

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

CAMILLE KIRINUS REGHELIN

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFIBRÓTICO HEPÁTICO DO BEZAFIBRATO EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FIBROSE HEPÁTICA

Porto Alegre
2022

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

CAMILLE KIRINUS REGHELIN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFIBRÓTICO HEPÁTICO DO BEZAFIBRATO EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FIBROSE HEPÁTICA**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Biologia
Celular e Molecular ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Escola de Ciências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Denizar Alberto da Silva Melo

Co-orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2022

Ficha Catalográfica

R334a Reghelin, Camille Kirinus

Avaliação do Efeito Antifibrótico Hepático do Bezafibrato em Modelos IN VITRO e IN VIVO e de Fibrose Hepática : Avaliação do Efeito do Bezafibrato em Modelos Experimentais de Fibrose Hepática / Camille Kirinus Reghelin. – 2022.

57 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Denizar Alberto da Silva Melo.

Coorientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira.

1. Células GRX. 2. Dano oxidativo. 3. Fibroblasto. 4. Bezafibrato. 5. Fibrose hepática. I. Melo, Denizar Alberto da Silva. II. Oliveira, Jarbas Rodrigues de. III. . IV. Título.

CAMILLE KIRINUS REGHELIN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFIBRÓTICO HEPÁTICO DO BEZAFIBRATO EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FIBROSE HEPÁTICA**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Biologia
Celular e Molecular ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Escola de Ciências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: _____, de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Martha Campos – PUCRS

Prof^a. Dra. Norma Anair Possa Marroni – UFRGS

Prof^a Dra. Cristina Bragança de Moraes – UFN

Porto Alegre

2022

*“Eu não sou tão forte quanto eu previa,
nem tão fraca quanto eu temia.
Não tenho o passo rápido como eu gostaria,
nem paraliso como poderia.
Aprendi a me equilibrar nos extremos
Se não tenho o direito de
escolher todos os acontecimentos,
me posiciono de acordo com os fatos.
No final, o que me move
não é forte o suficiente pra
me derrubar, mas é
intenso o bastante pra
me fazer ir além.”
(Fernanda Gaona)*

*Dedico à minha mãe, que dividiu comigo
as vitórias e obstáculos nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu infinito amor e bondade! Esta vitória é muito mais tua do que minha, e por ela eu Te agradeço!

Ao meu marido Guilherme por todo amor do mundo, apoio e por acreditar no meu sucesso e principalmente pela paciência!

A minha amada filha Cecília, minha princesa! Minha melhor surpresa no decorrer do doutorado! Você revolucionou meu mundo, me transformou por completo, me tornei um ser humano muito melhor e mais forte! Te amo além da vida!

A meus pais, Cristina Kirinus, Jose Reghelin, e meu irmão Pedro, pelo amor incondicional, compreensão e por sempre me estimularem a seguir adiante e nunca desistir dos meus sonhos.

A minha avó Gládis Pessoa Dornelles (*in memorian*) por todo amor, cuidado, carinho e incentivo. Foi a tua dedicação que me trouxe até aqui! Saudades eternas!

Aos meus dindos Mara e Jose Piveta e aos meus tios Glademar e Margareth Kirinus agradeço por todo amor e incentivo para realização deste sonho. Muito obrigada!

A minha tia Lúcia Reghelin (*in memorian*) por todo amor, por me ensinar o verdadeiro valor da palavra resiliência; “não esmoreça diante das dificuldades”.

A minha melhor amiga, minha irmã de alma, Letícia Maffi Augusti, pela amizade de tantos anos, pelo companheirismo, ajuda e suporte! Você tornou essa jornada mais leve. Gratiluz!

Aos primos pelo carinho, torcida e brincadeiras de sempre!

Ao meu orientador, professor Dr. Denizar Alberto da Silva Melo e ao meu coorientador Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pelos ensinamentos, dedicação e por acreditarem no meu potencial.

Ao amigo, colega e pesquisador Dr^o Bruno de Sousa Basso, por todos os ensinamentos, dedicação e amizade. Não tenho palavras para agradecer o teu apoio, pois foi fundamental!!

A amiga, bióloga, pesquisadora Arieli Cruz de Sousa, por tua dedicação, apoio, amizade e carinho. E por todos os momentos “good vibes” e “bad vibes”, principalmente com o “fantástico mundo” da biologia molecular.

As minhas colegas e amigas da jornada de pós-graduação, Dr^a Rafaela Nozari e a doutoranda Renata Fioravanti. Amigas fiéis, que dividiram os sabores e as dores

dessa jornada, regadas a muitos cafés (Baristo) no bar do prédio 12 e nas noites com espumantes Moscatel (nosso preferido)!

A minha amiga Dr^o Bruna Pasqualotto, por toda amizade, parceria, paciência (principalmente no período da minha gravidez) e incentivo. Foi um privilégio dividir essa jornada contigo! Me sinto grata por tudo o que vivemos intensamente nesses anos, te admiro como pesquisadora e ser humano.

As minhas amigas e colegas Dr^a Kelly Goulart, Dr^a Gabriela Viegas Haute e a doutoranda Bianca Andrade por todos os ensinamentos. Agradeço também pela amizade e por me ajudarem a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao Dr. Fernando Diz, por enriquecer nossas tardes de experimentos com seus deliciosos brownies, e conversas sobre a vida acadêmica e laboratorial.

Ao Gustavo Petry, por toda dedicação, ensinamentos e discussões sobre a análise de AFM.

Aos meus queridos amigos e amigas por compreenderem meus momentos de ausência e por compartilharem comigo momentos de alegria e de tristeza, sempre me incentivando para realização deste sonho.

Aos professores Dr^a Eliane Santarém e Dr^o Landro Astarita, por terem permitido realizar a análise molecular(qPCR) no aparelho StepOne. E sempre me receberem de braços abertos, seja com uma palavra de incentivo ou para uma conversa científica.

A todos colegas do Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação pelo companheirismo e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS, a CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte para a realização desta conquista.

RESUMO

A fibrose hepática (FH) se caracteriza pelo processo de cicatrização que representa a resposta hepática a lesões, através da deposição do colágeno e outros constituintes da matriz extracelular. Este processo ocorrendo repetidas vezes pode vir a culminar em uma cirrose hepática, na qual a organização arquitetônica do fígado se altera a ponto de interferir no fluxo de sangue e nas suas funções. Dentre as mais graves complicações da doença, está incluída hipertensão portal, insuficiência e câncer hepático. As principais células envolvidas na fibrose hepática que produzem matriz extracelular são as células estreladas hepáticas. Esta população de células residentes contém um fenótipo quiescente que funciona como armazenamento de vitamina A do organismo. Uma vez ativadas, elas se transformam de forma a adotar um fenótipo de miofibroblasto. O presente estudo buscou novas opções de tratamentos baseado em conceitos já aplicados, estabelecidos e correlatos ao reposicionamento de fármacos. Neste sentido, o bezafibrato surgiu como alternativa porque apresenta potencial efeito antifibrótico. Este um medicamento comumente utilizado para reduzir os níveis de colesterol e triglicérides no sangue, atuando por meio da ativação de Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs). Portanto, buscamos verificar o potencial efeito antifibrótico do BZF em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* como uma possível nova terapia para o tratamento da fibrose hepática. Os parâmetros avaliados *in vitro* foram a proliferação celular, o índice de citotoxicidade, a identificação das organelas vesiculares ácidas (AVOs), quantificação de gotículas lipídicas, contração de gel de colágeno e análise dos marcadores moleculares relacionados a ativação e reversão fenotípica. Na sequência foram investigados *in vivo* marcadores de lesão hepática, os aspectos histológicos e também moleculares. Após 72 horas de tratamento *in vitro*, o BZF diminuiu a proliferação celular, reverteu o fenótipo, reduziu a contração celular e induziu autofagia. Além disso, o BZF demonstrou o efeito protetor na fibrose hepática induzida por tetracloreto em camundongos, confirmados pela avaliação do soro, no tecido hepático e análise molecular.

Palavras chave: Bezafibrato; células GRX; Dano oxidativo; célula; fibrose hepática.

ABSTRACT

Hepatic fibrosis (FH) is characterized by the healing process that represents the hepatic response to injuries, through the deposition of collagen and other constituents of the extracellular matrix. This process occurring repeatedly can culminate in liver cirrhosis, in which the architectural organization of the liver changes to the point of interfering with blood flow and its functions. Among the most serious complications of the disease, this included portal hypertension, liver failure and cancer. The main cells involved in hepatic fibrosis that produce extracellular matrix are hepatic stellate cells. This population of resident cells contains a quiescent phenotype that functions as the body's vitamin A store. And when activated, they transform to adopt a myofibroblast phenotype. The present study sought new treatment options based on concepts already applied, established and related to drug repositioning, in which we directed our analysis to bezafibrate. This is a drug commonly used to reduce the levels of cholesterol and triglycerides in the blood, acting through the activation of Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). Therefore, we sought to verify the potential antifibrotic effect of BZF in experimental models *in vitro* and *in vivo*. as a possible new therapy for the treatment of liver fibrosis. The parameters evaluated *in vitro* were cell proliferation, cytotoxicity index, identification of acidic vesicular organelles (AVOs), quantification of lipid droplets, collagen gel contraction and analysis of molecular markers related to phenotypic activation and reversion. Subsequently, hepatic injury markers was investigated *in vivo*, as well as histological and molecular aspects. After 72 hours of *in vitro* treatment, BZF decreased cell proliferation, reversed phenotype, reduced cell contraction and induced autophagy. In addition, BZF demonstrated a protective effect on tetrachloride-induced liver fibrosis in mice, confirmed by serum, liver tissue and molecular analysis.

Keywords: Bezafibrate; GRX cells; oxidative damage; cell; liver fibrosis.

LISTA DE SIGLAS

α - SMA: Actina de musculo liso alfa
AFM: Microscopia de Força Atômica
ALT- Alanina transaminase
AST- Aspartato transaminase
BZF: Bezafibrato
CAT: Catalase
CCl₄: Tetracloreto de Carbono
CHC: Carcinoma Hepatocelular
CO₂: Dioxido de Carbono
COL-1: Colágeno tipo 1
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
EMC: *Extra Cellular Matrix* / Componentes da Matriz Extracelular
FAL: Fosfatase Alcalina
FH: Fibrose Hepática
GFAP: *Glial Fibrillary Acid Protein* / Proteína Ácida Fibrilar Glial
GGT: Gama GT
HDL: *High-density lipoprotein*
HSC: Hepatic Stellate Cells / Células Hepáticas Estreladas
IL: Interleucina
IP: Intraperitoneal
LDL: *Low-density lipoprotein*
LDH: Lactato desidrogenase
MTT: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NAC: N-acetilcisteína
NAFL: Fígado Gorduroso Não Alcoólico
NASH: *Nonalcoholic Steatohepatitis*
NF- κ β : Fator nuclear kappa β
ORO: Oil Red O
PBS: Tampão fosfato salino
PPARs: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PPAR- γ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma

PPAR- α : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa

SFB: Soro fetal bovino

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TIMPs: *Tissue inhibitors Metalloproteinases* / Inibidor tecidual de Metaloproteinases

TGF- β 1: Fator transformador de crescimento beta 1

TLR₄: *Toll Like Receptor 4*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TSD: Tetrazolium succinato-desidrogenase

VLDL: *Very low-density lipoprotein*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da patogênese da FH	15
Figura 2 – Representação esquemática da ativação de células hepáticas estreladas.....	16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Fibrose hepática.....	12
1.2 Células hepáticas estreladas	13
1.3 Modelos experimentais de fibrose hepática	16
1.3.1 Modelo <i>in vitro</i>	17
1.3.2 Modelo <i>in vivo</i>	17
1.4 Tratamento para Fibrose Hepática.....	19
1.5 Bezafibrato	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
2.1 3.1 Objetivo Geral	22
2.2 3.2. Objetivo Específicos.....	22
4. ARTIGO	12
Artigo submetido à <i>European Journal of Pharmacology</i>	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	12
6. REFERÊNCIAS	14
APÊNDICE A – AUTORIZAÇÃO CEUA	19

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fibrose hepática

A fibrose hepática (FH) é o resultado de lesões crônicas no fígado, que podem ser causadas por infecções virais, como hepatite B e C, abuso alcoólico, toxinas, acúmulo de metais e doenças hereditárias (IREDALE, 2008). A FH se caracteriza por diversas modificações no tecido hepático, como o aumento da deposição de componentes da matriz extracelular (EMC, do inglês, *Extra Cellular Matrix*), do colágeno e da fibronectina, devido à ativação de processos celulares que resultam na alteração da arquitetura do tecido hepático (DE MESQUITA et al., 2013).

A Esteato-hepatite não alcoólica ou *nonalcoholic steatohepatitis (NASH)* é conhecida por ser altamente relevante na chamada síndrome metabólica, que inclui obesidade, diabetes, hiperlipidemia e hipertensão. A fisiopatologia da *NASH* está relacionada com o Fígado gorduroso não alcoólico (NAFL), que provoca o aumento do estresse oxidativo e ativação crônica de diversas rotas inflamatórias. A ação desses fatores resulta em uma lesão hepatocelular e subsequente progressão para fibrose. Dessa forma as lesões crônicas do fígado provocam um desbalanço nas células responsáveis pelo equilíbrio da síntese e degradação da EMC (FRIEDMAN, 2008). Conseqüentemente ocorrem alterações na arquitetura do tecido hepático, localizado no espaço de Disse, onde se encontram as células hepáticas estreladas (HSC, do inglês, *Hepatic Stellate Cells*) (VICENTE et al., 1998; LEE et al., 2011).

A FH é uma complicação frequente e potencialmente fatal, associada à maioria das doenças do fígado, representando altos custos para o sistema de saúde (WEISKIRCHEN et al., 2018), afetando mais de 100 milhões de pessoas ao redor do mundo (LI et al., 2011). A progressão da FH é lenta devido à capacidade de regeneração do fígado, mas sua progressão varia por determinantes genéticos (FRIEDMAN, 2008). O dano crônico ao fígado somado à deposição de EMC pode resultar em um estágio mais avançado de FH, conhecido como cirrose, que provoca insuficiência hepática, devido à distorção do parênquima hepático, com formação de nódulos e septos, fluxo sanguíneo alterado e a modificação da arquitetura hepática (DIEHL, 1999). A dificuldade em degradar a matriz fibrótica é o maior determinante da cirrose, ocasionado a sua disfunção e acarretando cerca de 1,5 milhões de mortes

anuais em todo o mundo (SAREM et al., 2006; FRIEDMAN, 2008; IREDALE, 2008; FALLOWFIELD and HAYES, 2011; POYNARS et al., 2010).

Além disso, mais de 80% dos pacientes com FH, e posteriormente cirrose, desenvolvem carcinoma hepatocelular (CHC) (SZIKSZ et al., 2015; ROLLA et al., 2016; SERTORIO et al., 2015), tendo frequentemente como único tratamento eficaz o transplante de fígado, enquanto a FH em estágio inicial é considerada reversível.

1.2 Células hepáticas estreladas

O processo após a lesão hepática gera respostas aguda e crônica. Quando a lesão hepática aguda não é grave, os hepatócitos são capazes de se regenerar e substituir células apoptóticas e necróticas. Se a lesão segue, o processo regenerativo falha e os hepatócitos são substituídos por tecido fibroso, acompanhadas de inflamação.

No fígado, as células hepáticas estreladas (HSC) foram identificadas como células precursoras responsáveis pelo desenvolvimento da FH. Essas células estão localizadas no espaço perissinusoidal de Disse, definido como uma região entre os hepatócitos e a parede dos capilares sinusoidais hepáticos, formada por células endoteliais sinusoidais (SENOO, 2004; FRIEDMAN, 2008; WINAU et al., 2008). O espaço de Disse contém fibras nervosas e componentes da matriz extracelular (EMC) como fibras de colágeno dos tipos I e III e componentes da membrana basal (VICENTE et al., 1998).

As HSC manifestam dois fenótipos distintos: miofibroblástico (quando estão ativadas) e lipocítico (quando estão quiescentes). Em condições normais, as HSC possuem fenótipo quiescente que é mantido por fatores de transcrição, como o PPAR- α , o PPAR- β e o PPAR- γ . As HSC também são responsáveis por várias funções no fígado, nas quais se destacam o armazenamento de vitamina A, controle da comunicação intracelular e remodelamento da EMC (WINAU et al., 2008; KRIZHANOVSKY et al., 2008).

No estado quiescente, as HSC acumulam gotículas de lipídeos em seu citoplasma, e por isso também são denominadas lipócitos. Sendo responsáveis tanto pela manutenção do tecido hepático, quanto pela síntese de proteínas responsáveis pela formação e degradação de componentes da EMC (GUIMARAES et al., 2007; HERRMANN et al., 2007). Essa adipogênese nas HSC possui um fator fundamental

de regulação, o fator de transcrição PPAR- γ , e sua ativação é necessária para manutenção do fenótipo quiescente (DE MESQUITA et al., 2013; GUIMARAES et al., 2007).

Durante a FH ocorre um evento chave, a ativação de HSC, que provoca a mudança fenotípica das células para uma forma semelhante a dos miofibroblastos. As HSC ativadas aumentam sua proliferação e, conseqüente, a fibrose tissular, impulsionada principalmente pelo fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1).

Ainda, a fisiopatologia da FH inclui a perda de armazenamento de vitamina A e expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês, Glial Fibrillary Acid Protein), alta produção de Actina de músculo liso alfa (α -SMA) e aumento da secreção de colágenos tipo I e III, que contribuem para a distorção e aumento da resistência vascular, contribuindo para a hipertensão portal (BENYON; ARTHUR, 2001).

A ativação de HSC envolve um processo que consiste em duas fases principais: iniciação e perpetuação, seguidas de resolução de fibrose se a lesão for dirimida (FRIEDMAN, 2008). Os estímulos iniciais envolvem a geração de corpos apoptóticos, espécies reativas de oxigênio (EROS) e ativação parácrina, em conjunto com a liberação de lipopolissacarídeo do intestino após lesão hepática (LEE; FRIEDMAN, 2011). Esses estímulos sensibilizam as células e, se persistentes, as HSC mantêm o fenótipo ativado, promovendo o acúmulo de EMC e a inflamação crônica. Nesse sentido, outras células produtoras de EMC contribuem para a formação cicatricial no fígado, incluindo fibroblastos portais e miofibroblastos derivados da medula óssea, bem como células epiteliais que sofrem a transição epitélio-mesenquimal (ZEISBERG et al. 2007). Em relação a isso, algumas evidências *in vitro* têm destacado a possibilidade de que, na presença TGF- β 1, as células possam entrar na transição epitelial-mesenquimal induzindo inflamação crônica e fibrose pós-reparo (WANG et al. 2009).

As HSC são acionadas por quimiocinas e citocinas como TGF- β e a interleucina-6 (IL-6), liberadas por macrófagos receptores de fígado (células de Kupffer), leucócitos infiltrados e outros tipos de células, incluindo hepatócitos danificados. Tanto as HSC ativadas quanto os miofibroblastos são positivos para α -SMA. Os miofibroblastos são a fonte predominante de síntese e deposição de colágeno. O pool de miofibroblastos produtores de matriz extracelular (EMC) é aumentado por diferentes tipos de células, como fibroblastos residentes, células

mesoteliais, fibrócitos circulantes (medula óssea), células epiteliais, células endoteliais, células musculares lisas vasculares e outras células especializadas. Tais células adquirem atividades pró-fibrogênicas e se tornam capazes de expressar componentes da EMC, (SHAH et al., 2015; POROWSKI et al., 2015; GALICIA-MORENO et al., 2009; GRESSNER et al., 2002). A Figura 1 apresenta os principais aspectos discutidos acima relacionados à fisiopatologia da FH.

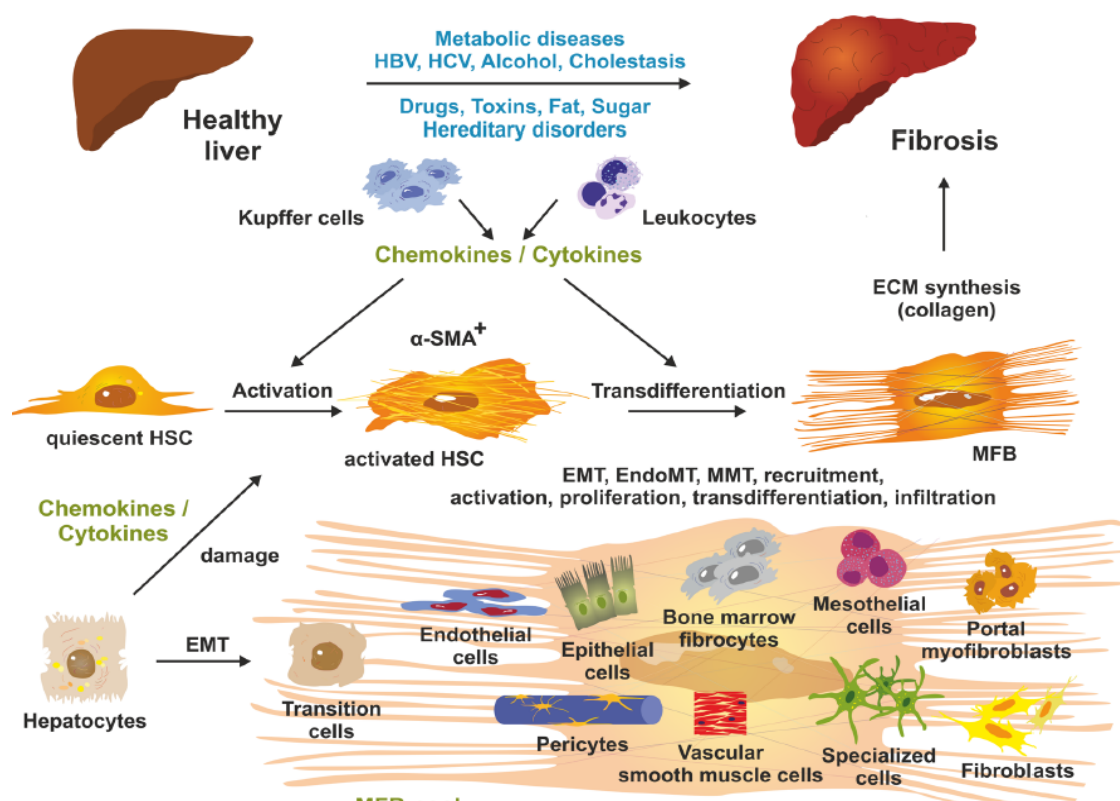


Figura 1- Representação esquemática da patogênese da FH (adaptado de WEISKIRCHEN et al., 2018).

Além disso, as HSC possuem função crucial no sistema imune hepático. Elas expressam receptores para lipopolissacarídeos bacterianos, como Toll-like receptor 4 (TLR4) e citocinas como IL-22 necessárias para a modulação da resposta imune (WINAU et al., 2008; ABDELGHANY et al., 2016).

Na Figura 2 é possível observar as mudanças no espaço perisinusoidal de Disse durante o desenvolvimento da fibrose em resposta à agressão hepática. Quando ocorre a ativação das HSC, aumenta a síntese de colágeno e

consequentemente a deposição da EMC, perda das gotículas de gordura em seu citoplasma e aumento da proliferação celular e de inibidores de metaloprotease tecidual (TIMPs, do inglês, Tissue Inhibitor Metalloprotein) (IREDALE, 2008). Estas alterações têm sido alvo de intensas pesquisas, com a finalidade de elucidar os mecanismos moleculares e celulares de recrutamento, ativação, proliferação, transdiferenciação e infiltração celular (SHAH et al., 2015; POROWSKI et al., 2015).

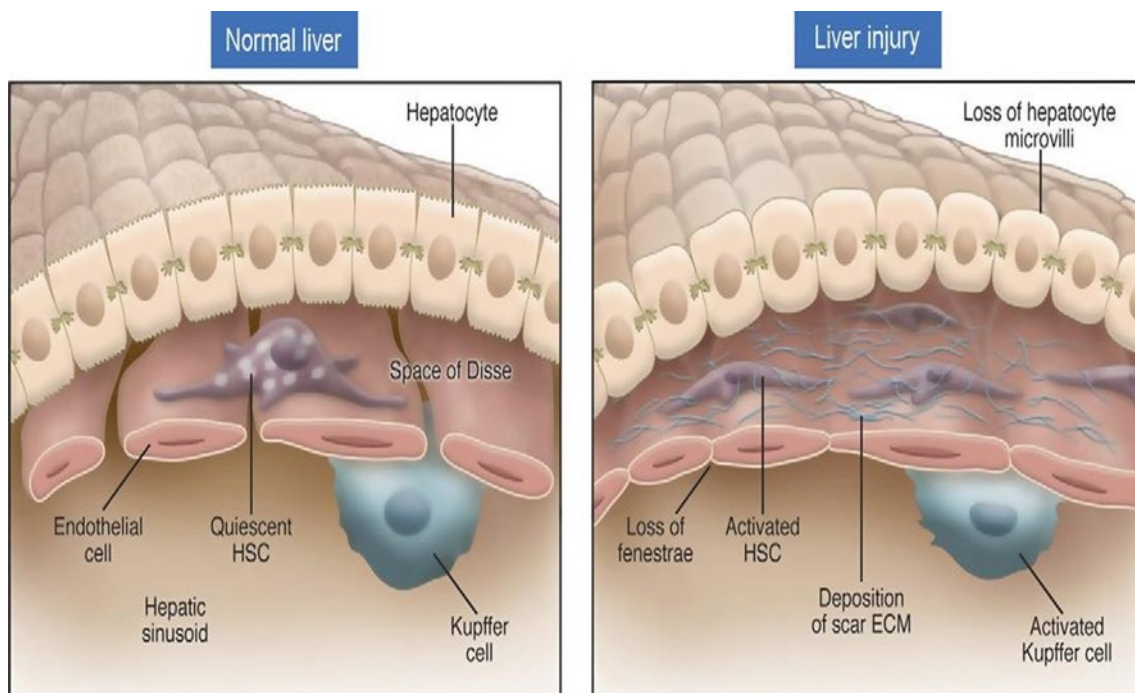


Figura 2 - Representação esquemática da ativação de células hepáticas esteladas (adaptada de IREDALE, 2008).

1.3 Modelos experimentais de fibrose hepática

Existem vários modelos de FH descritos na literatura, dentre os quais se destacam a mudança fenotípica das células GRX (modelo *in vitro*) e a indução de FH por CCl_4 (modelo *in vivo*).

1.3.1 Modelo *in vitro*

A linhagem celular GRX, encontrada em fígado de camundongos, é homóloga às HSC humanas, sendo considerada como um dos melhores modelos experimentais *in vitro* para o estudo da FH. Sob condições padronizadas de cultivo, essas células possuem semelhanças nos aspectos morfológicos e bioquímicos com as células de origem humana. A células GRX são uma linhagem imortalizada de células hepáticas obtidas a partir de granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (BOROJEVIC et al., 1985).

Conforme as condições de padrão de cultivo, a linhagem celular GRX expressa o fenótipo transicional, entre miofibroblastos e lipócitos, pois estão em transição entre o estágio quiescente e o estado ativo (GUIMARAES et al., 2006; HERMANN et al., 2007). Quando ocorre o aumento da taxa de síntese de colágeno nas células e a diminuição dos depósitos de lipídios intracelulares, infere-se que as células estão desenvolvendo o fenótipo miofibroblástico (SOUZA et al., 2008; GUIMARAES et al. 2006).

Além disso, para a confirmação de mudança de fenótipo celular, é necessário a presença de citocinas profibrogênicas e do estresse oxidativo, confirmando a reorganização do citoesqueleto e da EMC. Também foi descrito que esta linhagem possui um comportamento muito similar às HSC no que diz respeito à captação, armazenamento e liberação de retinóides (GRESSNER, 1998). Diante do exposto, a reversão fenotípica das HSC para o fenótipo quiescente, a redução da produção de colágeno e a diminuição da proliferação celular se tornaram alvos terapêuticos, estabelecendo a linhagem celular GRX como um modelo *in vitro* efetivo de HSC para FH (VICENTE, 1998; KIM et al., 2001).

1.3.2 Modelo *in vivo*

A pesquisa da FH *in vivo* fornece informações sistêmicas do corpo, sendo capaz de reproduzir alterações no próprio fígado, como a ativação das HSC e dos marcadores da progressão da doença.

Sabe-se que vários produtos químicos induzem FH e são utilizados para produzir modelos animais experimentais que permitem o estudo da fisiopatologia da FH. Na maioria dos casos, a injeção intraperitoneal (IP) desses produtos desencadeia

a FH em um curto prazo de tempo. Quando administrada por via oral ou por inalação, a fibrose é limitada e leva mais tempo para se desenvolver (SMITH, 2013). Logo, os modelos *in vivo* baseados em produtos químicos são populares devido à sua alta reprodutibilidade, facilidade de uso e reprodução adequada dos mecanismos envolvidos na FH.

Nesse sentido, nos estudos *in vivo* são utilizados como indutores da FH o tetracloreto de carbono (CCl_4), a tioacetamida, a dimetilnitrosamina e a dietilnitrosamina. Destes, o CCl_4 é o agente químico mais utilizado na literatura científica (LIEDTKE ET AL., 2013; TSAI ET AL., 2008) e apresenta diferentes vias de administração, podendo ser via IP, injeção subcutânea, gavagem ou inalação, utilizando como veículo o azeite ou óleo de milho (DELIRE ET AL., 2015; KONG ET AL., 2017). Em muitos aspectos, mimetiza a doença associada a danos tóxicos.

A metabolização hepática de CCl_4 produz o radical triclorometila, que está promove o aumento de radicais livres e processos de peroxidação lipídica (BASU 2003; WEBER ET AL. 2003). A indução do estresse oxidativo provocada pelo CCl_4 provoca uma reação de fase aguda caracterizada por necrose de hepatócitos centrolobulares, ativação de células de Kupffer e indução da resposta inflamatória (HEINDRYCKX ET AL., 2009). Esse encadeamento está associado à produção de várias citocinas, que promovem a ativação das HSC e, por conseguinte, da FH.

Dentre as diferentes linhagens de animais utilizados para a indução de FH, o modelo CCl_4 pode ser aplicado em ratos e camundongos. No entanto, há preferência pelos camundongos devido a maior metabolização do CCl_4 em comparação com ratos (THRALL ET AL. 2000). A linhagem de camundongos BALB/c apresenta maior suscetibilidade para o desenvolvimento da FH no modelo de indução por CCl_4 em comparação com os homólogos C57BL / 6 e DBA / 2 (SHI ET AL. 1997). Após a indução é possível detectar a FH após duas semanas, dependendo da dose e da quantidade de aplicações. Neste sentido, observou-se que os modelos que propõem doses entre 300 a 1000 $\mu\text{l}/\text{kg}$, 2 a 3 vezes por semana, durante 4 e 6 semanas, são os mais utilizados na literatura (LIEDTKE ET AL., 2013; WALKIN ET AL. 2013).

1.4 Tratamento para Fibrose Hepática

Atualmente, intensos estudos sobre a biologia da FH vêm aumentando exponencialmente. Mas infelizmente, até o momento, não existe um agente antifibrótico seguro disponível. Por isso, diferentes alvos terapêuticos vêm sendo estudados para o desenvolvimento de novas terapias antifibróticas. Dentre eles, os mais comuns são: (a) curar a doença primária a fim de evitar a progressão das lesões; (b) reduzir a inflamação para evitar a contínua ativação das células estreladas hepáticas; (c) impedir a ativação das células estreladas hepática; (d) controlar a resposta proliferativa e a fibrogênese das células; (e) estimular a apoptose e a degradação da matriz extracelular (FRIEDMAN, 2008; ROCKEY, 2014).

Logo, várias abordagens vêm sendo estudadas para melhorar a integridade dos hepatócitos e reduzir a transformação de células estreladas quiescentes em miofibroblastos ativados. A abordagem mais prática é a redução da ativação das células estreladas hepáticas através de antioxidantes, fatores de crescimento, como fator de crescimento de hepatócitos, e ligantes de receptores nucleares PPAR. (FRIEDMAN, 2008; FRIEDMAN, 2015).

Os ligantes de PPAR sintéticos demonstraram inibir os efeitos pro-fibróticos e pró-inflamatórios das HSC. Foi demonstrado que essas moléculas promovem a remodelação da fibrose em modelos experimentais. A utilização dos ligantes de PPAR vêm sendo amplamente estudada no tratamento de doenças como diabetes. Em ensaios clínicos de tiazolidinedionas de 2ª e 3ª geração (insulina sintética sensibilizantes agonistas de PPAR como pioglitazona e rosiglitazona) estão agora sendo testados em ensaios clínicos, tanto em *NASH* como em outras doenças. Assim, esses estudos estão fornecendo evidências de atividade antifibrótica de ligantes de PPAR, incentivando o desenvolvimento de agentes similares (IREDALE, 2008; HIGASHI et al., 2017; FRIEDMAN, 2008).

1.5 Bezafibrato

O bezafibrato (BZF) é um medicamento que reduz os níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue. Ele pertence aos fibratos que são uma classe de ácidos carboxílicos anfipáticos, na qual possui atividade agonista para o receptor ativado de peroxissoma alfa (PPAR- α), receptores nucleares envolvidos na transcrição de genes

de oxidação ácida, produção de apolipoproteína, com funções adicionais na inflamação, função endotelial e remodelação vascular (IWASAKA et al., 1999).

Esta atividade agonista provoca a regulação positiva da lipase lipoproteica e apolipoproteína A-I e A-II. A ligação de BZF para PPAR- α também resulta na regulação negativa da apolipoproteína C-III. O efeito pleno é uma redução nos triglicerídeos e um aumento modesto de lipoproteína de alta densidade (SAMAH et al., 2012; ADAMSON, 1984; IWASAKA et al., 1999).

Atualmente estudos sugerem que PPARs atuam na inflamação, regulando de forma negativa a expressão de genes pró-inflamatórios, induzida em resposta a ativação de células inflamatórias (LIN et al., 2010, ZHAO et al., 2010). Recentemente foi descrito que BZF, através ativação de receptores PPAR, regula a expressão de genes envolvidos, não apenas na homeostase lipídica e no metabolismo energético, mas também em muitos outros processos, incluindo inflamação, diferenciação celular e proliferação (SHIPMAN et al., 2016).

Vários estudos têm demonstrado a ação antifibrótica do BZF. Mizuno et al. (2016), verificaram a eficácia para a prevenção de colangite esclerosante primária, no qual demonstrou que o efeito foi mais efetivo em pacientes com função hepática preservada (LIN et al., 2010; OHMOTO et al., 2006). Também foi relatada a capacidade antioxidante do BZF, demonstrada pela diminuição significativa do nível de EROs e pelo aumento da expressão do gene NRF1 em populações de células testadas. Sendo que o NRF1 é um dos principais fatores de transcrição que regula os genes metabólicos e antioxidantes e modula a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (AUGUSTYNIAK et al., 2018; PARMEGGIANI et al., 2019).

Neste contexto, pesquisas vêm indicando que as terapias orientadas para o processo fibroproliferativo, na reversão do fenótipo quiescente e acumulação de EMC, podem ser mais promissoras para a FH. Pois, até então, terapias inicialmente destinadas a inflamação (corticosteróides) não mostraram resultados promissores. Há indícios que agonistas PPAR-s proporcionam uma terapia potencial para doenças fibróticas, através da inibição de TGF- β 1, que induz a diferenciação de miofibroblastos e redução da produção de colágeno tipo I (JIA et al., 2004; TANAKA et al., 2005). Logo, como o PPAR- α é um regulador importante, os seus ligantes podem ser utilizados como agentes terapêuticos para doenças fibróticas (TANAKA et al., 2005; WILLSON et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A fibrose hepática é uma doença crônica caracterizada por um remodelamento da arquitetura hepática juntamente com um acúmulo excessivo de EMC, envolvendo diversos mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, aumento e deposição de colágeno. Dados epidemiológicos apontam que mais de 80% dos pacientes com FH, e posteriormente com cirrose, desenvolvem carcinoma hepatocelular (CHC), tendo frequentemente como único tratamento eficaz o transplante de fígado.

Uma alternativa que tem surgido para o processo de novas terapias é o reposicionamento de fármacos. Esse conceito consiste na utilização de fármacos já estabelecidos para o tratamento de novas doenças. Nesse sentido, o bezafibrato, comumente utilizado para reduzir os níveis de colesterol e triglicérides, tem sido relatado como um potencial agente antifibrótico, prevenindo a inflamação e o estresse oxidativo. Portanto, a presente tese buscou verificar o potencial efeito antifibrótico do BZF em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* como uma possível nova terapia para o tratamento da fibrose hepática.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antifibrótico hepático do Bezafibrato em modelos *in vivo* e *in vitro* de fibrose hepática.

3.2 Objetivo Específicos

- Avaliar os efeitos antifibróticos hepáticos do BZF *in vitro* nas células GRX.
- Avaliar os efeitos antifibróticos hepáticos do BZF em modelo de FH *in vivo*;
- Avaliar os efeitos do BZF na expressão proteica por meio da PCR em tempo real através dos modelos *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar os efeitos do BZF na expressão gênica de marcadores fibróticos por meio de PCR em tempo real nos modelos *in vitro* e *in vivo*;

4. ARTIGO

Artigo submetido à *European Journal of Pharmacology*

Hepatic antifibrotic effects of Bezafibrate *in vitro* and *in vivo* models of liver fibrosis.

Camille Kirinus Reghelin¹, Bruno de Souza Basso¹, Bruna Pasqualotto Costa¹, Arieli Cruz de Sousa³, Matheus Scherer Bastos¹, Bianca Andrade Martha¹, Géssica Luana Antunes¹, Marcella Tornquist Nassr¹, Leonardo Pfeiff Carlessi¹, Lucas Strassburguer Matzenbacher¹, Giovana Vivan Tonial¹, Vitor Giancarlo Schneider Levorse¹, Krist Helen Antunes Fernandes², Jarbas Rodrigues de Oliveira¹, Denizar Alberto da Silva Melo¹

¹Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - RS, Brazil.

²Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - RS, Brazil.

³Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo I, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brazil.

* *Corresponding author:* Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

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, e-mail: jarbas@pucls.br

ABSTRACT

Bezafibrate (BZF) is a medication that reduces cholesterol and triglyceride levels in the blood. Research indicates that BZF, through activation of PPAR receptors, regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis, inflammation, cell differentiation and proliferation. This study investigated the in vitro and in vivo effects of BZF on activated hepatic stellate cells (HSC) and on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. After 72 hours of treatment in vitro, BZF decreased cell proliferation, phenotype reversed, decrease cell contraction and induce autophagy. In addition, BZF promoted a protective effect on tetrachloride-induced liver fibrosis in mice, through antifibrotic actions. These findings suggest that BZF may have a potential antifibrotic effect which could emerge as a possible new therapy for the treatment of liver fibrosis.

Keywords: Bezafibrate; GRX cells; oxidative damage; liver fibrosis.

INTRODUCTION

Hepatic fibrosis (HF) represents the initial stage in the development and progression of other more serious liver diseases, such as cirrhosis and hepatocellular carcinomas, which carry a high risk of morbidity and mortality worldwide (Mallat et al., 2013). It is associated with lesions resulting from viral infections, alcohol abuse, steatosis, metal intoxication and hereditary diseases leading to the accumulation of collagen-rich fibrotic matrix and; in more advanced stages, liver failure and mortality (Török, et al., 2008; da SILVA et al., 2021). It is a public health alert, considering the increased incidence of LF patients, which currently represents one of the ten most common causes of death in the world (Balasundram et al., 2006; Basso et al., 2021).

Hepatic fibrosis is a clinical condition in response to chronic liver damage, characterized by excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) components related with liver healing (Lotersztajn et al., 2014). It is caused by the proliferation and activation of hepatic stellate cells (HSC), and an inability to store vitamin A in cytoplasmic lipid droplets as an increased expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) (Basso et al., 2019; Soon, et al., 2008). It is a chronic, partially reversible disease that, in an advanced stage, can cause portal hypertension, ischemia and loss of liver function. It is initially triggered by metabolic changes and inflammatory process, that activate hepatic fibrosis in response to continuous aggression. (Hernandez-Gea et al.,2011; Pinzani et al., 1999).

Hepatic stellate cells (HSC) reside in the perisinusoidal region together with hepatocytes and endothelial cells representing 8% of the hepatic cell population. HSC present a quiescent phenotype, characterized by the transcription of adipogenic genes forming lipid vacuoles with retinyl esters and triacylglycerides in their intracellular portion. When submitted to injury, HSC perform a process of transdifferentiation from the quiescent phenotype to the activated state that has myofibroblasts-like properties (Gabbiani et al., 2003). The HSC cells lose their lipid vesicles, they increase the proliferation and initiate the synthesis of collagen and extracellular matrix proteins. In addition, there is the recruitment of immune system cells, release of inflammatory and pro-fibrotic cytokines. These conditions are associated with the progression of FH (Guimarães et al.,2007; Mallat et al., 2013).

The evolution of fibrogenesis in the liver tissue is slow and silent, which precludes initial therapeutic intervention to avoid the progress of fibrosis. Despite the

significant elucidation of the mechanisms of FH development, it is necessary research, and investigation of efficient and safe antifibrotic drugs for their treatment. Studies currently evaluate the effectiveness of treatment for initial phase liver fibrosis in order to prevent lesion progression, reduce inflammation, and stellate cell activation by controlling the proliferative response and fibrogenesis of cells (Friedman et al., 2015; Rockey et al., 2014).

Thus, drug repositioning is an alternative for the treatment of FH. The adverse effects of drugs already approved are known, once they have been clinically tested, so they present less risk to the health of patients. Bezafibrate (BZF) is a medication that reduces cholesterol and triglyceride levels in the blood. It belongs to the fibrates, which is a class of amphipathic carboxylic acids, which has agonist activity for the peroxisome activated receptor alpha (PPAR- α) (Ohmoto et al., 2006; Mizuno et al., 2017).

Research has indicated that treatments aimed at decreasing the fibroproliferative process, reversing the quiescent phenotype and ECM accumulation may be more promising for FH. For that reason, PPAR-s agonist drugs provide a potential therapy for fibrotic diseases as they induce the differentiation of myofibroblasts and type I collagen protein (Jia et al., 2004; Tanaka et al., 2005).

Therefore, the present study sought to verify the potential antifibrotic effect of BZF in experimental models *in vitro* and *in vivo* as a possible new therapy for the treatment of FH.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1 *In vitro* experiments

1.1.1 *Cell culture*

HSC murine cells (GRX cells line) were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil; code: 0180). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco™, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco™, USA), 1% streptomycin (100 μ g/mL) and penicillin (100 U/mL) (Gibco™, USA), and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

1.1.2 *Cell number determination*

GRX cells were seeded into 96-well plates at a density of 5 x 10³ cells/well and treated with BZF (10, 20, 30 and 40 μ M) diluted in 0,5% DMSO (Sinth, 01D1011).

GRX cells were also assessed by direct counting using the Trypan blue (Gibco™, USA) exclusion assay. All the experiments used NAC (N-acetylcysteine) 2,5 mM as a positive control. Outcome assessments were performed after a 72 hours period, always in triplicates (n=3).

1.1.3 *Cytotoxicity assay*

To evaluate the cytotoxicity of BZF in cells, a marker of membrane damage, the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme was determined in the supernatant of cell cultures. The cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in 24 well plates and treated with different concentrations (30 and 40 μM) after 72 hours. The experiments were performed in triplicates (n=3). The enzyme activity was measured by the commercial kit Lactate dehydrogenase (Labtest) according to the instructions of the manufacturer. Results are expressed in percentage and calculated by measuring the absorbance at 492 nm using microplate reader.

1.1.4 *Acidic vesicular organelles quantification*

Research suggests that lysosomal content is upregulated in autophagic cellular processes. To identify acidic vesicular organelles (AVOs), we used the lysosomotropic acridine orange (AO) dye. During the AO process, all cells fluoresce green, while acid compartments fluoresce Orange red. GRX cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in 24-well plates and treated with BZF (30 and 40 μM), NAC 2,5 mM and Rapamycin (1 ng/mL), a potent inducer of autophagy (Li et al., 2014). After that, GRX cells were harvested and incubated for 15 minutes with AO (1 μg /mL) at room temperature and protected from light.

1.1.5 *Detection of lipid droplets*

The lipid droplets were analyzed through the oil red technique. The cells were seeded in 24 well plates at a density of 3×10^3 cells per well, with 30 μM and 40 μM concentrations of BZF, after 72 hours. The cells were fixed with 10% formaldehyde and stained with Oil Red O (Sigma,1320-06-5). Intracellular lipid accumulation was verified after 30 minutes, through the inverted optical microscope. The results were calculated as the ratio of absorbance value and number of the cells. The optical density was 492 nm, and experiments were performed in triplicates (n=3).

1.1.6 *Assessment of cell contraction by collagen gel assay*

The cell contraction is a typical feature of the transition from fibroblasts to myofibroblasts. GRX cells were seeded into 24-well plates at a density of 1×10^5 cells per well, with DMEM 4x concentrated in a collagen 4 mg/mL solution. The collagen gels were polymerized for 30 minutes at 37°C with the treatments or NAC 2,5 mM. After 24 hours the images of each gel were obtained, and we were then able to determine the percentage of total surface area occupied on the well plate.

1.2 *In vivo experiments*

1.2.1 *Animals*

Male BALB/c mice with 8 weeks were kept under specific conditions of 12 hours light-dark cycle, the temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and the humidity (50–70%), receiving free access to rodent food and water, in individually ventilated cages. They were from the Central Animal House of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CeMBE; PUCRS; Brazil). The experimental protocol was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA).

1.2.2 *Experimental design*

To evaluate the antifibrotic effect of BZF, the animals with 8 weeks of age were submitted to the protocol of experimental induction of Hepatic Fibrosis. Experimental induction was performed through the periodic administration of CCl_4 (Delire et al., 2015; Liedtke et al., 2013) diluted in olive oil at concentration of 1 ml/kg per body weight injected via I.P. three times a week for ten weeks. The treated group with 50 mg/kg and 100 mg/kg of BZF received selected doses via gavage twice a week, after 24 hours of the administration of the first dose of the induction protocol. After 72 hours of the last dose the animals were sacrificed, and liver sections and serum were collected.

1.2.3 *Biochemical serum analysis*

Blood samples were collected by cardiac puncture and centrifuged for 10 min at 2000 g at 4°C. Serum aspartate aminotransferase (AST) was analyzed with commercial assay kit according to manufacturer's recommendations (Labtest, Brazil).

Histopathology liver analysis

The liver samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin blocks, tissue was cut into 5µm sections and stained with hematoxylin and eosin stain. Liver sections were assessed semiquantitative according to Nonalcoholic Fatty Liver Disease Activity Score (NAS): inflammation (0–2) and ballooning (0–2). Images were captured through the BMX 43 microscope equipped with the digital DP73 camera (Olympus Tokyo Japan). To analyze fibrosis, liver sections were stained with Picrosirius Red (Polysciences, Inc., USA). Liver fibrosis also was semiquantitative determined: fibrosis (0–4). Images were captured through the BMX 43 microscope equipped with (Olympus, Japan).

For immunohistochemistry, the tissue samples were cut into sections of paraffin-embedded blocks and mounted onto slides. The slides were dehydrated and the antigen retrieval was performed in citrate buffer pH=6.0, and samples were washed in PBS. During the blocking step, the sample were incubated with 0,1% of Triton and 5% serum in PBS solution for one hour at room temperature. Primary antibodies, α-SMA and GAPDH, were incubated at a concentration of 1:200 diluted in blocking solution at 4°C overnight. The next step, the samples were washed with PBS and incubated for one hour, with secondary anti-rabbit antibody diluted 1:200 in PBS with TritonX 0,1%. After incubation, the samples were washed with PBS. DAB was used as chromogen and counterstained with hematoxylin, followed by a rehydration step. The samples were mounted with DPX and left to dry completely at room temperature. Images were obtained in the BMX 43 microscope, equipped with the digital DP73 camera. Analysis of stained area were performed by calculating the percentage of the DAB stained area using ImageJ software.

1.2.4 Real-time quantitative PCR (qRT-PCR)

The gene expression of the markers was carried out in experiments "*in vitro* and *in vivo*". In vitro, GRX cells were seeded into 6-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/well and treated with BZF (30 and 40 µM) or NAC 2,5 mM. After 72 hours the total RNA was extracted using TRIzol™ reagent (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. In the "*in vivo*" experiments, the mice liver tissue samples were also extracted by TRIzol reagent. The mRNA was reversely transcribed into cDNA, using the GoScript™ Reverse Transcription System kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. The quantity of cDNA was examined by

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). The expression levels were quantified by qRT-PCR, performed using the StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, USA). The reaction was catalyzed by the SYBR Green I (Applied Biosystems™, USA) kit, according to the manufacturer's instructions. The experiments were performed in duplicate and the reaction products were verified by melting curve analysis. Data were analyzed with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a normalized gene. Table 1 shows the primers sets used.

Table 1 - Primer sequences to qRT-PCR analysis.

Primers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
α-SMA	ACTGGGACGACATGGAAAAG	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Col-1	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	TACTCGAACGGGAATCCATC
TGF-β	GGGAAATTGAGGGCTTTTCGC	TGAACCCGTTGATGTCCACT
PPAR-γ	TGGAATTAGATGACAGTGACTTGG	CTCTGTGACGATCTGCCTGAG
PPAR-α	ACGATGCTGTCCTCCTTGATG	GCGTCTGACTCGGTCTTCTTG
GAPDH	AGTGGCAAAGTGGAGATT	GTGGAGTCATACTGGAACA

2. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison test. Differences were considered significant if the statistical analysis was $P < 0.05$. Statistical GraphPad Prism Version 5.00 was used as a computational tool to analyze data.

3. RESULTS

3.1 BZF decreases GRX cell proliferation

Firstly, GRX cells were exposed to different concentrations of BZF (10, 20, 30, and 40 μM), NAC 2,5 mM (positive control) and DMSO (vehicle control) to assess their antiproliferative effects. After 72 hours of treatment, there was a significant difference between control group and NAC and all doses of BZF. These results indicated that higher doses reduced cell proliferation more effectively, and the doses of 30 μM and 40 μM were chosen to continue with the experiments (Figure 1)

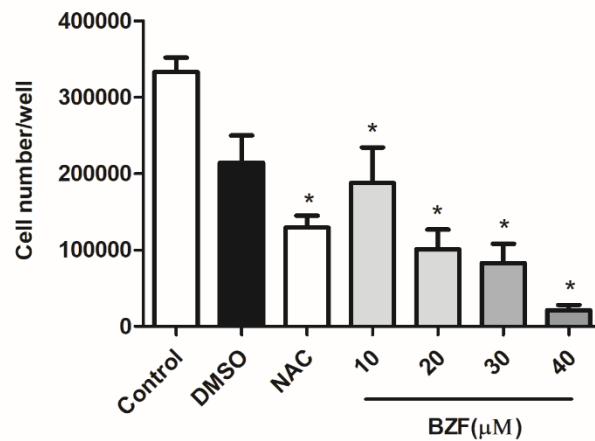


Figure 1 – Effects of BZF on GRX cells after 72h of treatment. The results were expressed as number of cells/well and data represent the mean \pm SD (n = 3). Effect 10, 20, 30 and 40 μ M BZF and NAC (2,5 mM) on GRX number of cells. * p <0.05 when compared with Control and DMSO group.

3.2 BZF does not induce cell membrane damage

This evaluation showed that there was no significant difference between BZF treatment and control group (Figure 2). These results indicate that the decrease of cell number is not related to membrane damage.

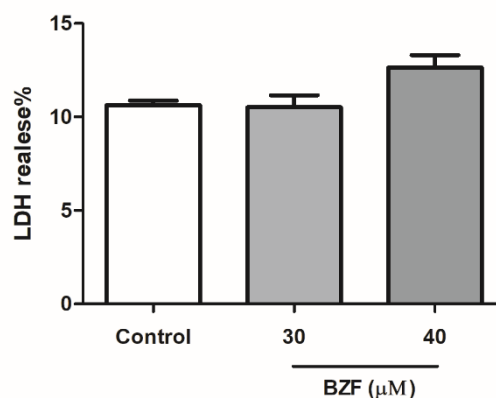


Figure 2– Evaluation of LDH levels in the supernatant after 72 hours of treatment with BZF 30 and 40 μ M. The results were expressed as a percentage of LDH release. Data represent

the mean \pm SD (n = 3); no significant differences were found between the control and treated groups.

3.3 BZF increase the acids vesicles

To looking for a mechanism antiproliferative of BZF, we evaluated the possible induction of apoptosis by the fibrate through the technique of flow cytometry. Our results showed that BZF did not induce apoptosis in GRX cells (data not shown). Next, we evaluated the induction of autophagy, another mechanism that could explain the antiproliferative effect. The results showed that there was an increase in the percentage of acidic compartments (AO positive cells) in response to the treatment. The data showed a significant difference between the BZF treatments for control and DMSO groups. Additionally, the positive control Rapamycin (RAPA 1ng/mL) expressively increased the AVOs (Figure 3A). Furthermore, the treatments with BZF increased more than the RAPA group. Representative flow cytometric plots are shown in Figure 3B. These results suggest that the increase of acids vesicles is one of the cellular responses triggered by BZF in GRX cells, probably activating the autophagic process and reducing the proliferation.

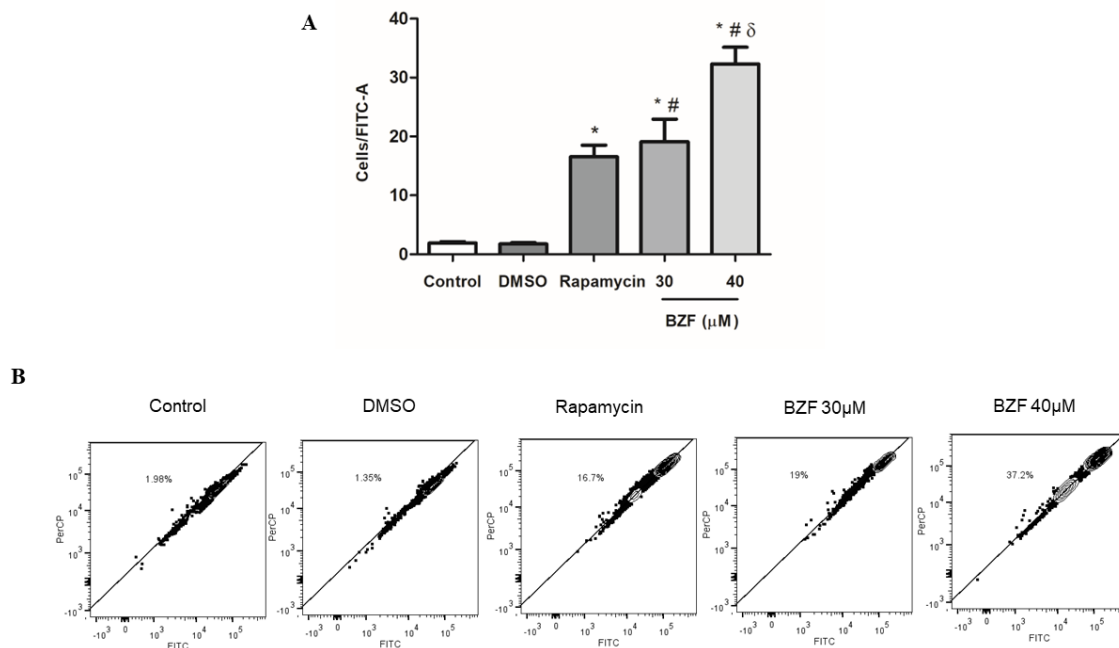


Figure 3- Effect of BZF on the autophagy in GRX cells after 48 hours of treatment. Data represents mean \pm SD (n =3). * p <0.05 when compared with the control group; # p <0.05 when

compared with the DMSO group; § $p < 0.05$ when compared with Rapamycin and 30 μM BZF groups.

3.4 BZF induces phenotypic GRX cell reversion and increase PPARs gene expression

The cellular phenotype was evaluated through the presence of lipid droplets in the cytoplasm and an increase in the presence of accumulation of lipid droplets was observed in GRX cells treated with BZF. (Figure 4A). Results also showed that NAC treatment caused a significant increase in lipid droplets. These results were confirmed by quantifying the accumulation of lipids by reading the absorbance at 492 nm (Figure 4B). The expression of PPARs family genes, an intracellular lipogenic factor, was also evaluated. According to our results, there was a significant increase in the expression of PPAR- γ mRNA (Figure 4C) in cells treated with BZF in relation to the control group, as well as in PPAR- α in the treatment with 40 μM (Figure 4D) of BZF. Our control (NAC) increased expression of PPAR- α gene only. NAC, a PPAR- α -only inducer, has been shown to induce only PPAR alpha and not PPAR- γ mRNA, corroborating our data. These results indicated a phenotypic reversal of activated stellate cells.

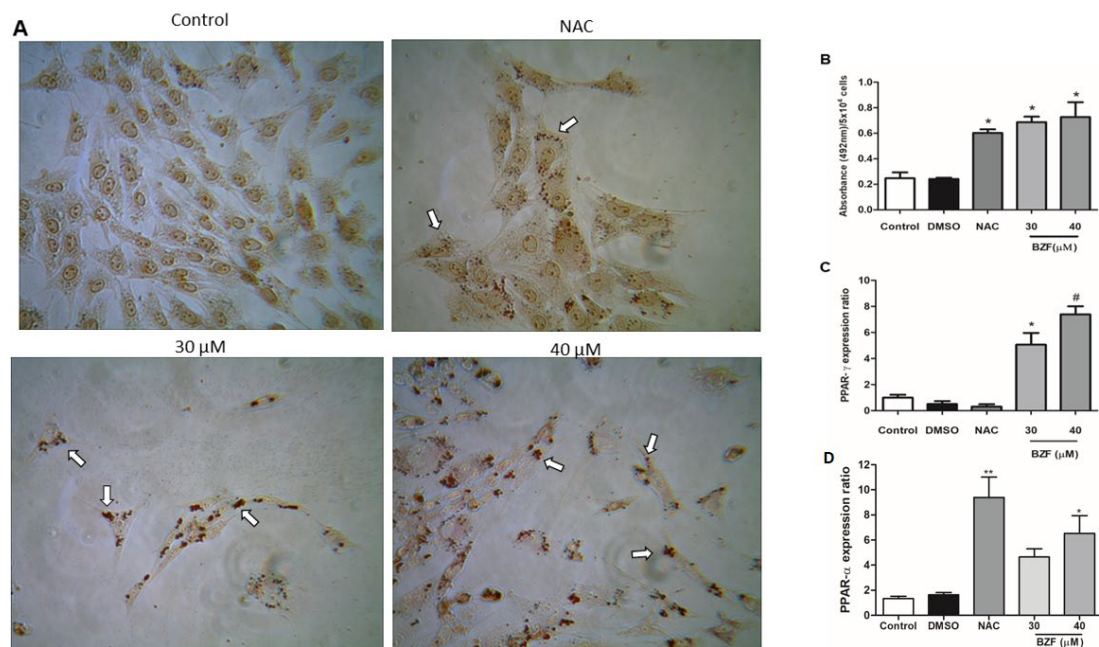


Figure 4 – Assay to evaluate phenotypic reversion on GRX cells, data represent the mean \pm SD (n = 4). **(A)** Oil Red-O lipid staining images with control, NAC (2,5 mM), 30 and 40 μM BZF groups after 72 hours. **(B)** Lipid quantification: * $p < 0.01$ when compared with Control and

DMSO groups. **(C)** Effects of BZF on PPAR- γ mRNA expression in GRX cells. **(D)** Effects of BZF on PPAR- α mRNA expression in GRX cells. Results are expressed as target gene/GAPDH and data represent mean \pm SD. Results were expressed as relative expression of PPAR- γ and PPAR- α , * p <0.05 and ** p <0.01 when compared with the Control and DMSO groups ; # p <0.05 when compared with the Control, DMSO and NAC groups.

3.5 BZF decreases the fibrotic status

The main features of activated stellate cells are increased contraction as well as the production of α -SMA and collagen. The data showed that BZF and NAC treatments significantly decrease cell contraction compared to the control group (Figure 5A). Furthermore, there was a significant decrease in the α -SMA and Col-1 mRNA expression in GRX cells treated with BZF when compared to the control and DMSO groups (Figure 5B and 5C), These results suggest a phenotypic change, a typical feature of the transition from myofibroblasts to quiescent cells.

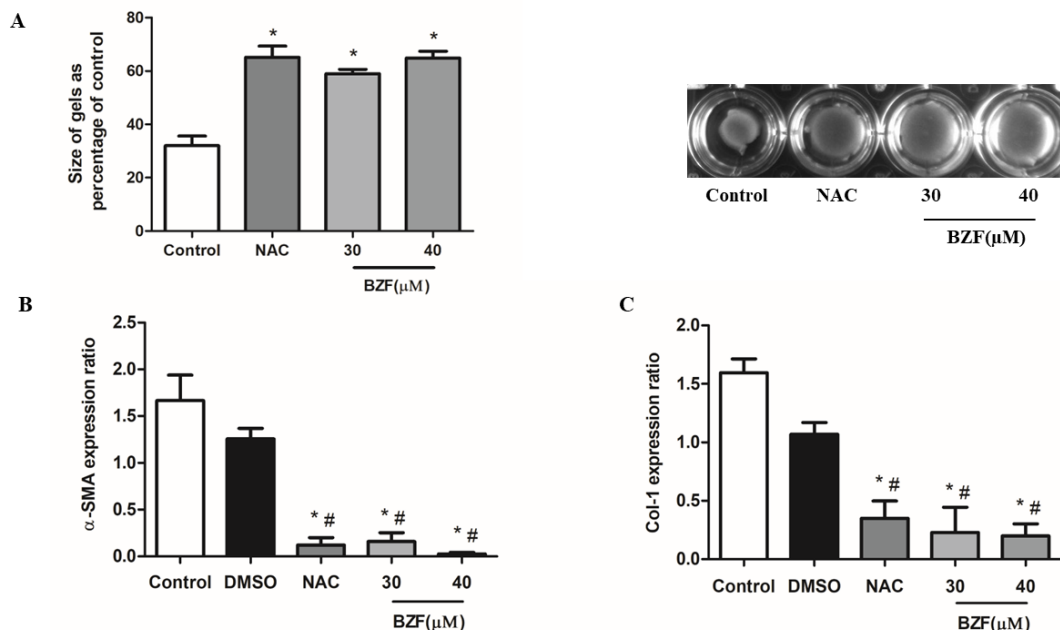


Figure 5 – Effects of BZF on GRX cells after 72 h of treatment on cellular contraction assessed by collagen gel assay. The wells represent the contractile profile of control, 2,5 mmol NAC, 30 and 40 μ M BZF groups. Data represent the mean \pm SD (n = 4). **(A)** Cellular contraction: * p <0.05 when compared with Control group. **(B)** α -SMA expression: results were expressed as relative expression of α -SMA: * p <0,05 when compared with Control group; # p <0,05 when compared with DMSO group. **(C)** Col-1 expression: results were expressed as relative

expression of Col-1: * $p < 0,05$ when compared with Control group; # $p < 0,035$ when compared with DMSO group. Results are expressed as target gene/GAPDH and data represent mean \pm SD (n=4).

3.6 BZF decreased liver injury induced by CCl₄

The serum AST parameter was evaluated to assess liver damage. There was a significant decrease between the 50 and 100mg/kg BZF groups and CCl₄ group, suggesting a possible protective effect of BZF (Figure 6)

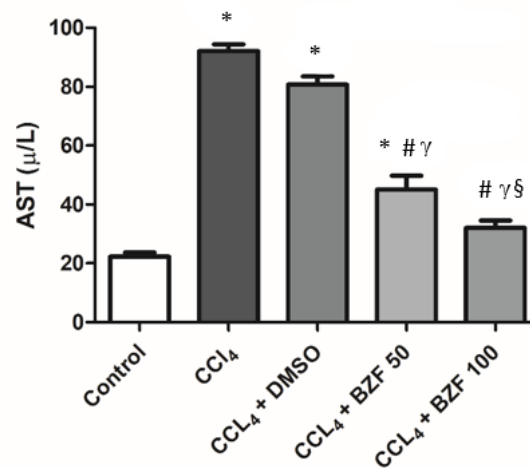


Figure 6- Effect of BZF on serum markers of liver damage AST. Data represent the mean \pm SD (n = 5); * $p < 0.05$ when compared CCl₄, CCl₄+DMSO and CCl₄+BZF 50 mg/Kg with control group. # $p < 0.05$ when compared CCl₄+BZF 50 mg/Kg and CCl₄+BZF 100 mg/Kg groups with CCl₄ group; $\gamma p < 0.05$ when compared CCl₄+BZF 50 mg/Kg and CCl₄+BZF 100 mg/Kg groups with CCl₄+DMSO group; § $p < 0,05$ when compared CCl₄+BZF 100 mg/Kg group with CCl₄+BZF 100 mg/Kg group.

3.7 BZF attenuates CCl₄ induced liver injury and inflammation

To analyze the inflammation degree, we investigated pathological features such as the extent of inflammatory cell infiltration and ballooning through H&E staining. The treatment with BZF was able to reduce the inflammatory infiltrates compared with CCl₄ and CCl₄ + DMSO groups (Figure 7A and B), as well as the ballooning parameters (Figure 7C).

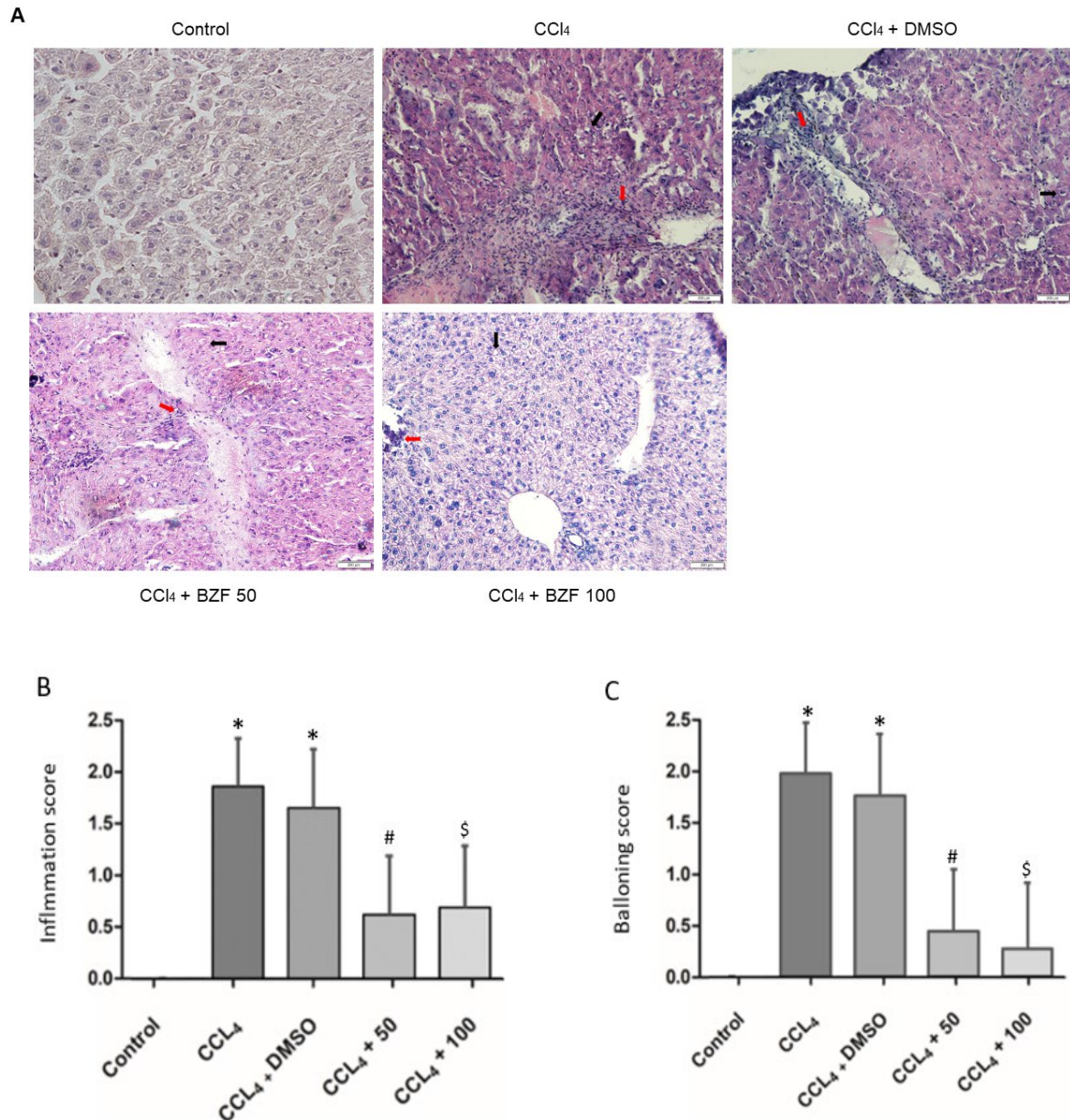


Figure 7- In vivo effect of BZF on liver fibrosis. (A) Lobular inflammation was evaluated with H&E staining on Control, CCl₄, CCl₄+DMSO, CCl₄+BZF 50 mg/Kg and CCl₄+BZF 100 mg/Kg groups (inverted light microscope at a magnification of 400x). Black arrow indicates ballooning and red arrow indicates inflammation. (B) Inflammation score: * $p < 0.05$ when compared with the Control group. # $p < 0.001$ when compared BZF 50 mg/kg with CCl₄ and CCl₄+DMSO groups; \$ $p < 0.05$ when compared BZF 100 mg/kg with CCl₄ group. (C) Balloon: * $p < 0.05$ when compared CCl₄ and CCl₄+DMSO groups with the Control group; # $p < 0.001$ when compared BZF 50 mg/kg with CCl₄ and CCl₄+DMSO groups; \$ $p < 0.001$ when compared BZF 100 mg/kg with CCl₄ and CCl₄+DMSO groups. Data represent the mean \pm SD (n = 5).

3.8 BZF attenuates CCl₄ induced liver fibrosis.

To assess the effect of BZF on CCl₄-induced liver fibrosis, we stained tissue slides with Sirius red. Our results showed that CCl₄ increased the liver fibrotic area and BZF reversed this effect. (Fig. 8A and B).

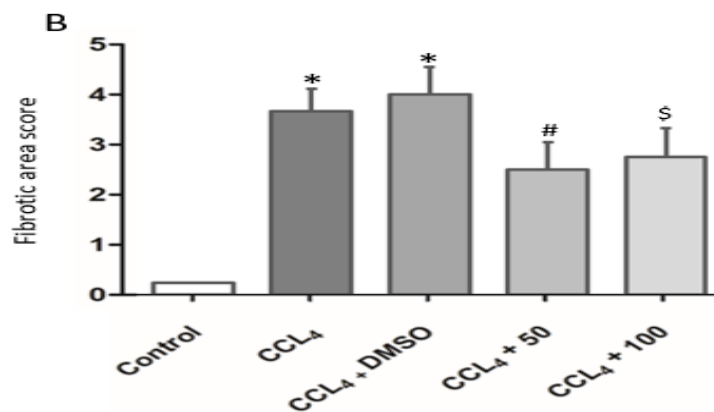
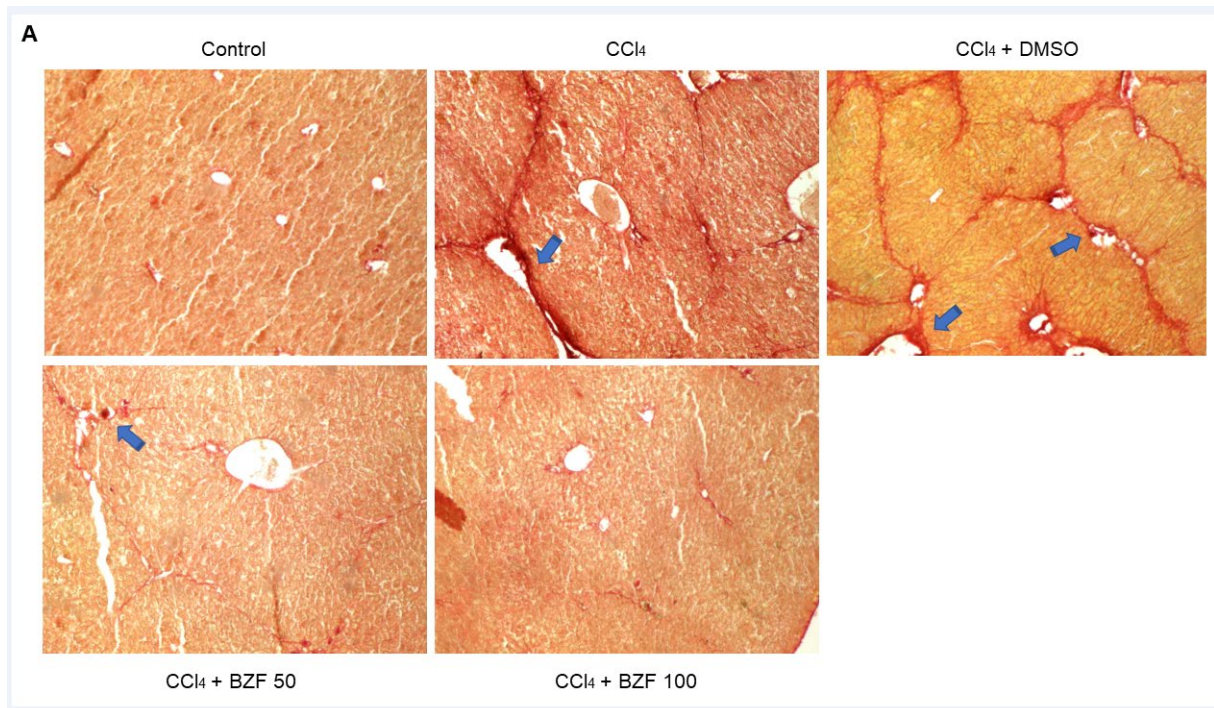


Figure 8- In vivo effect of BZF on liver fibrosis. (A) Lobular fibrosis was evaluated with Sirius red staining on Control, CCl₄, CCl₄+DMSO, CCl₄+BZF 50 mg/Kg and CCl₄+BZF 100 mg/Kg groups (inverted light microscope at a magnification of 400x). Blue arrow indicates fibrotic areas. (B) Fibrosis score: *p<0.05 when compared with the Control group. #p<0.05 when

compared BZF 50 mg/kg with CCl₄ and CCl₄+DMSO groups; §p<0.05 when compared BZF 100 mg/kg with CCl₄ group. Data represent the mean ± SD (n = 5)

3.9 BZF decrease protein and gene expression of α -SMA

In this evaluation, we observed that animals treated with CCl₄, the α -SMA area (protein) significantly increased and BZF reversed this effect (Figure 9A and B). these results were confirmed through the evaluation of α -SMA gene expression (Figure 9C)

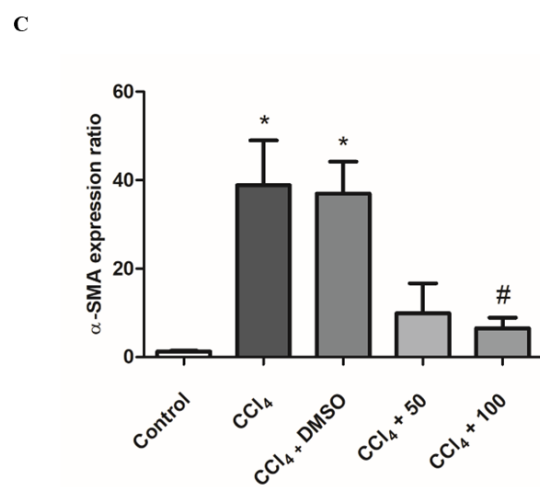
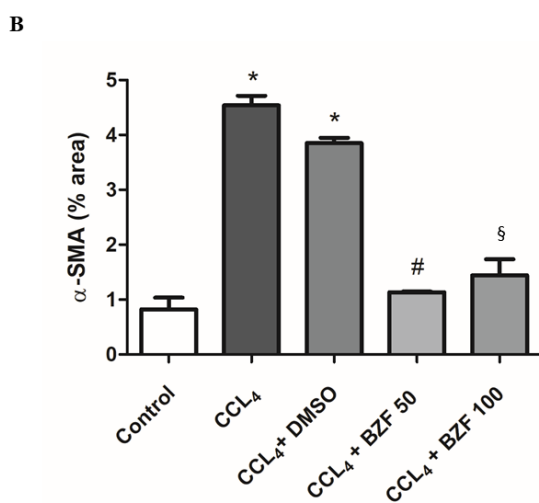
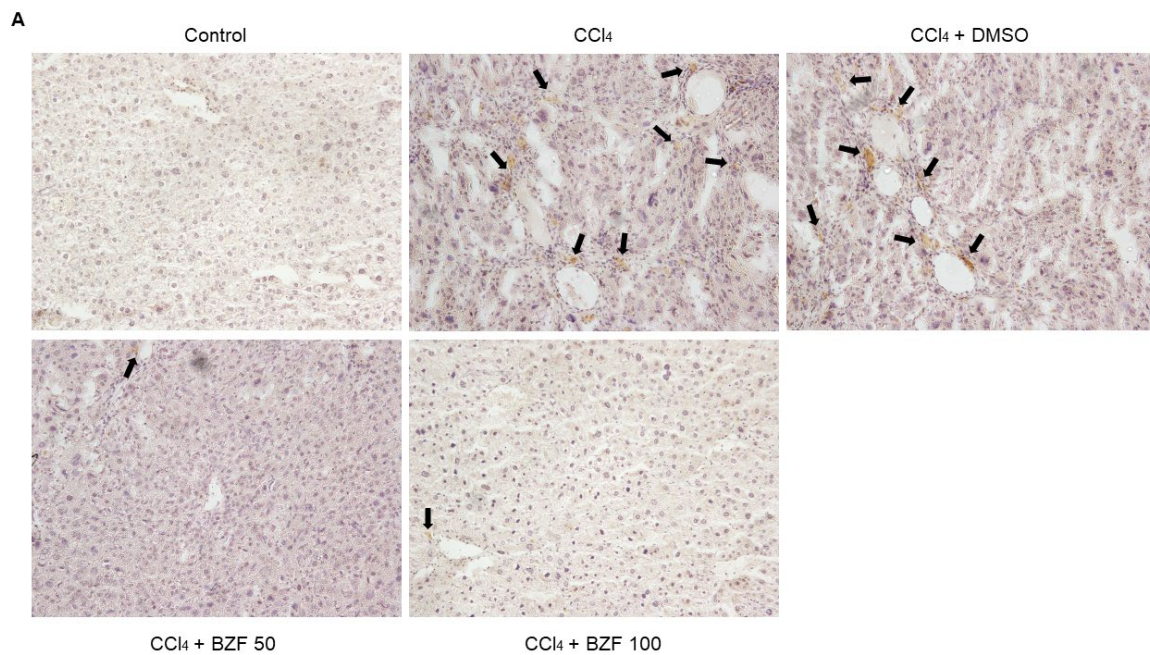


Figure 9: *In vivo* effect of BZF on liver fibrosis. **(A)** Images of immunohistochemistry (IHQ) α -SMA. Black arrow indicates the stained area by α -SMA. **(B)** Percentage of the α -SMA area: * $p < 0.05$ when compared with the control group; # $p < 0.05$ when compared with CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups; § $p < 0.02$ when compared with CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups. **(C)** α -SMA: * $p < 0.05$ when compared with Control group. # $p < 0.05$ when compared with CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups. Data presented as mean \pm S.D.

3.10 BZF reduces the expression of TGF- β , Col-1 mRNA expression in the liver

We have also evaluated the relative mRNA expression of Col I and TGF- β genes which are related to activation and resolution of fibrosis. The results showed that the relative expression of Col I are decreased in the treated groups ($\text{CCl}_4 + 50$ mg/kg e $\text{CCl}_4 + 100$ mg/kg) when compared to the induction (CCl_4) and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups (Fig. 10 A). Results have shown that there was a significant reduction too at TGF- β in the treated groups with BZF when compared to the induction group (CCl_4), demonstrating a significant decrease in pro-fibrogenic cytokines (Fig. 10 B). We observed that there was a reduction in the collagen hepatic production in the treated groups ($\text{CCl}_4 + 50$ mg/kg e $\text{CCl}_4 + 100$ mg/kg) when compared to the CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups (Fig. 11)

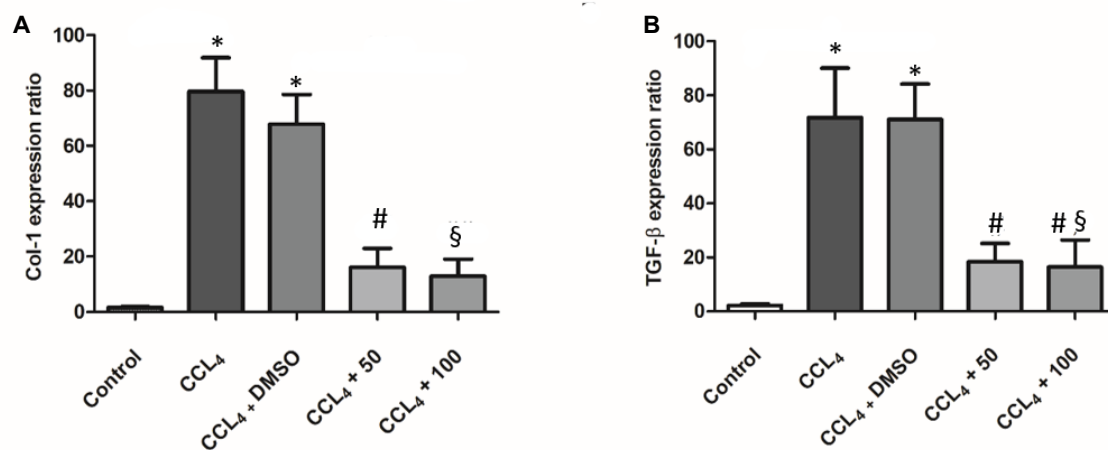


Figure 10: *In vivo* effect of BZF on liver fibrosis. **(A)** Col-1: * $p < 0.05$ when compared with the control group. # $p < 0.05$ when compared with CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups; § $p < 0.05$ when compared with CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups. **(B)** TGF- β : * $p < 0.05$ when compared with the control group. # $p < 0.05$ when compared with CCl_4 and $\text{CCl}_4 + \text{DMSO}$ groups; § $p < 0.05$ when

compared with CCl₄ and CCl₄+DMSO groups. Results are expressed as target gene/GAPDH and data represent mean \pm SD (n=4).

4. DISCUSSION

Hepatic fibrosis (HF) is a wound healing response that occurs in liver chronic injury, involving excessive deposition of extracellular matrix (ECM). HF is characterized by distortion of hepatic architecture associated with portal hypertension, ascites, which eventually progress to liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Cirrhosis is the terminal stage of progressive liver fibrosis, affecting 1 to 2% of global population, resulting in annual direct and indirect costs for the care health exceed \$12 billion in the U.S. only (Caballería et al., 2018, Friedman 2015, Higashi et al., 2017).

Currently, there is no effective therapy for the treatment of liver fibrosis. It is very important to find mechanisms that can help develop new treatments. (Hou et al., 2018; Friedman 2015; Tsuchida et al, 2017). The repositioning of drugs is an alternative that has emerged as new therapies. This concept consists of the use of already established drugs for the treatment of other diseases. In this sense, BZF, commonly used to treat hypertriglyceridemia and atherosclerotic plaques, has been reported as a potential anti-inflammatory agent, preventing inflammation and oxidative stress (Ayaori et al., 2008; Schuppan et al., 2018).

The drug BZF is a member of the PPAR agonist family, operating as an agonist for all three PPAR isoforms (alpha, gamma, and delta) (Tenenbaum and Fisman, 2012). Research indicates that PPARs act directly in the regulation of processes related to fibrogenesis, including cell differentiation and wound healing (Lakatos et al., 2007; Milam et al., 2008). Our objective was to evaluate the effect of BZF on liver fibrosis *in vitro* and *in vivo*.

The present study demonstrated that *in vitro*, BZF promotes the reduction of proliferation, the expression of markers phenotypic activation and cellular contraction decrease of HSCs activated cells. Our results demonstrated that the total number of GRX cells decreased after exposure to BZF 10, 20, 30 and 40 μ M concentrations. The doses of 30 μ M and 40 μ M were chosen to continue with the experiments because they seem to have better effects. Our results demonstrated that the treatment with BZF did not show cytotoxicity on GRX cells. LDH was measured and there was no relationship between the decrease of cell proliferation and death due cells necrosis. These results are in consonance with other studies where proliferation is an important

aspect of activated HSCs and their inhibition has demonstrated to ameliorate liver fibrosis (Thoen et al., 2011).

As BZF decreased the proliferation of activated stellate cells, we initially evaluated its effect on the induction of apoptosis. Our results showed that BZF did not induce programmed cell death (data not shown). Next, we looked for another mechanism for the antiproliferative effect and, for this reason, we evaluated the autophagy induction. In general, autophagy is a pro-survival stress response and serves to remove damaged and potentially harmful organelles, thereby supporting cell survival. Defective autophagy leads to tissue damage, necrosis and chronic inflammation and autophagy activation has an anti-inflammatory effect. So, autophagy is an intracellular regulatory process that allows homeostasis and the basal rate of autophagic production is extremely essential for liver function, preventing damage to hepatocytes, however, when in excess, it is being considered a type of cell death. (Codogno et al., 2013). BZF administered at doses of 30 μ M and 40 μ M, demonstrates to activate the autophagy pathway, by which it can exert its antiproliferative effect, preventing hepatic fibrosis (Mallat et al., 2014; Codogno et al., 2013). (Hernandez-Gea, et al., 2013; Mallat et al., 2014).

Under normal conditions, HSCs have a quiescent phenotype, characterized by the accumulation of lipid droplets in their cytoplasm, especially vitamin A. In addition, they have a low proliferation rate and regulate the components of EMC (Guimaraes et al., 2007). Activation of HSCs is characterized by the loss of fat droplets, an increase in the number of cells, transdifferentiation into myofibroblast-like cells and a grow in ECM secretion (Pellicoro et al., 2014). Our study revealed a significant increase in lipid droplets, evidenced by ORO staining, in which a significant elevation in the production of lipids in treated cells was confirmed through the quantification of the total lipid content. Therefore, lipid droplets are a key feature of quiescent HSCs and the treatment shown to collaborate to inhibit HSC activation (Thoen et al., 2011).

PPAR activation in the liver is associated with beta oxidation mechanism and increase activity of lipogenic pathways. Among the three best-known isoforms, PPAR γ is essential for hepatic lipogenesis activities through its target's genes SREBP-1c and FAT/CD36, and studies have shown that PPAR γ plays an important role in lipogenic activity in the liver (da Silva, et al., 2015). The treatment with bezafibrate increases PPAR γ and PPAR α mRNA expression, in according to the results obtained with Oil

Red-O, confirming the reversion of GRX cells to a quiescent phenotype. NAC treatment did not increase significantly the PPAR γ expression, but, according to the literature, its effect is related to the PPAR α activation, and our results corroborate these data, that is, the NAC activated only the PPAR α mRNA expression.

The development of hepatic fibrosis is based on the activation of HSCs. At the beginning of fibrogenesis, grow the rate of cell proliferation. ECM deposition is mainly composed of fibronectin and fibers of collagen type I, modifying the tissue, and leading to loss of function (Fernández-Iglesias et al., 2017; Marrone et al., 2016). An inevitable consequence of this process is a progressive increase in tissue stiffness (Pellicoro et al., 2014). Thus, our results show the reduction in cell contraction observed in the measurement of collagen gel size and a decrease of collagen type I mRNA expression. Research indicates that the most reliable marker of activation of HSCs is a protein α -SMA, one of six isoforms of actin expressed in mammalian tissues, typical of smooth muscle cells and myofibroblasts (Kisseleva et al., 2012; Sun, 2016). Therefore, when HSCs are activated, they express α -SMA and are absent in lipocytic cells. The treatment with BZF seems to collaborate with decrease of α -SMA mRNA expression.

We investigated the potential therapeutic effect of BZF on the GRX cell line. Our results demonstrated that the BZF can collaborate in the deactivation of HSC cells. Therefore, we also investigated the effect of BZF treatment in the model *in vivo* of CCl₄-induced liver fibrosis was investigated. The periodic administration of CCl₄ on alternate days with the treatment of BZF was via I.P, lasting 10 weeks. The treatment with BZF in BALB/c males proved to be safe for the animals, as in other experiments in the literature.

In vivo experiments demonstrated that CCl₄ treatment provoked a significant increase of AST enzyme in serum, which means that CCl₄ damaged the liver. The animals that received the treatment with BZF demonstrate a decrease in AST levels, suggesting a protective effect. Our study did not find significant changes in serum ALT concentrations (data not shown) in any experimental groups. These findings corroborate recent studies which showed that 59% of patients with a histological diagnosis of FH had normal ALT serum values (Caballería et al., 2018; Enomoto et al., 2015).

In first phase of HSCs activation, pro-inflammatory and profibrogenic stimulus are released and act in an autocrine and paracrine manner through inflammatory cells

and injured hepatocytes. The perpetuation of myofibroblast activation results from several positive feedback loops involving, among other cytokines, transforming growth factor β (TGF- β) (Marrone et al., 2016; Pellicoro et al., 2014), that promotes survival and maintenance of the myofibroblast phenotype. (Liu et al., 2006; Dias et al., 2017). Our results showed that BZF can decrease TGF- β gene expression in CCl₄-treated animals, protecting the liver from collagen increase.

Histological scale ratings are used to assess the stage of liver inflammation and liver fibrosis. In our results, the histopathologic analysis shows that BZF reduced the inflammatory parameters and ballooning and the gene expression in the treated mice. While the untreated animals, just submitted to the model of liver fibrosis by CCl₄ injection, showed an increase in those parameters. Immunohistochemical method identifies specific matrix components, for example α -SMA, to pinpoint the extent of stellate cell activation. This method helps to assess the progression of fibrosis (Friedman, 2015; Surendran, 2017). In agreement with other results, the treatment with BZF decreased the α -SMA gene expression, indicating a modulating effect of BZF on activated HSCs phenotype in liver. Our results show that the treatment with BZF reduced the mRNA expression of α -SMA, collagen I and TGF- β .

Some aspects of the pharmacological mechanism of BZF are not fully understood, but it is acknowledged that among the known therapeutic effects, BZF acts in the modulation of PPAR γ consequently, regulating the expression of genes involved in diverse processes, including lipid homeostasis, cell differentiation and inflammation (Grings et al., 2017, Huang et al., 2017). The literature has already certified the important modulatory role in the activation of PPAR γ in HSC (Basso et al., 2018; Guimaraes et al., 2007). All these aspects converge with the results obtained in our study. Our results also showed that BZF can induce PPAR α gene expression in activated hepatic stellate cells, possibly potentiating its antifibrotic effect.

Conclusion

In conclusion, our data reveal that BZF treatment was able to induce the phenotypic reversion of HSC, through the ability to induce fat stored in the cell cytoplasm via PPAR γ and PPAR α . Our results also showed that treatment with BZF, in a mouse model of FH, was able to decrease profibrotic and inflammatory markers, improving histological characteristics in liver tissue. Therefore, our research

demonstrated that BZF it is a potential agent in the treatment of liver fibrosis and open a possibility to further investigate the role of BZF in the treatment of hepatic fibrosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

DECLARATION OF INTEREST

The authors do not have any conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

This article does not contain any studies with human participants, performed by any of the authors.

5. REFERENCES

- Ayaori, M., Momiyama, Y., Fayad, Z.A., Yonemura, A., Ohmori, R., Kihara, T., Tanaka, N., Nakaya, K., Ogura, M., Sawada, S., Taniguchi, H., Kusuhara, M., Nagata, M., Nakamura, H., Ohsuzu, F., 2008. Effect of bezafibrate therapy on atherosclerotic aortic plaques detected by MRI in dyslipidemic patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*.196, 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.035>
- Balasundram N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99, 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Basso, B. de S., de Mesquita F.C., Dias, H.B., Krause, G.C., Scherer, M., Santarém, E.R., de Oliveira, J.R., 2019. Therapeutic effect of *Baccharis Anomala* DC.Extracts on activated hepatic stellate cells. *EXCLI Journal* 18, 91-105. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1696>
- Basso, B. de S., Haute, G.V., Ortega-Ribera, M., Luft, C., Antunes, G.L., Bastos, M.S., Carlessi, L.P., Levorse, V.G., Cassel, E., Donadio, M.V.F., Santarém, E.R., Gracia-Sancho, J., de Oliveira, J.R., 2021. Methoxyeugenol deactivates hepatic stellate cells and attenuates liver fibrosis and inflammation through a PPAR- γ and

- NF-K β mechanism. *J. of Ethnopharmacology*. 280, 114433. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114433>
- Caballería, L., Torán, P., Caballería, J., 2018. Markers of hepatic fibrosis. *Med Clin*. 150, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.08.009>
- Codogno, P., Meijer, A.J., 2013. Autophagy in the liver. *Journal of Hepatology*. 59, 389-391. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.031>
- da Silva, E.F.G., Costa, B.P., Nassr, M.T., Basso, B.S., Bastos, M.S., a, Antunes, G.L., Reghelin, C.K., Garcia, M.C.R., Levorse V.G.S., Carlessi, L.P., Fernandes, K.H.A., Schmitz, C.R.R., Haute, G.V., Luft, C., Santarém, E.R., Barbé-Tuana, F.M., Donadio, M.V.F., Basso, L.A., Machado, P., de Oliveira, J.R., 2021. Therapeutic effect of uridine phosphorylase 1 (UPP1) inhibitor on liver fibrosis *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmacology*. 890, 173670. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173670>
- da Silva, S.B., Mello, V.S., Magliano, D'Angelo C., Marinho, T. de S., Aguila, M.B., de Lacerda, C.A.M., 2015. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. *Life Sciences*. 127, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.003>
- Dias, H.B., Krause, G.C., Squizani, E.D., Lima, K.G., Schuster, A.D., Pedrazza, L., Basso, B. de S., Martha, B.A., de Mesquita, F.C., Nunes, F.B., Donadio, M.V.F., de Oliveira, J.R., 2017. Fructose-1,6-bisphosphate reverts iron-induced phenotype of hepatic stellate cells by chelating ferrous ions. *BioMetals* 30, 549–558. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0025-y>
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*. 186, 421–431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-l](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-l)
- Enomoto, H., Bando, Y., Nakamura, H., Nishiguchi, S., Koga, M., 2015. Liver fibrosis markers of nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 21, 7427-7435. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i24.7427>
- Fernández-Iglesias, A., Gracia-Sancho, J., 2017. How to face chronic liver disease: the sinusoidal perspective. *Frontiers of Medicine*. 10, 4-7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00007>
- Friedman, S.L, 2015. Hepatic Fibrosis: Emerging Therapies. *J. Digestive Diseases*. 33, 504-507. <https://doi.org/10.1159/000374098>

- Gabbiani, G., 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 200, 500–503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Pletsch, J.T., Cardoso, G.M.F., August, P.M., Matté, C., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Leipnitz, G., 2017. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *BBA- Molecular Basis of Disease.* 1863, 2135-2148. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.05.019>
- Guimarães, E.L.M., Franceschi, M.F.S., Andrade, C.M.B., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Margis, R., Bernard, E.A., Guma, F.C.R., 2007. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver International.* 27, 1255–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01578.x>
- Hernandez-Gea V, Friedman SL., 2011. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 6, 425–56. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>.
- Hernandez-Gea, V., Hilscher, M., Rozenfeld, R., Lim, M.P., Nieto, N., Werner, S., Devi, L.A., Friedman, S.L. 2013. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy, *Journal of Hepatology.* 59, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.016>
- Higashi, T., Friedman, S.L., Hoshida, Y., 2017. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 121, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
- Hou, W., Syn, W-K., 2018. Role of Metabolism in Hepatic Stellate cell activation and fibrogenesis. *Frontiers in Cell and Development Biology.* 6, 150. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00150>
- Huang, Y., Deng, X., Liang, J. 2017. Modulation of Hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis. *Experimental Cell Research.* 352, 420-426. <https://doi.org/10.1016/j.yexer.2017.02.038>
- Jia, N., Li, T., Diao, X., Kong, B., 2014. Protective effects of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract on hydrogen peroxide-induced damage in lung fibroblast MRC-5 cells in relation to the antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 11, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.011>
- 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., 2012. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *PNAS*. 109, 9448–9453. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201840109>
- Lakatos, H.F., Thatcher, T.H., Kottmann, R.M., Garcia, T.M., Phipps, R.P., Sime, P.J., 2007. The Role of PPARs in Lung Fibrosis. *PPAR Res.* 2007, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2007/71323>
- Liu, X., Hu, H., Yin, J.Q., 2006. Therapeutic strategies against TGF- β signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver International*. 26,8-22. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231>
- Mallat, A., Lotersztajn, S., 2013. Cellular mechanisms of tissue fibrosis.5. Novel insights into liver fibrosis. *American Journal Physiology- Cell Physiology*. 305, 89-99. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00230.2013>
- Mallat, A., Lodder, J., Teixeira-Clerc, F., Moreau, R., Codogno, P., Lotersztajn, S., 2014. Autophagy: a multifaceted partner in liver fibrosis. *BioMed Research International*. 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/869390>
- Marinković, A., Mih, J.D., Park, J.-A., Liu, F., Tschumperlin, D.J., 2012. Improved throughput traction microscopy reveals pivotal role for matrix stiffness in fibroblast contractility and TGF- β responsiveness. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 303, L169–L180. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00108.2012>
- Marrone, G., Shah, V.H., Gracia-Sancho, J., 2016. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J. Hepatology*. 65, 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.018>
- Milam, J.E., Keshamouni, V.G., Phan, S.H., Hu, B., Gangireddy, S.R., Hogaboam, C.M., Standiford, T.J., Thannickal, V.J., Reddy, R.C., 2008. PPAR- γ agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 294, L891–L901. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00333.2007>
- Mizuno, S., Isayama, H., Hirano, K., Watanabe, T., Takahara, N., Kogure, H., Matsubara, S., Nakai, Y., Tada, M., Koike, K., 2017. Factors predictive of the efficacy of bezafibrate therapy in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatol. Res.* 47, 1102–1107. <https://doi.org/10.1111/hepr.12846>
- Nauck, M.A., 2011. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties,

- functions, and clinical implications. *American Journal of Medicine*. 124, 3-18.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.11.002>
- Ohmoto, K., Yoshioka, N., Yamamoto, S., 2006. Long-term effect of bezafibrate on parameters of hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis. *J. Gastroenterol.* 41, 502–503. <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1778-1>
- Pellicoro A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., Fallowfield, J.A., 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews, Immunology*. 14, 181-194. <https://doi.org/10.1038/nri3623>
- Pinzani, M. & Gentilini, P., 1999. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin. Liver Disease*. 19, 397–410. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007128>
- Schuppan, D., Ashfaq-Khan, M., Yang, A.T., Kim, Y.O., 2018. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biology*. 69, 435–451. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.006>
- Soon, R.K. & Yee, H. F., 2008. Stellate Cell Contraction: Role, Regulation, and Potential Therapeutic Target. *Clinical Liver Disease*. 12, 791–803. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2008.07.004>
- Sun, K.-H., Chang, Y., Reed, N.I., Sheppard, D., 2016. α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 310, L824–L836. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00350.2015>
- Surendran, S.P., Thomas, R.G., Moon, M.J., Jeong Y.Y., 2017. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *International Journal of Nanomedicine*. 12, 6997-7006. <https://doi.org/10.2147/IJN.SI45951>
- Takahashi, Y., Sugimoto, K., Inui, H., Fukusato, T., 2015. Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 21, 3777-3785. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i13.3777>
- Tenenbaum, A., Fisman, E.Z., 2012. Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc. Diabetol.* 11, 140. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-140>
- Thoen LF, Guimarães EL, Dollé L, Mannaerts I, Najimi M, Sokal E, van Grunsven LA. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J Hepatol*. 2011

Dec;55(6):1353-60. doi: 10.1016/j.jhep.2011.07.010. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21803012.

Török, N. J. 2008. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis.

J. Gastroenterology. 43, 315–321. [https://doi.org/ 10.1007/s00535-008-2181-x](https://doi.org/10.1007/s00535-008-2181-x)

Tsuchida, T., Friedman, S.L., 2017. Mechanisms of hepatic stellate cell activation.

Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology. 14, 397-411.

<https://doi.org/10.1038/nrgastr0.2017.38>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao definirmos os aspectos prévios pertinentes a decisão pela produção deste trabalho destaco inicialmente a justificabilidade frente ao avanço da cirrose e do câncer hepático como uma das principais causas de morte em todo o mundo e em muitos países desenvolvidos a doença hepática já é uma das principais causas da morte na meia-idade (FRIEDMAN et al., 2003; GRIFFITHS et al., 2005). A colocação da hipertensão portal como a principal complicação no desenvolvimento da fibrose e sua respectiva responsabilidade pelo aparecimento de ascite e sangramento de varizes esofágicas, duas complicações caracterizadas como pior prognóstico da cirrose hepática, conseqüentemente, a perda funcional hepatocelular resulta em icterícia, distúrbios da coagulação e hipoalbuminemia reforçam o definitivo aspecto propositivo na realização de movimentos, mesmo que iniciais, para avaliar possíveis impactos no curso da doença.

O tratamento da doença hepática pode ser dividido em 5 pontos: terapia antifibrótica, terapia nutricional, tratamento específico da causa, tratamento das complicações da cirrose e transplante hepático. Como a fibrose constitui a base fisiopatogênica da cirrose hepática é necessário buscar novos medicamentos com o intuito de retardar e até reverter a fibrose hepática, aumentando a sobrevida dos pacientes e/ou reduzindo a necessidade de transplante hepático.

Nossos dados indicam que o tratamento com BZF foi capaz de induzir a reversão fenotípica de HSC, através da capacidade de induzir gordura armazenada no citoplasma celular via PPAR γ . Com o tratamento do BZF, em modelo camundongo, observou-se a diminuição dos marcadores profibróticos e inflamatórios, melhorando as características histológicas no tecido hepático. Portanto, nossa pesquisa demonstrou que o BZF é um potencial agente no tratamento da fibrose hepática e abre a possibilidade de investigar melhor o papel do mesmo no tratamento da fibrose hepática.

Invariavelmente ao concluirmos uma experiência deste tipo com todas suas características e desafios, criamos expectativas frente as prespectivas, onde entendemos como real a possibilidade da continuidade deste trabalho balisado no conhecimento difundido ao longo deste estudo e dos resultados verdadeiramente favoráveis. Ainda nesta linha, novas pretensões se criam para futuras investigações

onde sugestionamos evoluir na compreensão de outros mecanismos de ação, como por exemplo na linha da análise proteica através da técnica de western blot bem como na análise da rigidez celular através do módulo de yang, este uma variável da microscopia de força atômica.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELGHANY, A. H *et al.* The fibrolytic potentials of vitamin D and thymoquinone remedial therapies: insights from liver fibrosis established by CCl₄ in rats. **J Transl Med**, 14:281. 2016.
- ADAMSON, I. Y. R. Drug-Induced Pulmonary Fibrosis. **Environmental Health Perspectives**. (55):25-36. 1984.
- AUGUSTYNIAK, J *et al.* Mitochondrial Biogenesis and Influence Neural Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. **Mol Neurobiol**. 2018.
- BASU, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. **Toxicology**, 189(1-2):113–127. 2003.
- BENYON, R. C., ARTHUR, M. J. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. **Semin Liver Dis**, 21(3):373–384. 2001.
- BOROJEVIC, R *et al.* Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. **In Vitro Cell Dev Biol**, 21, 382-390. 1985.
- DE MESQUITA, F.C *et al.* Fructose- 1,6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell. **European journal of pharmacology**, 720, 320-325. 2013.
- DELIRE, B., STARKEL, P., LECLERCQ, I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. **Journal of clinical and translational hepatology**, 3, 53-66. 2015.
- DIEHL, A. M. Nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, 19:221-229. 1999.
- FALLOWFIELD, J., HAYES, P. Pathogenesis and treatment of hepatic fibrosis: is cirrhosis reversible? **Clin Med**, Apr;11(2):179-83. 2011. doi: 10.7861/clinmedicine.11-2-179. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5922747/>.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis:emerging therapies. **Digestive diseases**, vol. 33, no. 4:504-507. 2015.
- FRIEDMAN, S.L. Hepatic fibrosis-overview. **Toxicology**, 254: 120-129. 2008.
- FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, 134, 1655-1669. 2008.
- GALICIA-MORENO, M *et al.* N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 21, 908-914. 2009.
- GUIMARAES, E. L *et al.* Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. **Liver Int**, 27, 1255-1264. 2007.

GRINGS, M *et al.* Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. **Mol Basis of Disease**, 2135-2148. 2017.

GRIFFITHS, C *et al.* Leading causes of death in England and Wales - how should we group causes? **Health Statistics Quarterly**, 28, 6-17. 2005.

GRESSNER, A. M. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. **Cell Tissue Res**, 292, 447-452. 1998.

GRESSNER, A. M *et al.* Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci**. 1(7): 793-807. 2002.

HEINDRYCKX, F *et al.* Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int J Exp Pathol**, 90(4):367–386. 2009.

HERRMANN, J *et al.* Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function?. **J Cell Mol Med**, 11, 704-722. 2007.

HIGASHI, T *et al.* Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. **Advanced drug delivery reviews**, 121: 27-42. 2017.

IREDALE, J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair. **Pharmacol Res**, 58, 129-136. 2008.

IWASAKA, S *et al.* Bezafibrate may have a beneficial effect in pre-cirrhotic primary biliary cirrhosis. **Hepatology Research**, 16 (1): 12-18. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1386-6346\(99\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S1386-6346(99)00033-9).

JIA, D *et al.* Bezafibrate on lipids and glucose metabolism in obese diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. **Metabolism**, 53(4): 405-413. 2004.

KIM, K. Y *et al.* N-acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity. **The Journal of biological chemistry**, 276, 40591-40598. 2001.

KONG, L. J *et al.* Vatalanib, a tyrosine kinase inhibitor, decreases hepatic fibrosis and sinusoidal capillarization in CCl4-induced fibrotic mice. **Molecular medicine reports**, 15, 2604-2610. 2017.

KRIZHANOVSKY, V *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. **Cell**, 134(4):657-667. 2008.

LEE, U. E., FRIEDMAN, L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best Pract. Res Clin Gastroenterol**, 25(2): 195-206. 2011.

LI, J *et al.* Reactive oxygen species released from hypoxic hepatocytes regulates MMP-2 expression in hepatic stellate cells. **Int J Mol Sci**, 12, 2434-2447. 2011.

LIEDTKE, C *et al.* Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. **Fibrogenesis & tissue repair**, 6, 19. 2013.

LIN, Q *et al.* Rosiglitazone inhibits migration, proliferation, and phenotypic differentiation in cultured human lung fibroblasts. **Experimental Lung Research**, 36(2):120-128. 2010.

LOTERSZTAJN, S *et al.* Autophagy: a multifaceted partner in liver fibrosis. **Biomed Research**, 1-7. 2014.

MIZUNO, S *et al.* Factors predictive of the efficacy of bezafibrate therapy in patients with primary sclerosing cholangitis. **Hepatol Res**, 47 (11). 2016. Doi: <https://doi.org/10.1111/hepr.12846>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27874998/>.

OHMOTO, K *et al.* Long-term effect of bezafibrate on parameters of hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis. **J Gastroenterol**, 41(5):502-3. 2006.

PARMEGGIANI, B *et al.* Bezafibrate prevents glycine-induced increase of antioxidant enzyme activities in rat striatum. **Mol Neurobiol**, 56:29-38. 2019.

POROWSKI, D *et al.* Liver failure impairs the intrahepatic elimination of interleukin-6 tumor necrosis factor-alpha, hepatocyte growth factor, and transforming growth factor-beta. **Biomed Res Int**, 2015;2015:934065. 2015. Doi: 10.1155/2015/934065.2015:934065. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454738/>

POYNARS, T *et al.* Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (Fibro test). **BMC Gastroenterol**, 10-40. 2010.

ROCKEY, D. C. Hepatic fibrosis and cirrhosis. Pathobiology of Human Disease. **Medical University of South Carolina**, Charleston, SC, USA, 1809-1816. 2014.

ROLLA, S *et al.* The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice. **Clin Sci (Lond)**, 130:193-203. 2016.

SAMAH, M *et al.* Evaluation of the antifibrotic effect of fenofibrate and rosiglitazone on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **European Journal of Pharmacology**, 689(1-3): 186-193. 2012.

SAREM, M *et al.* Hepatic stellate cells: its role in normal and pathological conditions. **Gastroenterol Hepatol**, 29(2): 93-101. 2006.

SENOO, H. Structure and function of hepatic stellate cells. **Med Electron Microsc**, 37(1): 3-15. 2004.

SERTORIO, M *et al.* IL-22 and IL-22 binding protein (IL-22BP) regulate fibrosis and cirrhosis in hepatic C virus and schistosome infections. **Hepatology**, 61:1321-1331. 2015.

SHAH, S *et al.* Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. **AIDS**, 2015; 17;29: 1325-1333. 2015. doi:10.1097/QAD.0000000000000654. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478137/>.

SHI, Z *et al.* Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. **Proc Natl Acad Sci**, 94(20):10663–10668. 1997.

SHIPMAN, K. E *et al.* Use of fibrates in the metabolic syndrome: A review. **World Diabetes**. 7(5): 74-88. 2016.

SMITH, G. P. **Animal models for the study of human disease**. Elsevier; China: 2013.

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

SZIKSZ, E *et al.* Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine Family. **Mediat Inflamm**, 2015:764641. 2015.

TANAKA, T *et al.* Transgenic expression of mutant peroxisome proliferator-activated receptor gamma in liver precipitates fasting-induced steatosis but protects against high-fat diet-induced steatosis in mice. **Metabolism**, 54(11):1490-1498. 2005.

THRALL, K. D *et al.* Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. **J Toxicol Environ Health A**, 60(8):531–548. 2000.

TSAI, J.H *et al.* Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of viral hepatitis**, 15, 508-514. 2008.

VICENTE, C *et al.* Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. **Mol Cell Biochem**, 187(1-2): 11-21.1998.

WANG, P *et al.* Expression of extracellular matrix genes in cultured hepatic oval cells: an origin of hepatic stellate cells through transforming growth factor beta? **Liver Int**, 29(4):575–584. 2009.

WALKIN, L *et al.* The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. **Fibrogenesis Tissue Repair**, 6(1):18. 2013.

WEBER, L. W *et al.* Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Crit Rev Toxicol**, 33(2):105–136. 2003.

WEISKIRCHEN, R; WEISKIRCHEN, S; TACKE, F. Recent advantages in understanding liver fibrosis: bridging basic Science and individualized treatment concepts. **F1000Res**, v.7. 2018. doi:10.12688/f1000research.14841.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024236/>.

WILLSON, T. M *et al.* The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **Journal Med chem**, 43: 527-550. 2000.

WINAU, F *et al.* Starring stellate cells in liver immunology. **Curr Opin Immunol**, 20(1): 68-74. 2008.

ZEISBERG, M *et al.* Fibroblasts derived from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. **J Biol Chem**, 282(32):23337–23347. 2007.

ZHAO, Y *et al.* Bezafibrate induces myotoxicity in human rhabdomyosarcoma cells via peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling. **Toxicol In Vitro**. Feb;24(1):154-9. 2010. doi:10.1016/j.tiv.2009.08.001.

APÊNDICE A – AUTORIZAÇÃO CEUA

Prezado(a) Coordenador(a) de Projeto de Pesquisa,

A CEUA considerou que o projeto **10158 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BEZAFIBRATO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROSE HEPÁTICA** atende aos requisitos por ela definidos.

Desta forma, o projeto já pode ser iniciado.

Atenciosamente,

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8318

Porto Alegre, 27 de março de 2018

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS FENÓLICOS COMO CANDIDATOS PARA O TRATAMENTO DE FIBROSE HEPÁTICA" coordenado por JARBAS RODRIGUES DE OLIVEIRA.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 27/03/2018 - 27/03/2021

Nº de Animais	Espécie
540	Mus musculus
Total de Animais: 540	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br