. *et al.* Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. **Mol Cell Biochem**. v.315, n.1-2, aug. 2008, p.1-7.

VICENTE, C. P. *et al.* Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. **Mol Cell Biochem**. v.187, n.1-2, oct. 1998, p.11-21.

WEISBURGER, J. H.; WILLIAMS, G. M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicology Science**. v.49, 2000, p.231-246.

WINAU, F. *et al.* Starring stellate cells in liver immunology. **Curr Opin Immunol**. v.20, n.1, feb. 2008, p.68-74.