



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IZABELA RANGEL LIMA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Indigofera suffruticosa* EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA: avaliação histomorfométrica e
bioquímica**

Recife
2018

IZABELA RANGEL LIMA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Indigofera suffruticosa* EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA: avaliação histomorfométrica e
bioquímica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos

Orientadora: Prof^ª Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia Depto. de Fisiologia e Farmacologia/CCB/UFPE

Co-Orientadora: Prof^ª Dra. Sônia Pereira Leite
Depto. de Histologia e Embriologia/CCB/UFPE

Recife
2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L732e

Lima, Izabela Rangel.

Efeito do extrato etanólico das folhas de *Indigofera suffruticosa* em modelo experimental de lesão hepática: avaliação histomorfométrica e bioquímica / Izabela Rangel Lima. – 2018.

94 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Fígado. 2. Indigofera. 3. Fabaceae. 4. Paracetamol. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (Orientadora). II. Título.

615.704

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-020)

IZABELA RANGEL LIMA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Indigofera suffruticosa* EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA: avaliação histomorfométrica e
bioquímica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em: 06/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Bernardete Sousa Maia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André Martins Galvão (Examinador externo)
Centro Universitário Maurício de Nassau

Profa. Dra. Roberta Maria Pereira Leite de Lima (Examinador externo)
Centro Universitário Maurício de Nassau

Profa. Dra. Juliana Barros Maranhão (Examinador externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe e minha avó (in memoriam), ao meu esposo Mardonny, e ao meu filho João Lucas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e por estar presente em todos os momentos fazendo com que eu seguisse em frente.

À minha mãe e minha avó (*in memoriam*) por todo amor e carinho e pela grande contribuição na minha formação pessoal.

Ao meu pequeno João Lucas Rangel Chagas que é o meu maior presente. Por cada sorriso e alegrias que me proporciona.

Ao meu esposo Mardonny, por ser meu porto seguro e me dar suporte ao longo desta caminhada. Por me ensinar a viver a vida de forma mais leve e a encarar as dificuldades.

À minha orientadora Prof. Dr^a Maria Bernadete de Sousa Maia pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por me receber em seu laboratório, pela paciência e disponibilidade em esclarecer todas minhas dúvidas.

À minha orientadora Professora Dr^a Sônia Pereira Leite não tenho palavras suficientes para agradecer. Me recebeu em seu laboratório no início da graduação, acreditando no meu potencial e desde então me vem orientando não só academicamente, mas pra vida. Obrigada pelo acolhimento, pelas palavras de apoio, pelos momentos incríveis de descontração, pelos conselhos, pela paciência e pela confiança. Deus não poderia ter preparado melhor encontro!

A Prof. Dr^a Ivone Antônia de Souza pela imensa contribuição para realização do trabalho científico. A sua ajuda foi fundamental!

Ao Prof. Dr^o e colega Jeymesson Raphael Cardoso Vieira pela amizade, carinho e inúmeras risadas proporcionadas.

Às Profs integrantes da Banca examinadora, Roberta Maria Pereira Lima e Juliana Barros Maranhão pelas sugestões pertinentes a tese de doutorado com o objetivo de valorizar o trabalho.

Ao Prof. Dr André Martins Galvão, pela orientação, dedicação e contribuição neste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos acadêmicos.

À técnica do laboratório de Histotecnica do departamento de Histologia e Embriologia CB-UFPE Maria de Fátima do Nascimento e Sandrine Maria de Arruda Lima pelo auxílio na elaboração das lâminas histológicas e a todos os funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia pelos momentos de descontração e conversas ao longo desses anos.

A doutoranda Ivanise Brito da Silva pela amizade e carinho. Obrigada por sua alegria contagiante, por estar sempre disposta a me ajudar e pelo companheirismo em todas as horas.

Ao Doutorando Marllon Alex Nascimento Santana e a Mestranda Tainá Maria Santos da Silva pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e momentos de descontração no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas CCS-UFPE pela oportunidade de realizar este trabalho.

A CAPES e a UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO pelo auxílio financeiro no doutorado.

A todos aqueles não mencionados que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“As pessoas não escolhem seus futuros; elas escolhem seus hábitos, e seus hábitos determinam seus futuros” (F. M. Alexander, 1945).

RESUMO

Indigofera suffruticosa é uma planta da família Fabaceae, utilizada na medicina popular como antiespasmódico e estomáquico. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades hepatoprotetora e hepatocurativa do extrato etanólico das folhas de *I. suffruticosa* (EFIS) em modelo experimental de lesão hepática. Foram utilizados 35 camundongos albinos Swiss (n = 5 animais/grupo): i) sadios; ii) com lesão hepática induzida por paracetamol (PCM) e tratados com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); iii) com lesão hepática induzida por PCM e tratados com silimarina (25 mg/kg; v.o.); iv) pré-tratados com EFIS (50mg/kg; v.o) antes da indução da lesão hepática induzida por PCM; v) pré-tratados com EFIS (100mg/kg; v.o) antes da indução da lesão hepática induzida por PCM; vi) tratados com EFIS (50mg/kg; v.o) após a indução da lesão hepática induzida por PCM e vii) tratados com EFIS (100mg/kg; v.o) após a indução da lesão hepática induzida por PCM. Para a indução da hepatotoxicidade foi utilizado o modelo experimental de overdose de PCM (300 mg/kg; v.o.). A hepatotoxicidade foi avaliada através de ensaios bioquímicos (determinação dos níveis séricos das enzimas, AST, ALT e ALP e da quantificação das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e concentração de grupos Tióis no tecido hepático e análises histomorfométricas do tecido hepático dos animais. A atividade antioxidante do EFIS (62,5 - 1000 µg/mL) também foi avaliada pelo método de varredura dos radicais livres (DPPH). Os resultados mostraram que a administração do EFIS pré-tratamento ou pós-tratamento reduziu significativamente ($p < 0,001$) os níveis séricos de AST, ALT e ALP quando comparados ao grupo com lesão hepática. Em relação as enzimas antioxidantes, a atividade da SOD e da CAT foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) no grupo com lesão hepática em relação ao grupo sadio. No grupo submetido ao pós-tratamento com EFIS (100 mg/kg; v.o.), a recuperação da atividade da SOD e CAT foi de forma dose-dependente e semelhante àquela observada no grupo tratado com silimarina. A concentração de grupos tióis também foi significantemente aumentada ($p < 0,001$), de forma dose-dependente, nos animais submetidos ao pré ou pós-tratamento com EFIS. Os resultados referentes às análises histopatológicas, no tecido hepático dos animais sadios mostra uma arquitetura tecidual normal; enquanto que o tecido hepático dos animais com lesão hepática apresentou visíveis alterações nessas estruturas. Em contrapartida, os grupos submetidos ao tratamento com silimarina ou àqueles pré ou pós-tratados com EFIS apresentaram melhora na histoarquitetura do tecido hepático. Em relação à análise histomorfométrica, as áreas e perímetros dos núcleos dos hepatócitos e diâmetros dos sinusoides hepáticos tratados com EFIS mostraram-se semelhantes aos do grupo tratado com silimarina. Adicionalmente, através

do método de captura do radical livre DPPH, o EFIS apresentou uma atividade antioxidante concentração-dependente, apresentando-se como um bom limpador de radicais livres na concentração de 1000 µg/ mL (71,84%). Finalmente, conclui-se que o pré-tratamento ou pós-tratamento com EFIS: 1) promove redução nos níveis séricos de importantes biomarcadores de dano hepático (AST, ALT e ALP); 2) restaura a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e dos grupos tióis, e 3) atenua sensivelmente o dano no tecido hepático induzido pelo PCM.

Palavras-chave: Fígado. Indigofera. Fabaceae. Paracetamol.

ABSTRACT

Indigofera suffruticosa is a plant of the family Fabaceae, used in the popular medicine like antispasmodic and estomáquico. The objective of this study was to evaluate the hepatoprotective and hepatocurative activities of the ethanol extract of the leaves of *I. suffruticosa* (EFIS) in an experimental model of liver injury. 35 Swiss albino mice (n = 5 animals / group) were used: i) healthy; ii) with paracetamol-induced hepatic injury (PCM) and treated with 0.9% saline (10 ml / kg, v.o.); iii) with PCM-induced hepatic injury and treated with silymarin (25 mg / kg, v.o.); iv) pre-treated with EFIS (50mg / kg; v.o) prior to induction of PCM-induced liver injury; v) pre-treated with EFIS (100mg / kg; v.o) prior to induction of PCM-induced liver injury; vi) treated with EFIS (50 mg / kg; v.o) after induction of PCM-induced liver injury and vii) treated with EFIS (100 mg / kg; v.o) after induction of PCM-induced liver injury. For the induction of hepatotoxicity, the experimental model of PCM overdose (300 mg / kg, v.o.) was used. Hepatotoxicity was assessed through biochemical assays (determination of serum levels of the enzymes, AST, ALT and ALP and quantification of antioxidant enzymes, SOD, CAT and concentration of Thiol groups in the hepatic tissue and histomorphometric analysis of the hepatic tissue of the animals. (62.5 - 1000 µg / mL) was also evaluated by the free radical scanning method (DPPH). The results showed that administration of pre-treatment or post-treatment EFIS significantly reduced ($P < 0.001$) ($p < 0.05$) in the group with liver injury compared to the healthy group. In relation to the antioxidant enzymes, the activity of SOD and CAT was significantly reduced ($p < 0.05$) in the group with liver injury. In the post-treatment group with EFIS (100 mg / kg; v0), the recovery of SOD and CAT activity was dose-dependent and similar to that seen in the treated group. The concentration of thiol groups was also significantly increased ($p < 0.001$) in a dose-dependent manner in animals submitted to pre-treatment or post-treatment with EFIS. The results concerning histopathological analyzes in the hepatic tissue of healthy animals show a normal tissue architecture; while hepatic tissue of animals with liver injury showed visible changes in these structures. In contrast, the groups submitted to silymarin treatment or to those pre- or post-treated with EFIS presented improvement in histoarquitetura of the hepatic tissue. Regarding histomoformetric analysis, the areas and perimeters of hepatocyte nuclei and diameters of hepatic sinusoids treated with EFIS were similar to those in the silymarin treated group. In addition, EFIS showed a concentration-dependent antioxidant activity through the DPPH free radical capture method, presenting as a good free radical scavenger at a concentration of 1000 µg / mL (71.84%). Finally, it is concluded that pre-treatment or post-

treatment with EFIS: 1) promotes reduction in serum levels of important biomarkers of liver damage (AST, ALT and ALP); 2) restores the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT and the thiol groups, and 3) attenuates the damage in liver tissue induced by PCM.

Keywords: Liver. Indigofera. Fabaceae. Acetaminophen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo de xenobióticos. Reações da fase 1 são catalizadas pelo citocromo P450 (CYP450). Reações da fase 2 são catalizadas por várias enzimas formando conjugados hidrossolúveis.....	25
Figura 2 -	Cascata de eventos que ocorre no fígado após administração de uma dose tóxica de paracetamol	28
Figura 3 -	Mecanismos celulares de geração de oxidantes e sistema antioxidante	31
Figura 4 -	Desenho experimental da distribuição dos grupos para o estudo do efeito do tratamento com EFIS (pré lesão hepática).....	37
Figura 5 -	Desenho experimental da distribuição dos grupos para o estudo do efeito do tratamento com EFIS (pós lesão hepática).....	38
Figura 6 -	Níveis séricos de amino transferase (ALT), alanina amino transferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) de camundongos albinos Swiss com lesão hepática induzida por paracetamol e pré-tratados ou pós-tratados com EFIS.	45
Figura 7 -	Efeito do pré ou pós tratamentos com EFIS sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e concentração de grupos Tiois em camundongos albinos Swiss com lesão hepática induzida por paracetamol.....	47
Figura 8 -	Fotomicrografias do tecido hepático de camundongos albinos Swiss tratados com EFIS antes ou após a indução de lesão hepática induzida por paracetamol.....	51
Figura 9 -	Histomorfometria da área e perímetro dos núcleos dos hepatócitos de camundongos albinos Swiss tratados com EFIS antes ou após a indução de lesão hepática induzida por paracetamol.....	52
Figura 10 -	Histomorfometria dos diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos de camundongos albinos Swiss tratados com EFIS antes ou após a indução de lesão hepática induzida por paracetamol.....	54
Figura 11 -	Percentual da atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>I. suffruticosa</i> em diferentes concentrações.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
ALP	fosfatase alcalina
ALT	aspartato amino transferase
ANOVA	análise de variância
AST	alanina amino transferase
BSA	albumina sérica bovina
CAT	catalase
CCD	cromatografia em camada delgada
EFIS	extrato etanólico de folhas de <i>Indigofera suffruticosa</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HE	hematoxilina eosina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão fosfato-alcalino
PCM	paracetamol
SOD	superóxido dismutase
V.O.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	21
3.2	Anatomia e Histologia do fígado	22
3.3	Metabolismo de xenobióticos no fígado.....	23
3.4	Hepatotoxicidade medicamentosa.....	25
3.5	Modelos animais para indução de lesão hepática aguda	26
3.6	Enzimas indicadoras de danos hepáticos	28
3.7	Estresse oxidativo e sistemas antioxidante.....	30
3.8	Silimarina e as plantas hepáticas no Brasil.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Material botânico	34
4.2	Preparação do extrato etanólico de folhas de <i>I.suffruticosa</i> (EFIS)	34
4.3	Animais experimentais.....	35
4.4	Delineamento experimental	35
4.4.1	Grupos experimentais.....	35
4.4.2	Procedimento experimental.....	36
4.4.2.1	<i>Indução da lesão hepática e modelo experimento de hepatotoxicidade induzida por overdose de paracetamol</i>	<i>36</i>
4.5	Coleta de sangue dos animais	38
4.5.1	Determinação do efeito do EFIS sobre os níveis séricos das enzimas AST, ALT e ALP	39
4.5.1.1	<i>Alanina aminotransferase (ALT).....</i>	<i>39</i>
4.5.1.2	<i>Aspartato transaminase (AST)</i>	<i>39</i>
4.6	Obtenção das amostras de tecido hepático	40
4.7	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT	40
4.7.1	Atividade da catalase (CAT)	40
4.7.2	Atividade da superóxido dismutase (SOD)	41

4.8	Concentração de tióis	41
4.9	Estudo Histopatológico e Histomorfométrico do tecido hepático de camundongos submetidos ao pré- tratamento e pós-tratamento com EFIS.	42
4.10	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do EFIS pelo método radical livre DPPH	42
4.11	Análises estatísticas	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO) e fosfatase alcalina (ALP) em camundongos calbinos swiss tratados com EFIS antes após (pós-tratamento) a lesão hepática induzida por overdose de paracetamol	44
5.2	Efeitos da administração do EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.) em regime preventivo (pré-tratamento) ou curativo (pós-tratamento), sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e de grupos tióis de camundongos Swiss com lesão hepática induzida por paracetamol	46
5.3	Efeito do EFIS antes ou após a indução de lesão hepática por paracetamol sobre tecido hepático de camundongos albinos Swiss	49
5.3.1	Estudo Histopatológico do tecido hepático de camundongos de camundongos albinos Swiss	49
5.4	Análise histomorfométrica do tecido hepático de camundongos albinos Swiss pré- tratados ou pós-tratados com EFIS em modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol	51
5.4.1	Área e perímetro dos núcleos dos hepatócitos	51
5.4.2	Diâmetro dos sinusóides hepáticos.....	53
5.5	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do EFIS pelo método de varredura do radical livre DPPH	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICES	77
	APÊNDICE A: Artigo: Hepatoprotective efficacy of methanolic extract of <i>Indigofera suffruticosa</i> (Mill) on paracetamol–induced liver damage in mice...	77

1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão de grande importância que desempenha um papel essencial na manutenção do equilíbrio biológico dos vertebrados. Desempenha muitas funções vitais, como metabolismo de produtos químicos (xenobióticos) ao qual o órgão é exposto direta ou indiretamente; metabolismo dos lipídeos, dos carboidratos e das proteínas; além da coagulação sanguínea e imunomodulação (RAJESH & LATHA, 2004).

As hepatopatias representam um importante problema na saúde mundial e entre as que mais comprometem as funções hepáticas estão às hepatites, a cirrose e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). (LUO et al., 2015; PASTORI et al., 2015).

Medicamentos empregados na clínica médica podem provocar como reação colateral indesejável, a agressão ao fígado, limitando seu uso e os benefícios esperados, entre eles estão a carbamazepina (anticonvulsivante), captopril (anti-hipertensivo), diclofenaco, nimesulida, ibuprofeno (antiinflamatório), azitromicina, amoxicilina (antimicrobianos) (GU e MANAUTOU, 2012; TAJIRI K, SHIMIZU Y, 2008). Portanto, a hepatotoxicidade medicamentosa tem recebido grande atenção nos últimos anos (PASTORI et al., 2015).

O paracetamol, derivado do paminofenol, é o metabolito ativo da fenacetina, responsável pelo efeito analgésico do composto (JUNIOR, DUTRA e FRITZEN, 2013). Têm sido amplamente utilizado como modelo experimental de intoxicação para avaliar hepatoproteção de drogas e compostos vegetais. Normalmente, ele é seguro quando consumido nas doses prescritas (1-4 g por dia). Em adultos, doses únicas de mais de 10 a 15 g levam a lesão hepática severa ou fatal, secundária à necrose hepática massiva (LARSON, 2005).

Para o tratamento de desordens hepáticas as investigações etnobotânicas têm se mostrado promissoras como estratégia para a seleção de plantas medicinais para a busca de novos fármacos com atividade hepatoprotetora (ALBUQUERQUE, 2007).

A silimarina (SM) é uma mistura de flavonóides, extraída da planta *Silybum marianum*. Silybin foi descoberto como o primeiro membro de uma nova família de compostos naturais chamados flavonolignans em 1959 e é conhecido como o ingrediente ativo predominante e primário em SM (HACKETT et al., 2013). Em particular, a SM tem sido o fármaco padrão-ouro para tratar distúrbios hepáticos de diferentes etiologias e seus extratos têm sido usados como remédios fitoterápicos tradicionais (“tônicos hepáticos”) há quase 2000 anos. Portanto, a SM é mais conhecida por seus efeitos antioxidantes e quimioprotetores no fígado e é frequentemente prescrita e auto-prescrita como um medicamento hepatoprotetor complementar e alternativo (BIEDERMAMM et al., 2014).

No Brasil, plantas medicinais vêm sendo avaliadas quanto a seus efeitos hepatoprotetores e antioxidantes (GAMBERINI et al., 1991; GONZÁLEZ et al., 1993; PANIZZA et al., 1998; SILVA et al., 2014). Entretanto, a quantidade de medicamentos que são utilizados no tratamento de doenças hepáticas e que apresentam resultados expressivos em seres humanos ainda é pequena (MURIEL; RIVERA-ESPINOZA, 2008). Assim, as plantas medicinais utilizadas para o tratamento de distúrbios hepáticos que apresentam atividade hepatoprotetora ou curativa tornam-se alvos importantes de estudos que buscam elucidar seu mecanismo de ação, bem como caracterizar compostos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos hepatoprotetores (GAMBERINI et al., 1991; ALBUQUERQUE, 2007).

Indigofera suffruticosa Mill conhecida popularmente como anil do campo ou anileira é uma planta da família Fabaceae originária da Índia, comum em toda a região tropical e subtropical, é uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. (FERNANDES, 1987). No Brasil, a *I.suffruticosa* encontrada praticamente em todo país, é uma forrageira anual ou perene adaptada à região do Sertão Pernambucano (FERNANDES, 1987).

Estudos farmacológicos, utilizando a fração alcalóide de *Indigofera suffruticosa*, sugeriram que esta planta apresenta possível atividade hepatoprotetora devido a preservação da arquitetura do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180 (LIMA et al., 2014).

Em função dos estudos de hepatotoxicidade medicamentosa, com resultados relevantes ainda serem escassos, o presente estudo avaliou a atividade hepatoprotetora e antioxidante do EFIS através da determinação de marcadores da função hepática (alanina aminotransferase, aspartatoaminotransferase, fosfatase alcalina e níveis das enzimas superóxido dismutase e catalase), como também avaliou a histopatologia e histomorfometria o tecido hepático submetido ao pré e pós -tratamento com extrato etanólico de *I.suffruticosa* (EFIS) antes e após exposição ao paracetamol, agente lesivo ao tecido hepático.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill (EFIS) na prevenção e no tratamento de lesão hepática induzida por paracetamol em camundongos Swiss.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito hepatoprotetor do EFIS (tratamento antes da indução da lesão hepática) contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos através da determinação dos níveis séricos de diferentes marcadores relacionados à integridade hepática (alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO) e fosfatase alcalina (ALP));
- Determinar os níveis das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático dos animais submetidos ao tratamento EFIS antes da indução da lesão hepática e a concentração dos grupos Tióis;
- Analisar a Histopatologia e histomorfometria do tecido hepático dos animais submetidos ao tratamento EFIS antes da indução da lesão hepática;
- Avaliar o efeito curativo do EFIS (tratamento iniciado após a indução da lesão hepática) contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos através dos níveis séricos de diferentes marcadores relacionados à integridade hepática (ALT, AST e ALP);

- Determinar os níveis das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático dos animais submetidos ao tratamento com EFIS iniciado após a indução da lesão hepática e a concentração dos grupos Tióis;
- Analisar a Histopatologia e histomorfometria do tecido hepático dos animais submetidos ao tratamento com EFIS iniciado após a indução da lesão hepática;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EFIS através do método DPPH.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Indigofera suffruticosa* Mill

A espécie *Indigofera suffruticosa* Mill é uma planta da Antilha e América Central e encontra-se distribuída por toda América tropical. No Brasil há registro da espécie nos estados do Mato Grosso (FERNANDES, 1987), Alagoas (RIBEIRO et al., 1984), Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Pará e Pernambuco (RIET-COREA, 2000).

Conhecida popularmente como “anil do campo” ou “anileira”, *Indigofera suffruticosa* é utilizada na cultura tradicional no tratamento de diversos problemas de saúde (HASTINGS, 1990). Os órgãos vegetativos de *I. suffruticosa* apresentam valor medicinal como antiespasmódico, sedativo, estomáquico e antídoto contra o mercúrio e o arsênio (MARTINS et al., 2000). A investigação fitoquímica de extratos de folhas de *I. suffruticosa* revelou a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, proteínas, tri terpenos carboidrato e índigo cumarina (LEITE et al., 2006). Estudos farmacológicos mostraram que extrato de folhas de *I. suffruticosa* apresentam atividades: antiinflamatória (LEITE et al., 2003), embriotóxica (LEITE et al., 2004), antimicrobiana (LEITE et al., 2006) e terapia alternativa anticâncer e antitumoral. (VIEIRA et al., 2007). Foi demonstrado que o extrato de folhas de *I. suffruticosa* inibem o desenvolvimento da eclosão dos ovos, a ecdise das larvas e o efeito deterrente na ovoposição de mosquitos de *Aedes aegypti*. (VIEIRA et al., 2011). Camundongos portadores de sarcoma 180 apresentou uma resposta hepática após o tratamento sub-crônico com extrato de *I. suffruticosa*. (SILVA et al., 2014). O estudo fitoquímico de três (3) frações alcaloides bis-indolice; indican, índigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa* foram identificadas, isoladas e purificadas por Vieira et al (2011).

Estudos, mais recente tem demonstrado que fração alcaloide bis-indólica indican e extrato de folha da espécie em questão é detentora da preservação da arquitetura do tecido epitelial do fígado. Segundo Oliveira, et al (2016) a fração alcalóide bis-indólica Indican de folhas de *I. suffruticosa* se apresentou como um agente protetor fitoterápico do fígado e apresentou baixa ordem de toxicidade com viabilidade de 98% das larvas. Foi relatado preservação da organização estrutural dos túbulos renais e núcleos de hepatócito de camundongos após tratamento com *I. suffruticosa*. (SILVA et al., 2014). Devido as propriedade anti-inflamatória, anticâncer e antitumoral, agente protetor fitoterápico do fígado e baixo nível de toxicidade, previamente relatados, nossa hipótese é que a planta pode ser utilizada como agente hepatoprotetor.

3.2 Anatomia e Histologia do Fígado

O fígado é o maior órgão sólido do corpo, constituído aproximadamente de 2% a 5% do peso do corpo de um homem adulto. Pode exercer até 100 funções diferentes, a maioria das quais é exercida pelos hepatócitos. Sua anatomia clássica distingue dois lobos principais, direito e esquerdo, e dois acessórios, quadrado e caudado. (MINCIS, 2010). É constituído principalmente por células hepáticas. O hepatócito é a célula mais multifuncional do organismo, de forma poliédrica com 6 ou mais faces e medem de 20 a 30 µm de diâmetro. Esta célula apresenta um núcleo central, arredondado, com um ou dois nucléolos bem evidentes. Os retículos endoplasmáticos são bem evidentes. Possui funções glandulares endócrinas e exócrinas e, além de sintetizar e acumular vários compostos, neutraliza outros e transporta corantes do sangue para a bile. Após as refeições, os hepatócitos convertem o excesso de glicose em glicogênio. Eles desempenham inúmeras funções metabólicas úteis, como a utilização de lipídios para a síntese de lipoproteínas, a degradação de hormônios esteróides e a destoxificação de medicamentos e toxinas. Essas células epiteliais se agrupam

em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas, os lóbulos hepáticos. Cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático de mais ou menos 0,7 por 2 mm de tamanho. As regiões nos cantos dos poliedros são denominadas espaços porta, compostos por 1 vênula, 1 arteríola, 1 ducto biliar e vasos linfáticos. Nos lóbulos os hepatócitos se dispõem em cordões orientados radialmente. Os cordões são constituídos por células dispostas em uma só camada que são perfuradas e, frequentemente, anastomosam-se, resultando num labirinto complexo, que dá ao lóbulo hepático um aspecto esponjoso (CORMACK, 2003).

O espaço que fica entre os cordões de células hepáticas são os chamados sinusóides, capilares hepáticos de paredes revestidas por células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos. O capilar sinusóide apresenta-se envolto por um delicado arcabouço de fibras reticulares e neles desembocam ramos capilares terminais da artéria hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. Os capilares sinusóides desembocam na veia centrolobular, no centro do lóbulo e medem entre 10 e 30 μm de diâmetro. Seu endotélio é fenestrado e se assenta sobre uma membrana basal descontínua. Além disso, a junção entre as células endoteliais contíguas é incompleta e há separações de 0,1 a 0,5 μm .

3.3 O metabolismo de xenobióticos no fígado

O fígado é responsável pelas funções metabólicas, excretórias e secretórias. Portanto este órgão desempenha papel homeostático fundamental no equilíbrio de numerosos processos biológicos (NEMETH et al., 2004).

Muitos medicamentos empregados rotineiramente na clínica médica podem provocar como reação colateral indesejável, a agressão ao fígado, limitando seu uso e os benefícios esperados (GU e MANAUTOU, 2012). A depuração hepática depende da eficácia

das enzimas metabolizadoras, do fluxo sanguíneo hepático, da ligação às proteínas plasmáticas e da “depuração intrínseca” dessa substância. Esta última propriedade depende do grau de lipossolubilidade e do peso molecular da substância. O objetivo da metabolização hepática é tornar o fármaco mais hidrossolúvel, para a excreção renal ou biliar (MATOS & MARTINS, 2005).

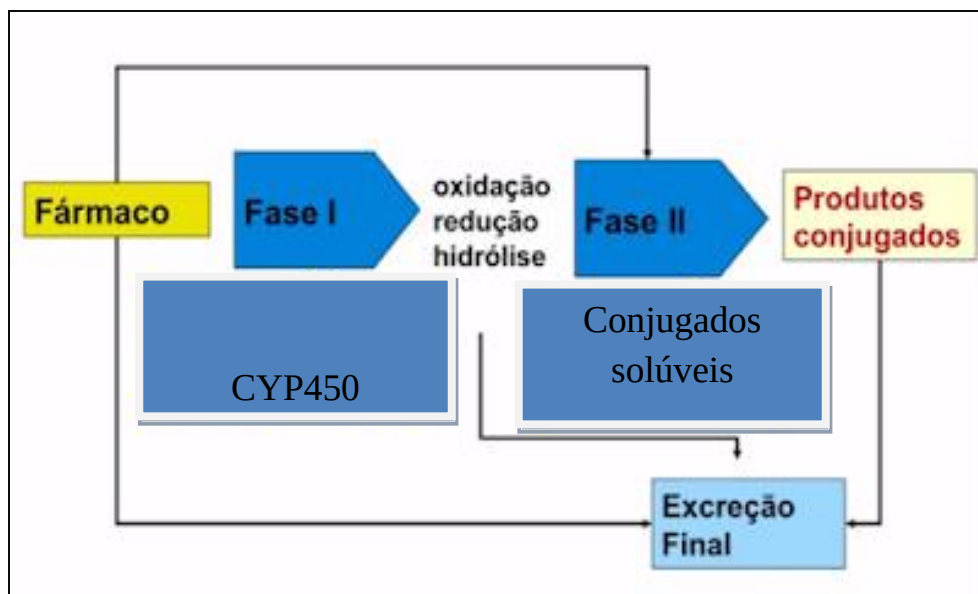
Um dos principais fatores que afetam o perfil terapêutico e toxicológico de fármacos, levando não apenas a sua detoxicação e excreção, mas também a sua bioativação, é a biotransformação (MATOS & MARTINS, 2005).

As reações de biotransformação são divididas em dois tipos: 1) Reações de Fase I, na qual os fármacos e xenobióticos são metabolizados por diversos sistemas enzimáticos, através de reações de oxidação, redução ou hidrólise que irão converter o fármaco em um metabólito mais polar. Essas reações são catalisadas pelo sistema do citocromo P450, uma família de hemoproteínas ligadas à membrana, localizadas no retículo endoplasmático liso de hepatócitos centrolobulares. 2) Reações de Fase II, na qual os metabólitos da fase I sofrem reações de conjugação, sendo adicionados ao metabólito pequenas moléculas endógenas de alta polaridade, formando conjugados hidrossolúveis que serão por fim excretados (LARSON, 2005). Se essas moléculas não forem metabolizadas pelas enzimas de fase 2, elas podem causar danos a proteínas, ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e ao ácido ribonucléico (RNA) (Figura 1)

As reações de biotransformação geralmente seguem o processo de detoxificação, resultando em metabólitos inativos (WILLIAMS et al, 2002). No entanto, muitos intermediários das drogas gerados durante o metabolismo são altamente reativos e tóxicos, podendo causar hepatotoxicidade (PARK et al., 2005). Vários fatores podem influenciar a resposta das células a um insulto tóxico, e a extensão do dano resulta da intervenção de fatores celulares intrínsecos e extrínsecos (PESSAYRE; LARREY, 1988).

Basicamente, é o equilíbrio entre a bioativação, detoxificação e os mecanismos de defesa/reparo que determina se um composto irá provocar um efeito tóxico ou não (WILLIAMS et al., 2002).

Figura 1. Metabolismo de xenobióticos. Reações da fase 1 catalizadas pelo citocromo P450 (CYP450). Reações da fase 2 catalizadas por várias enzimas formando conjugados hidrossolúveis. (Adaptado de Larson, 2005).



3.4 Hepatotoxicidade medicamentosa

As hepatopatias compreendem um grupo de doenças que atingem o fígado de forma primária ou secundária, com evolução aguda ou crônica (PASTORI et al., 2015).

A hepatotoxicidade medicamentosa tem recebido grande atenção nos últimos anos e ocorre devido ao uso indiscriminado de medicamentos, principalmente aqueles com status de venda livre (WILLIAMS et al., 2002). Os medicamentos de venda livre são conhecidos também como Medicamentos Isentos de Prescrição (MIPs). Estes são os medicamentos de primeira escolha da população para os problemas de saúde, como por exemplo o paracetamol,

o qual possui potencial hepatotóxico quando excede sua dose terapêutica (PINTO et al., 2015).

3.5 Modelos animais para indução de lesão hepática aguda

Existem diversos modelos experimentais de intoxicação hepática. Grande parte deles utiliza substâncias químicas hepatotóxicas como o tetracloreto de carbono (CCl_4), paracetamol (PCM) e a tioacetamida (TAA) (NEWSOME et al., 2000). O uso destas substâncias apresenta, de maneira geral, maior variabilidade de resposta em relação aos modelos cirúrgicos, porém parece refletir melhor os achados clínicos (BELANGER; BUTTERWOTH, 2005).

O modelo que utiliza o CCl_4 como agente hepatotóxico, consiste num método experimental muito utilizado para se estudar o efeito hepatoprotetor de produtos naturais e de drogas (RECKNAGEL et al., 1989). Esse método se baseia nos efeitos dos intermediários altamente reativos e tóxicos que são produzidos durante seu metabolismo hepático (MADDREY, 2005). Os radicais livres formados, por serem extremamente reativos e instáveis, participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (LEMOS, 2006).

A intoxicação hepática pela TAA é um modelo experimental satisfatório capaz de causar dano hepático grave após administração aguda e cirrose após administração crônica, originando severas alterações na permeabilidade celular, e inibindo a atividade mitocondrial, levando à morte celular (DAVID et al., 2002). Quando a membrana plasmática da célula hepática é danificada, uma variedade de enzimas normalmente localizadas no citosol é liberada na corrente circulatória e a estimativa da concentração destas enzimas no soro torna-se um útil marcador quantitativo para avaliar o dano hepatocelular (TÚNEZ et al., 2005).

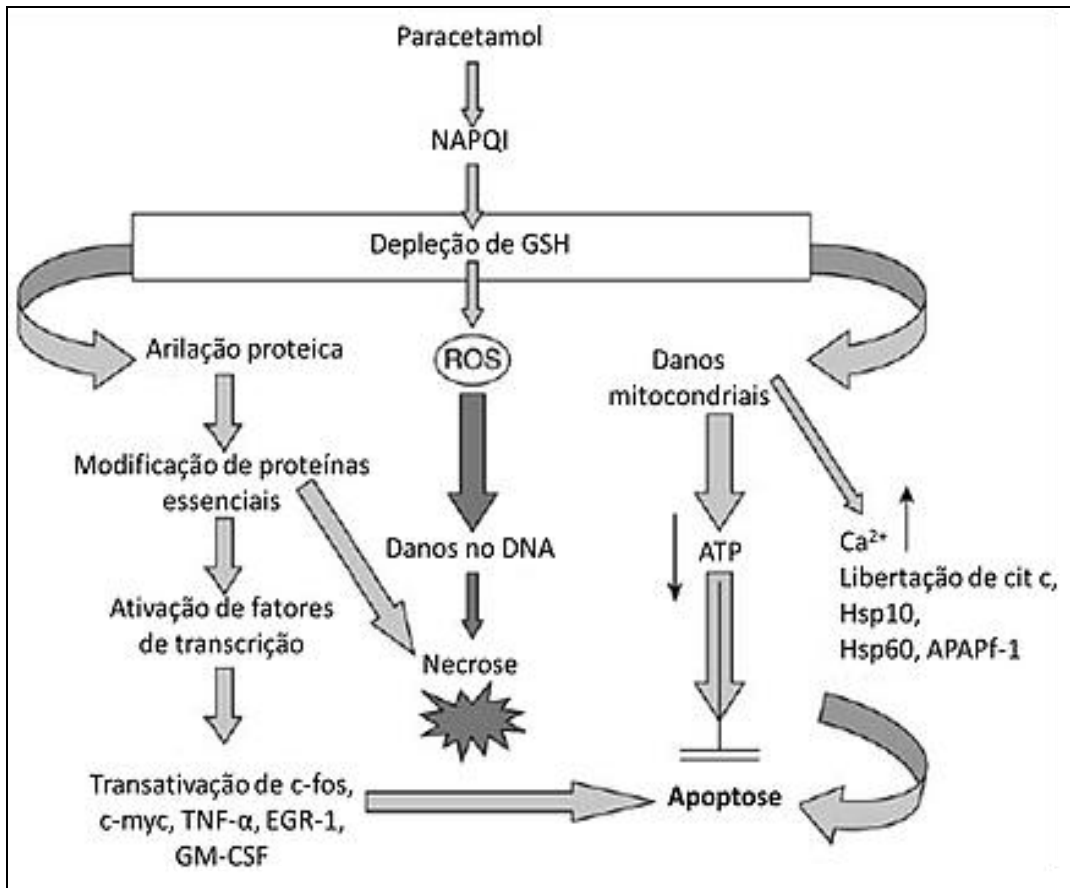
O **paracetamol (PCM)**, também conhecido como Acetaminofem®, derivado do paminofenol, é o metabolito ativo da fenacetina, responsável pelo efeito analgésico do composto (JUNIOR, DUTRA e FRITZEN, 2013). Esse composto pertence à classe dos analgésicos e antipiréticos, tendo uma ação analgésica e alta ação antipirética. (LOPES e MATHEUS, 2012). Tem o mecanismo de ação que inibe a ciclo-oxigenase 2 (COX – 2), e possui menos efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal (LOPES e MATHEUS, 2012). É indicado para alívio de dores leve à moderada, como cefaleia e mialgia (KATZUNG, 2010). O paracetamol é administrado por via oral, podendo ser encontrado em formulação sólida como as capsulas, drágeas, pastilhas e comprimidos também em formulação líquida como em gotas e xarope (LOPES e MATHEUS, 2012). Esse fácil acesso ao paracetamol e o desconhecimento da população sobre seus efeitos nocivos ao organismo têm aumentado significativamente o número de intoxicações por esse fármaco podendo causar a princípio sintomas como náuseas, vômitos, sudorese intensa e icterícia (KATZUNG, 2010).

O uso prolongado de paracetamol pode acometer o fígado com insuficiência hepática aguda (IHA) e os rins com insuficiência renal, levando até ao óbito (MEIRA et al., 2013). Segundo estudos a IHA é causada, em 50% dos casos, pela hepatotoxicidade proveniente de fármacos, incluindo o paracetamol (MEIRA et al., 2013).

Na administração de doses tóxicas, as vias tradicionais de metabolização saturam e a via do Citocromo P- 450 assume a biotransformação do paracetamol, ocasionando maior formação de metabólito tóxico e radicais livres, conduzindo a necrose dos hepatócitos. (Figura 2) (HEUBI, 1998).

Modelos experimentais que utilizam intoxicação por Paracetamol têm sido amplamente utilizados para avaliar hepatoproteção de drogas e compostos vegetais (LITOVITZ, 2000).

Figura 2. Cascata de eventos que ocorre no fígado após administração de uma dose tóxica de paracetamol. (Adaptada de TIMBRELL. J, 2008)



3.6 Enzimas indicadoras de danos hepáticos

As agressões hepáticas podem gerar alterações enzimáticas sem lesão morfológica. O aumento do nível das enzimas hepatobiliares é um dos marcadores mais sensíveis de disfunção hepática induzida por drogas. (GONZALEZ e SILVA, 2006). Algumas das enzimas consideradas indicadoras de hepatotoxicidade celular são as seguintes: alanina-trasaminase (ALT), aspartato-transaminase (AST) e a fosfatase alcalina.

As transaminases, ALT e AST, possuem um importante papel no metabolismo de proteínas e de hidratos de carbono e são amplamente distribuídas nos tecidos animais. ALT é

uma enzima encontrada livre no plasma dos hepatócitos, então no dano celular ela é liberada na corrente circulatória (TIMBRELL, J, 2008). Já a AST é encontrada predominantemente no citosol e em menor quantidade nas mitocôndrias dos hepatócitos (GONZALEZ e SILVA, 2006).

Tanto a ALT como AST existem normalmente no plasma sangüíneo humano, na bile, no líquido cefaloraquídeo e na saliva. As fosfatases alcalinas estão presentes em quase todos os tecidos e fluidos humanos, são fontes particularmente ricas o intestino delgado, os ossos, a glândula mamária, durante a lactação, e o rim. Os níveis de fosfatase alcalina sérica nas enfermidades do fígado, se encontram elevados (KING, 1968).

De acordo com Gonzalez e Silva (2006), a Fosfatase alcalina (FA) promove a catalisação da hidrólise de ésteres do ácido fosfórico sob condições alcalinas, tendo um pH de ótima atividade in vitro em torno de 10, existindo isoenzimas de FA na membrana celular de vários tecidos. Órgãos como fígado, rins, intestinos, pâncreas, ossos, e a placenta, tem maiores concentrações de FA nas membranas celulares; são duas formas de isoenzimas produzidas a partir de dois genes diferentes, uma intestinal e uma tecidual inespecífica, esta última pode sofrer alteração pós-translacional adicional nos diferentes tecidos, formando diferentes isoformas nos ossos, rins, placenta e fígado. Também de acordo com a mesma autora a maior parte de FA de origem sérica é hepática, onde esta presente nas células do epitélio biliar e nas membranas caniculares dos hepatócitos. Porém, de acordo com Gonzalez e Silva (2006), deve se levar em consideração a possibilidade do aumento de FA não ser de origem hepática, mas sim das outras isoformas, como por exemplo a óssea ou renal.

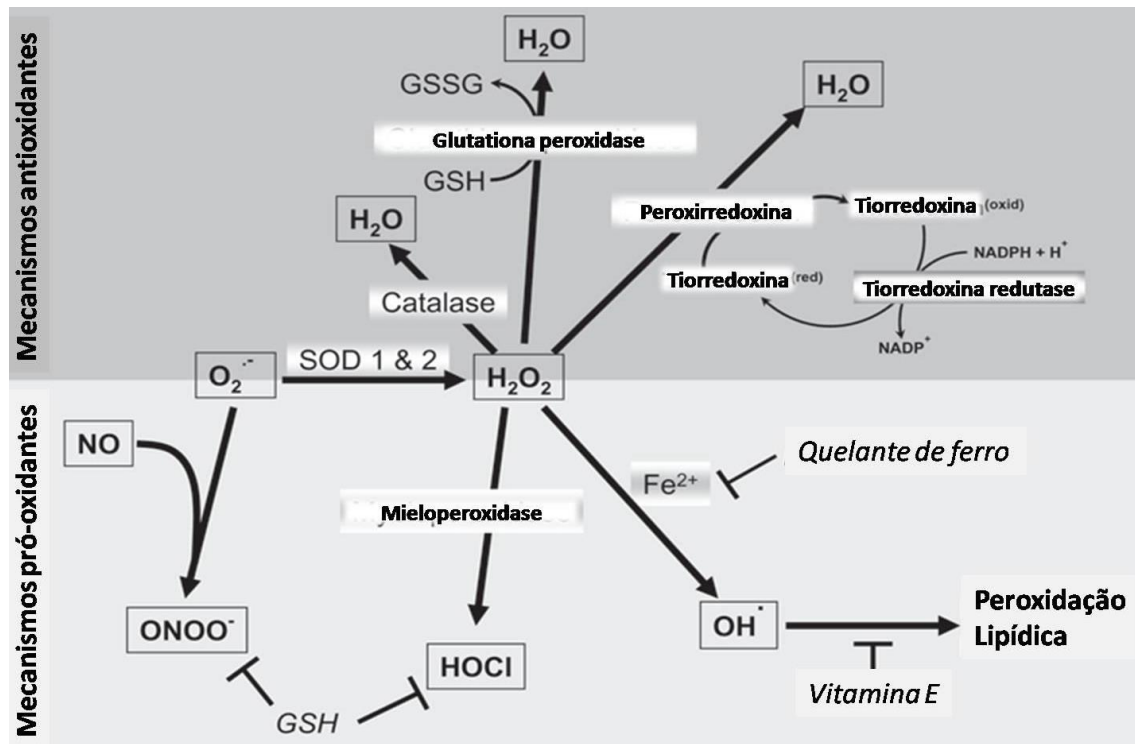
3.7 Estresse oxidativo e sistema antioxidante

O conceito de estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a quantidade de oxidantes e antioxidantes (CADENAS et al., 1998), porém Jones, em 2006, o classificou como sendo uma perturbação do controle e da sinalização redox.

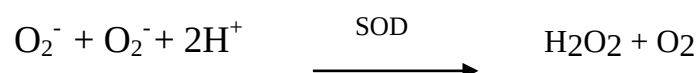
O estresse oxidativo é um evento intimamente relacionado à presença de radicais livres. Um radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada. Devido a esta característica, os radicais livres são altamente reativos e instáveis, podendo atacar alvos celulares diversos (proteínas, fosfolipídeos de membrana e ácidos nucleicos) com o objetivo de estabilizarem sua estrutura molecular. Há uma ampla variedade dessas moléculas nos seres vivos, porém nem todas são radicais. Dessa forma, tem sido utilizada a denominação EROs como um termo coletivo que inclui não apenas radicais de oxigênio, mas também algumas espécies não-radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio (CIRCU e AW, 2010).

O oxigênio molecular (O_2) é uma molécula fundamental para a sobrevivência de organismos aeróbios, sendo necessária durante diversos processos vitais como: respiração celular, produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas. Ao mesmo tempo, é uma molécula capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular (CIRCU e AW, 2010; JAESCHKE et al., 2012). A redução molecular do O_2 resulta na formação de EROs, incluindo o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila (Figura 3).

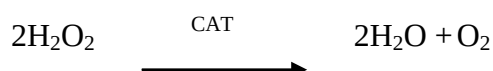
Figura 3. Mecanismos celulares de geração de oxidantes e sistema antioxidante (Adaptado de JAESCHKE et al., 2012).



Para garantir sua integridade estrutural e funcional, as células hepáticas têm um sistema antioxidante constituído por enzimas como as catalases e superóxido dismutase, que se conjuga espontaneamente com os metabólitos reativos, convertendo-os em produtos atóxicos, impedindo sua ligação às macromoléculas, que levariam à morte celular (CIRCU e AW, 2010). As principais EROs conhecidas são: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($HO\cdot$). $O_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 espontaneamente e essa reação pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), ocorrendo a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, sendo este menos reativo e podendo ser degradado por outras enzimas (CHANCE; BOVERIS, 1979).



Outra enzima importante é a CAT. O peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação dessa enzima. Esta, por sua vez, tem uma ação muito específica, já que atua em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (CHANCE; BOVERIS, 1979).



3.8 Silimarina e as plantas hepatoprotetoras no Brasil

Pertencente à família Asteraceae, *Silybum. marianum* é uma planta herbácea, nativa do mediterrâneo e cultivada pelo sul da Europa como um vegetal ; A silibina é o principal constituinte (70–80%) isolado dessa planta e é usada por décadas na medicina popular da região mediterrânea europeia, na terapia de hepatopatias (FLORA et al., 1998).

Segundo Shailajan et al., (2005) a silimarina é um potente antioxidante que protege vários tipos celulares do organismo, tais como hepatócitos e astrócitos de compostos geradores de radicais livres. Portanto, o efeito da silimarina aos possíveis danos hepáticos causados pelo Paracetamol já estão bem estabelecidos. (ACHLIYA; WADODKAR; DORLE, 2004). A silimarina (padronizada com silibina) está entre os fitoterápicos mais utilizados no tratamento contra distúrbios hepáticos, dentre eles, hepatite crônica e viral, cirrose e doenças hepáticas alcoólicas. Se administrada oralmente possui rápida absorção (2-4 horas); entretanto possui baixa absorção no trato gastrointestinal (20- 50%) e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade (JACOBS et al., 2002; FRASCHINI et al., 2002; BALL & KOWDLEY, 2005; JAVED et al., 2011). Os principais mecanismos de ação da silimarina estão relacionados com a proteção dos hepatócitos, impedindo que hepatotoxinas se liguem aos sítios receptores de membranas destas células, além de diminuir o estresse oxidativo e

regenerar hepatócitos, através da síntese de proteínas estimulada pela RNA polimerase ribossomal (LUPPER, 1998; MURPHY et al., 2000; FRASCHINI et al., 2002; BALL & KOWDLEY, 2005; DHIMAN & CHAWLA, 2005).

A Silimarina vem sendo utilizada como controle positivo em experimentos animais que avaliam atividade hepatoprotetora de extratos vegetais, sendo utilizada como controle positivo para comparação de hepatoproteção, assim como do mecanismo de ação pelo qual essa proteção ocorre (ILAVARASAN et al., 2003; HSU et al., 2009; DONG et al., 2013; OLALEYE et al., 2014; DONG et al., 2015).

Estudos de Sabir & Rocha (2008) demonstraram o efeito hepatoprotetor do extrato de *Solanum fastigiatum*. O estudo foi conduzido com a utilização de camundongos, machos, que receberam oralmente paracetamol (250 mg/kg) e diferentes doses do extrato de *S. fastigiatum* (100 e 200 mg/kg). Os extratos foram administrados três horas após o paracetamol durante 7 dias consecutivos. Os resultados demonstraram que ambas as doses do extrato foram eficazes em proteger do dano induzido por paracetamol e apresentaram atividade antioxidante. A administração do extrato reduziu os níveis de peroxidação lipídica e restaurou os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) além de, reduzir a atividade dos marcadores hepáticos: ALT e AST. Os autores destacam que a atividade protetora da planta pode ser atribuída ao elevado teor de compostos fenólicos e flavonóides (rutina e quercetina) comprovados pela análise fitoquímica.

Ilavarasan et al (2003), quando investigaram a capacidade protetora do extrato de *Camellia sinensis* sobre o dano hepático induzido por diferentes doses orais de paracetamol (150, 200 e 300 mg/kg) administrados antes ou após o extrato, evidenciaram que a planta é detentora de tal atividade, devido aos compostos bioativos presentes em sua composição, como catequinas polifenólicas e epigallocatequina galato. Um achado importante foi o fato de que a administração do extrato posteriormente a superdosagem do paracetamol potencializou

o dano hepático. Provavelmente, esse efeito está relacionado à depleção dos níveis de GSH encontrados, demonstrando a importância do uso de diferentes protocolos experimentais na investigação dos efeitos farmacológicos das plantas e suas possíveis interações. Os autores salientam ainda que o consumo de chá verde utilizada no estudo (2,7 g/ dia para um adulto de 65 kg) resultaria em um possível dano quando esses dois compostos forem utilizados concomitantemente. Kumar (2004) demonstrou o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico de *Desmodium gangeticum*, planta utilizada como digestiva, antiemética e antiinflamatória. O extrato fora administrado por via oral na dose de 500 mg/kg concomitante com paracetamol (400 mg/kg, p.o) por 28 dias. Os resultados evidenciaram que a administração de paracetamol provocou severa hepatotoxicidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O material vegetal (folhas frescas de *I. suffruticosa*) foi coletado na cidade de Recife, no Estado de Pernambuco no período de julho de 2015. A amostra foi catalogada pela Bióloga Marlene Barbosa do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e encontra-se catalogada sob o número 43694 no Herbário Geraldo Mariz do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

4.2 Preparação do extrato etanólico de *I. suffruticosa*

Folhas frescas de *I. suffruticosa* (1,3 Kg) recém coletadas, foram higienizadas em água corrente, pulverizadas e, posteriormente submetidas a extração com 4 litros de etanol (C₂H₆O) à temperatura ambiente, durante 48 horas. Em seguida o solvente foi filtrado e evaporado a 35

°C sob pressão reduzida. O material obtido foi identificado como extrato etanólico de *I. suffruticosa* (EFIS). Para a administração nos animais, o EFIS foi ressuspenso solução salina.

4.3 Animais experimentais

Foram utilizados 35 camundongos albinos Swiss, machos (35 a 45g) provenientes do biotério do Laboratório de Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da UFPE (Pernambuco, Brasil). Os camundongos receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais padrão de temperatura, umidade e sob ciclos claro e escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE - processo N° 23076.025195/2012-64 de 2012 (Anexo 3).

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n=5 animais/grupo):

1 - Sadios;

2 - Com lesão hepática induzida por paracetamol (PCM) e tratados com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.);

3 - Com lesão hepática induzida por PCM e tratados com silimarina (25 mg/kg; v.o.);

4 - Pré-tratados com EFIS (50mg/kg; v.o) antes da indução da lesão hepática induzida por PCM;

5 - Pré-tratados com EFIS (100mg/kg; v.o) antes da indução da lesão hepática induzida por PCM;

5 - Tratados com EFIS (50mg/kg; v.o) após a indução da lesão hepática induzida por PCM;

6 - Tratados com EFIS (100mg/kg; v.o) após a indução da lesão hepática induzida por PCM

4.4.2 Procedimento Experimental

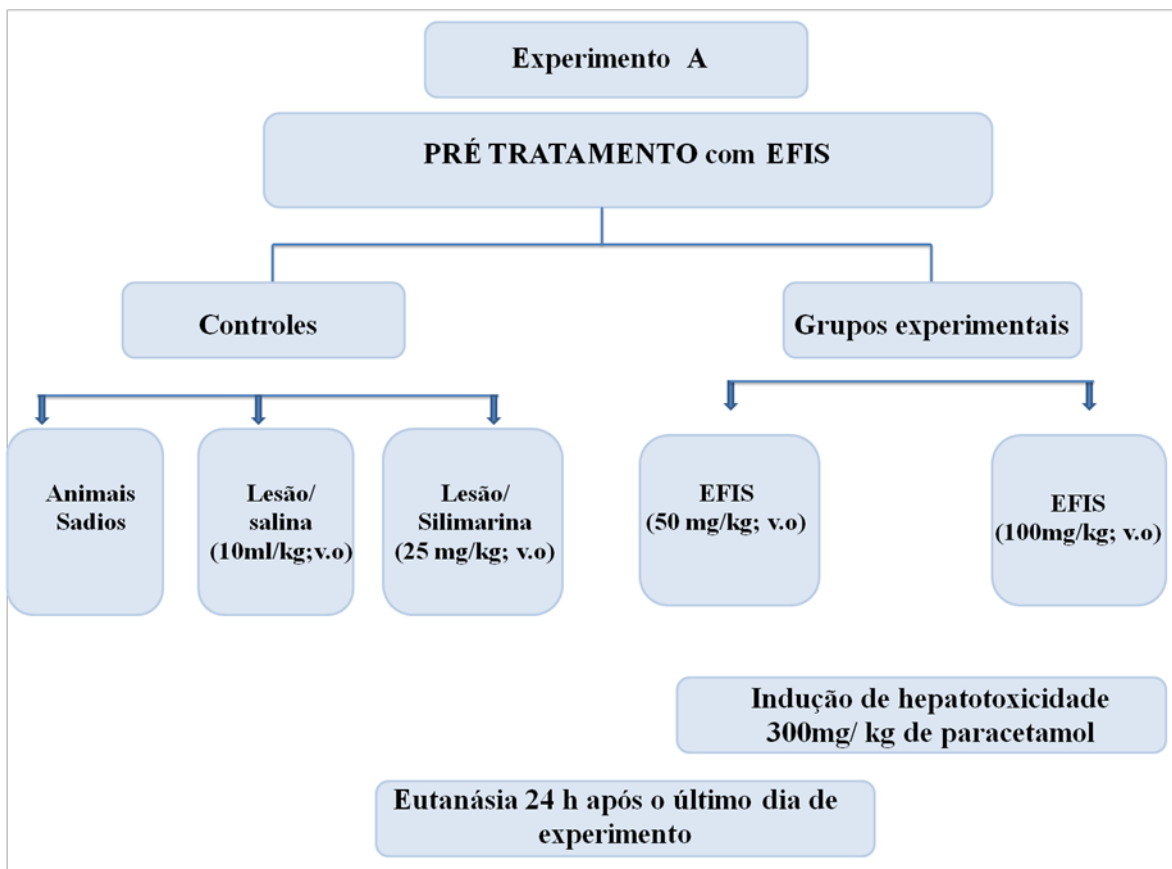
4.4.2.1 *Indução da lesão hepática Modelo experimental de hepatotoxicidade induzida por overdose de PCM.*

Para a indução da hepatotoxicidade nos camundongos Swiss, foi utilizado o modelo de experimental de administração de overdose de paracetamol (Sigma-Aldrich) conforme descrito na literatura (JAESCHKE, RAMACHANDRAN, 2011; MARQUES, 2013). Os animais receberam, com um intervalo de 24 horas entre cada administração, duas doses de paracetamol (300 mg/kg; v.o.) dissolvido em solução salina.

Dois experimentos foram realizados: Experimento A - Determinação do efeito hepatoprotetor (tratamento antes da indução da lesão hepática) do EFIS contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos e Experimento B - Determinação do efeito do pós-tratamento (após a indução da lesão hepática) com EFIS contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos.

No Experimento A, o EFIS foi administrado em camundongos antes da indução da lesão hepática para avaliação de seu efeito preventivo (hepatoprotetor). Nesse experimento, os animais receberam durante cinco (05) dias consecutivos EFIS (50 ou 100 mg/kg), silimarina (25 mg/kg) ou salina (10 ml/kg) via gavagem (Figura 4). O primeiro grupo foi composto por animais saudáveis (sem lesão hepática). No último dia dos tratamentos (5º dia) a lesão hepática foi induzida através da administração de duas doses de paracetamol (300 mg/Kg; v.o.), com intervalo de 24 horas cada. Após 24 horas do último dia de administração do paracetamol, os animais foram eutanasiados.

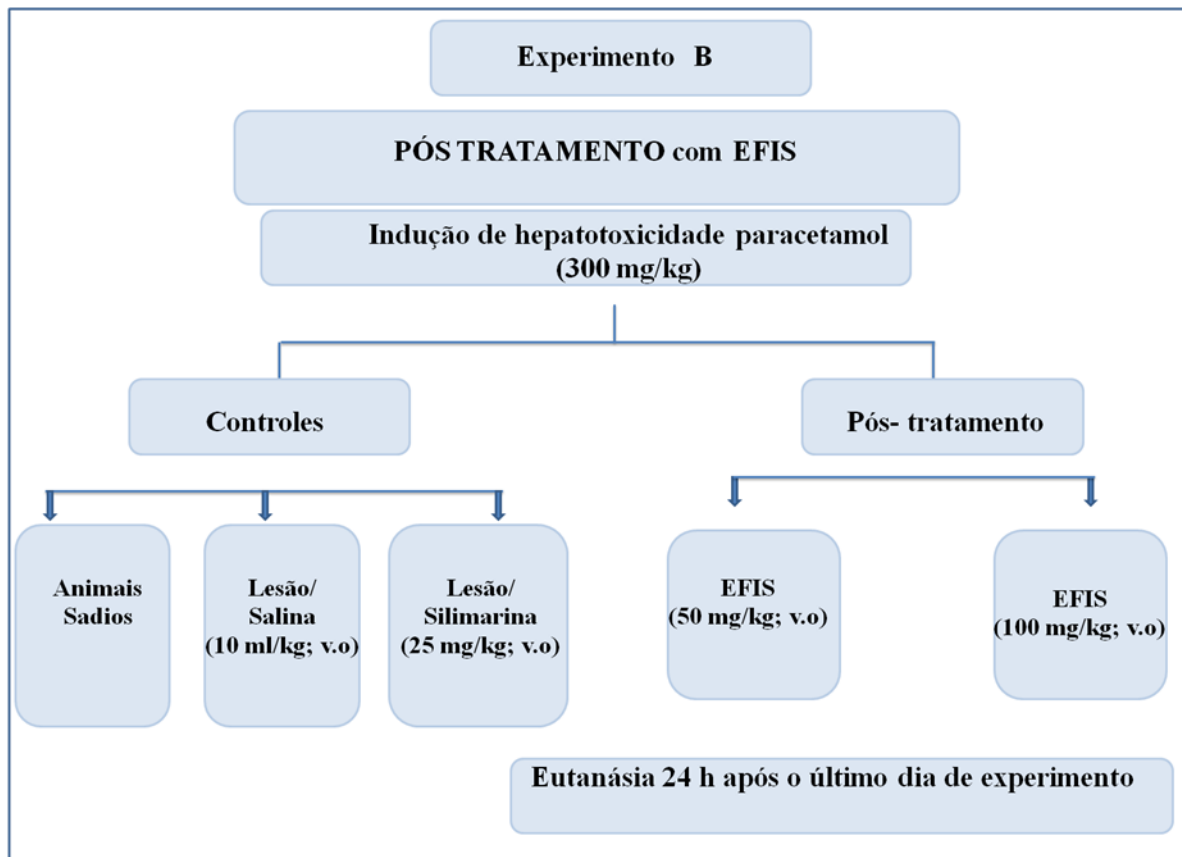
Figura 4. Desenho experimental da distribuição dos grupos para o estudo do efeito do tratamento com EFIS (pré lesão hepática). 1 = animais saudáveis; 2 = animais com lesão e tratados com salina (10 ml/kg; v.o.); 3 = animais tratados com silimarina (25 mg/kg); 4, e 6 = animais pré- tratados com EFIS (50 ou 100 mg/kg; respectivamente) + indução de lesão hepática.



No experimento B, o EFIS foi administrado em camundongos, após a indução da lesão hepática para avaliação de seu efeito curativo. Os dois experimentos serão descritos detalhadamente nas secções seguintes.

Nesse ensaio, camundongos Swiss foram também aleatoriamente distribuídos em cinco grupos (n=5 animais/grupo) (figura 5), mas diferentemente dos animais do item anterior a lesão hepática foi induzida antes do início dos tratamentos com EFIS (50 ou 100 mg/kg), silimarina (25 mg/kg) ou salina (10 ml/kg) via gavagem, durante sete dias consecutivos. O primeiro grupo foi composto por animais saudáveis (sem lesão hepática)

Figura 5. Desenho experimental da distribuição dos grupos para o estudo do efeito do tratamento com EFIS (pós lesão hepática). 1 = animais saudáveis; 2 = animais com lesão e tratados com salina (10 ml/kg; v.o.); 3 = animais tratados com silimarina (25 mg/kg); 5 e 7 = animais com lesão hepática / pós- tratados com EFIS (50 ou 100 mg/kg; respectivamente).



4.5 Coleta de sangue dos animais.

Após sete dias do desenvolvimento do modelo, os animais foram anestesiados. O sangue foi coletado através de punção cardíaca e logo em seguida centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C para a obtenção do soro. Esse material foi armazenado em freezer -20°C e utilizado para determinação dos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP).

4.5.1 Determinação do efeito do EFIS sobre os níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP).

As análises bioquímicas para determinação das concentrações séricas das enzimas hepáticas ALT e AST foram realizadas no soro utilizando kits comerciais (Labtest®)

4.5.1.1 Alanina aminotransferase (ALT)

A ALT promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos. O piruvato formado é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensidade de cor em meio alcalino.



Foi adicionado 0,1 mL do Reagente nº 1 (TGP substrato) e transferido para o banho-maria a 37°C. Após 2 minutos, adicionou-se 0,02 mL da amostra ao microtubo com reagente nº 1. As amostras permaneceram 30 minutos no banho-maria a 37°C. Posteriormente, o microtubo foi retirado do banho-maria e adicionou-se 0,1 mL do Reagente nº 2 (reagente de cor), que foi homogeneizado e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) às amostras, que foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos. A leitura foi realizada a 505 nm. Os valores são expressos em Unidades/ mL. Conversão para Unidades Internacionais (UI): Unidades/ mL x 0,482 (IFCC,2002).

4.5.1.2 Aspartato transaminase (AST)

A AST promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



Foi adicionado 0,1 mL do Reagente nº 1 (TGO substrato) e transferido para o banho-maria a 37°C. Após 2 minutos adicionou-se 0,02 mL da amostra ao microtubo com reagente nº 1. As amostras permaneceram 60 minutos no banho-maria a 37°C. Posteriormente, o microtubo foi retirado do banho-maria e adicionou-se 0,1 mL do Reagente nº 2 (reagente de cor), que foi homogeneizado e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaOH às amostras, que foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos para a realização da leitura a 505 nm. Os valores são expressos em Unidades/mL. Conversão para UI: Unidades/mL x 0,482 (IFCC,2002).

4.6 Obtenção das amostras de tecido hepático para as análises histopatológicas, histomorfométrica e determinação da atividade das enzimas antioxidantes enzimas antioxidantes superoxiódio dismutase (SOD) e catalase (CAT)

Após a coleta do sangue dos animais (item 4.4), realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de intervenção cirúrgica, exposição do fígado e retirada do órgão. Após o fígado ter sido retirado, um pequeno fragmento foi imerso em solução fixadora de formaldeído 10% durante 48 horas para o preparo de lâminas histológicas; outro fragmento do fígado foi congelado em freezer -80°C, para quantificação de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e proteínas totais. No final do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

4.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT

4.7.1 Atividade da Catalase (CAT)

Para determinar a atividade da CAT, o tecido hepático (30 mg) foi macerado com a solução tampão PBS 1% (tampão fosfato-salino). O homogenato resultante foi centrifugado a

6000 rpm a 4°C por 10 min. O sobrenadante resultante foi utilizado para mensuração da atividade enzimática, a qual foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo metodologia de Aebi (1984). A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática.

4.7.2 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

A concentração de superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método espectrofotométrico de Dieterich et al, (2000) com modificações. A atividade dessa enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o O_2^- da reação. Para isso utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo O_2^- que é substrato da enzima. O fígado (30 mg) foi homogeneizado em tampão glicina. Para a leitura foi adicionado 10 µl de catalase, em seguida diferentes volumes (10µl, 20 µl e 30 µl) do homogeneizado, 970 µl de tampão glicina (32 °C), 17 µl de adrenalina e mediu-se a inibição da reação. A absorbância foi medida a 480 nm a cada 10 s por 180 s. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) (BARREIROS, 2006).

4.8 Concentração de grupos tióis

A oxidação de grupo tióis (SH) das proteínas de membrana foi induzida por T-butil hidroperóxido a 0,6 mM e $CaCl_2$ a 10 mM. Em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) a 6% (v/v), centrifugados a 13.000g por 10 minutos para obtenção do precipitado. Este foi ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de potássio a 0,5M, pH 7,6 e após a adição do

ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) (0,1mM), a absorvância do SH precipitado foi determinada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm, sendo a concentração de grupos tiólicos calculada usando $\epsilon = 13.600 \text{ (mol/l)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BARREIROS, 2006).

4.9 Estudo Histopatológico e Histomorfométrico do tecido hepático de camundongos submetidos ao pré-tratamento ou pós- tratamento com EFIS.

Amostras do tecido hepático dos grupos controles (sadio, lesão/salina e lesão/silimarina) e experimentais (pré ou pós tratados com dose repetidas de EFIS 50 ou 100 mg/kg; v.o.) foram fixados em formaldeído (2,5%) e corados com hematoxilina e eosina (HE). Trinta (30) preparações histológicas foram estudadas pela análise de quatro campos aleatórios. As preparações histológicas foram digitalizadas com ampliação final de 40x usando uma câmera de vídeo digital (Leica DFC 280, Wentzler, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (Leica Microscopy & Systems GmbH, Wentzler, Alemanha). Para cada um dos grupos foi observada a arquitetura do tecido hepático e as seguintes estruturas: hepatócitos (citoplasma e núcleos), capilares sinusóides e veias centrais. A avaliação histomorfométrica, para cada grupo controle e experimental foram analisados um total de 3360 estruturas sendo 1680 núcleos e 1680 capilares sinusóides e foram analisadas usando o software Scion Image (Scion Corporation, Nova York, EUA).

4.10 Determinação da atividade antioxidante total pela captura de radical livre DPPH

O ensaio para avaliar a atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) foi realizado através do método de DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil) em placa de 96 poços. Foram preparadas soluções do extrato etanólico das folhas de *I. suffruticosa* nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ e DPPH com absorvância de 517 nm. As

amostras foram incubadas com 1:1(V/V) de solução de DPPH a 0,06 mM por 40 minutos a 25° C, analisadas em leitor de microplacas a 517 nm e relacionadas ao controle negativo (DPPH e etanol). A capacidade de eliminar o DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Eliminação [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle DPPH})}{\text{Abs controle DPPH}} \times 100$$

4.11 Análises estatísticas

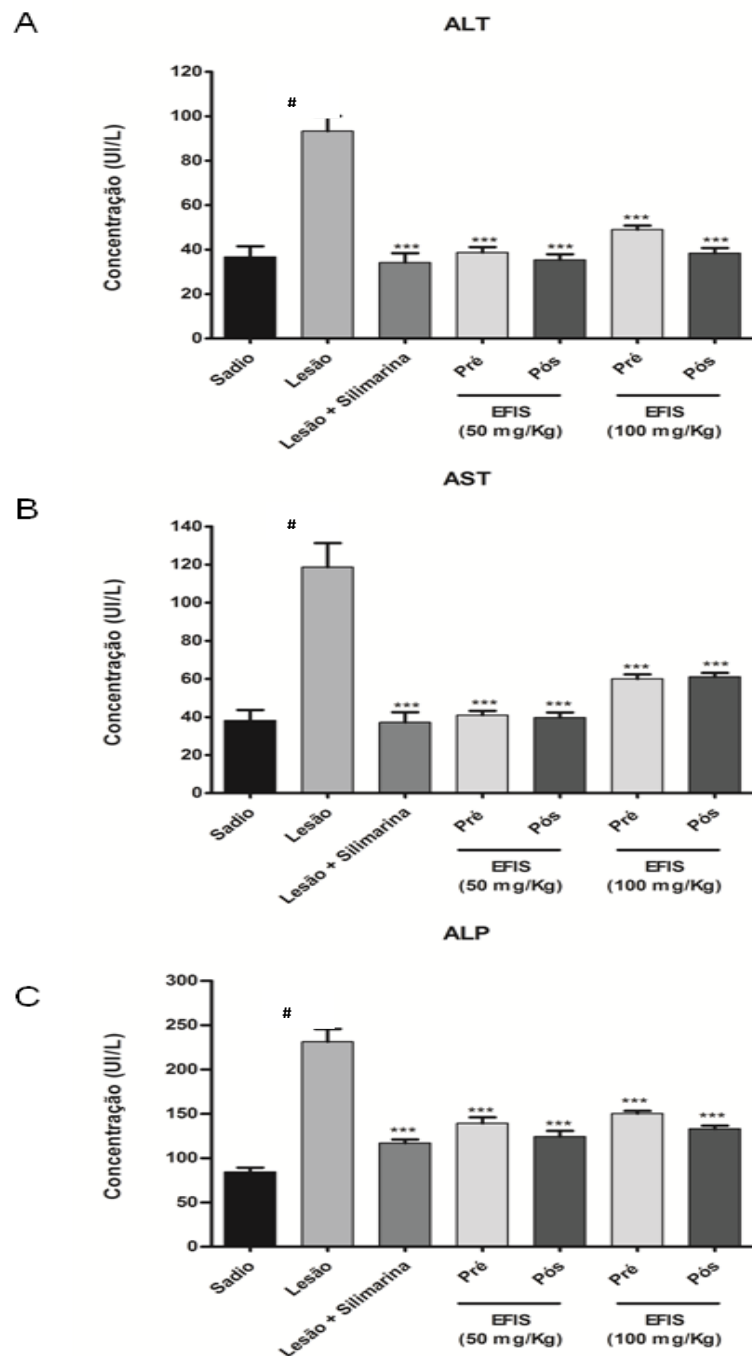
As análises estatísticas dos resultados histomorfométricos (área e perímetro dos hepatócitos e diâmetro dos sinusóides e as dosagens de transaminases e fosfatase alcalina) foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas dos resultados da atividade enzimática da SOD e CAT e da concentração de grupos tióis foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e submetidos aos testes Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann –Whitney ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do programa, programa Graph Pad Prism® 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) em camundongos albinos Swiss tratados com EFIS antes (pré-tratamento) ou após (pós-tratamento) a lesão hepática induzida por overdose de paracetamol.

Os animais do grupo com lesão hepática induzida por paracetamol (PCM) apresentaram elevados níveis de ALT, AST e ALP quando comparados aos animais sadios (Figura 8). Conforme se pode observar, os grupos submetidos ao pré-tratamento ou pós-tratamento com doses repetidas de EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.) exibiram significativa ($p<0.05$) redução dos níveis séricos de ALT (Figura 8A), AST (Figura 8B) e ALP (Figura 8C) em relação ao grupo com lesão hepática induzida por PCM. As concentrações séricas dessas enzimas se mostraram próximas daquelas registradas no grupo de animais sadios e comparável àquele tratado com silimarina (25 mg/kg; v.o.). A redução nos níveis séricos desses importantes indicadores de função hepática nos grupos submetidos ao tratamento com EFIS, antes ou após a administração do agente hepatotóxico, sugere uma atividade hepatoprotetora, bem como curativa do EFIS frente ao dano hepático induzido pelo PCM.

Figura 6. (A) Níveis séricos da enzima ALT; **(B)** Níveis séricos da enzima AST; **(C)** Níveis séricos da enzima ALP. Sadio = Grupo sem lesão hepática; Lesão = Grupo com lesão hepática e tratado com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); Lesão + silimarina = Grupo com lesão hepática e tratado com Silimarina (25 mg/kg; v.o.); Pré- 50 e Pré-100 = Grupos tratado antes da indução da lesão hepática com EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o., respectivamente; Pós-50 e Pós-100 = Grupos tratado após a indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente). Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo lesão ***. # $p < 0,001$, quando comparado com o grupo sadio.



5.2 Efeitos da administração do EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.) em regime preventivo (pré-tratamento) ou curativo (pós-tratamento), sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e de grupos tióis de camundongos Swiss com lesão hepática induzida por paracetamol.

Conforme indicado na Figura 9, a atividade das enzimas SOD (Figura 9A) e da CAT (Figura 9B) foi significativamente reduzida ($p < 0,01$) no grupo com lesão hepática em relação ao grupo sadio (sem lesão hepática). No entanto, o EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.), administrado em regime preventivo (pré-tratamento) ou curativo (pós-tratamento) resultou em um aumento significativo na atividade da SOD e da CAT. No grupo submetido ao pós-tratamento com EFIS (100 mg/kg; v.o.) podemos observar que a recuperação da atividade enzimática da SOD e CAT foi comparável àquele observado no grupo tratado com silimarina. Esses resultados indicam que o pré-tratamento ou pós-tratamento com EFIS promove a recuperação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e dos grupos tióis (Figura 9C), de forma dose-dependente, contribuindo assim para corrigir o desequilíbrio do estado de redox intracelular promovido pelo paracetamol.

Em relação aos grupos Tióis, a concentração no grupo lesão/salina, diminuiu 2,9 vezes em relação ao grupo de animais sadios. Os grupos tratados com EFIS (50 mg/kg), mostraram reduções na concentração de tióis de 50% (pré-tratados) e 20% (pós-tratados) em relação ao grupo tratado com silimarina (25 mg/kg). Nos grupos pré e pós tratados com EFIS 100 mg/kg, a concentração de grupos tióis foi similar ao grupo tratado com silimarina (25 mg/kg). A redução da concentração de grupos tióis nos grupos tratados com EFIS (50 mg/kg e 100 mg/kg) foi atenuada (pré-tratados) e similar (pós-tratados) quando os animais foram tratados com silimarina (25 mg/kg), respectivamente (Figura 7C).

Os resultados evidenciam que em relação à atividade enzimática da SOD e CAT e concentração de grupos tióis, o grupo pós-tratado com EFIS (100 mg/kg) apresentou atividade enzimática e concentração similar ao grupo tratado com silimarina (25 mg/kg).

Figura 7(A). Efeito do pré ou pós tratamentos com EFIS sobre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) Sadio = Grupo sem lesão hepática; Lesão = Grupo com lesão hepática e tratado com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); Lesão + silimarina = Grupo com lesão hepática e tratado com Silimarina (25 mg/kg; v.o.); Pré- 50 e Pré-100 = Grupos tratado antes da indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente; Pós-50 e Pós-100 = Grupos tratado após a indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente). Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo lesão ***. # $p < 0,001$, quando comparado com o grupo sadio.

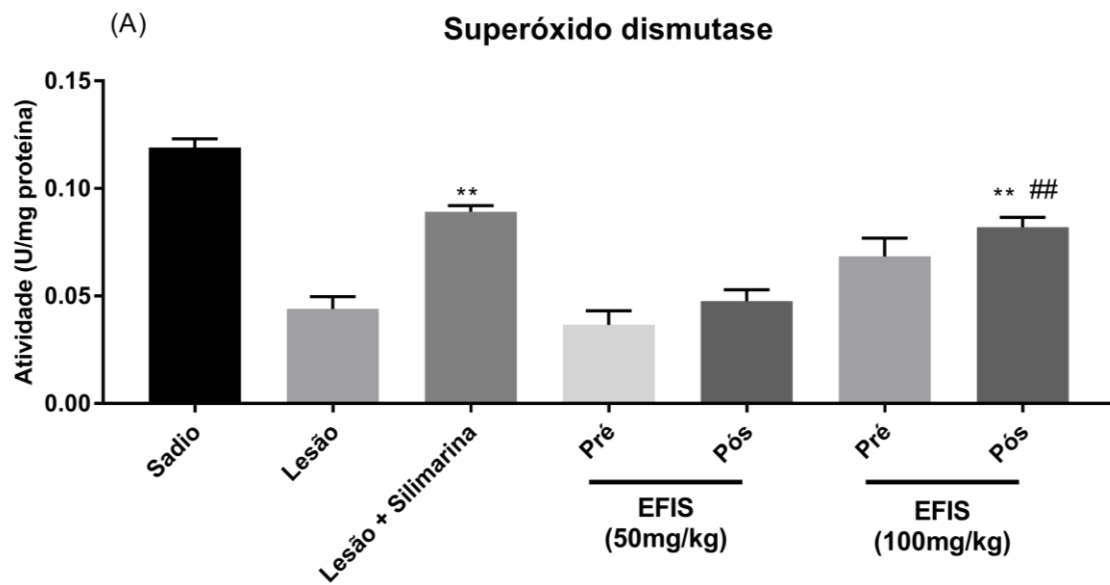


Figura 7(B). Efeito do pré ou pós tratamentos com EFIS sobre a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em camundongos albinos Swiss com lesão hepática induzida por paracetamol. Sadio = Grupo sem lesão hepática; Lesão = Grupo com lesão hepática e tratado com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); Lesão + silimarina = Grupo com lesão hepática e tratado com Silimarina (25 mg/kg; v.o.); Pré- 50e Pré-100 = Grupos tratado antes da indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente; Pós-50 e Pós-100 = Grupos tratado após a indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente). Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo lesão. # $p < 0,001$, quando comparado com o grupo sadio.

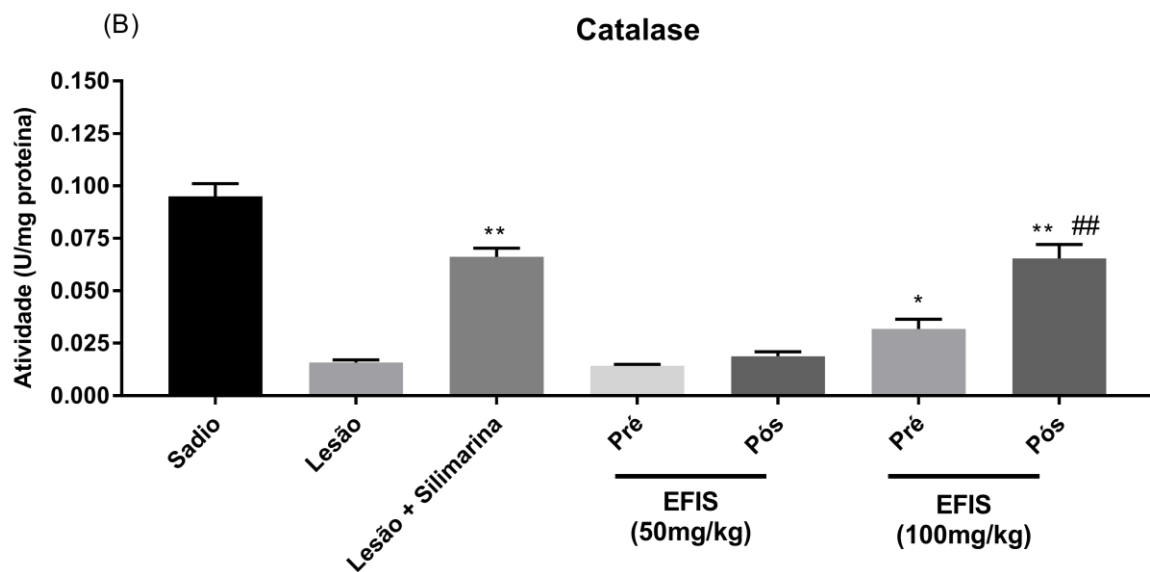
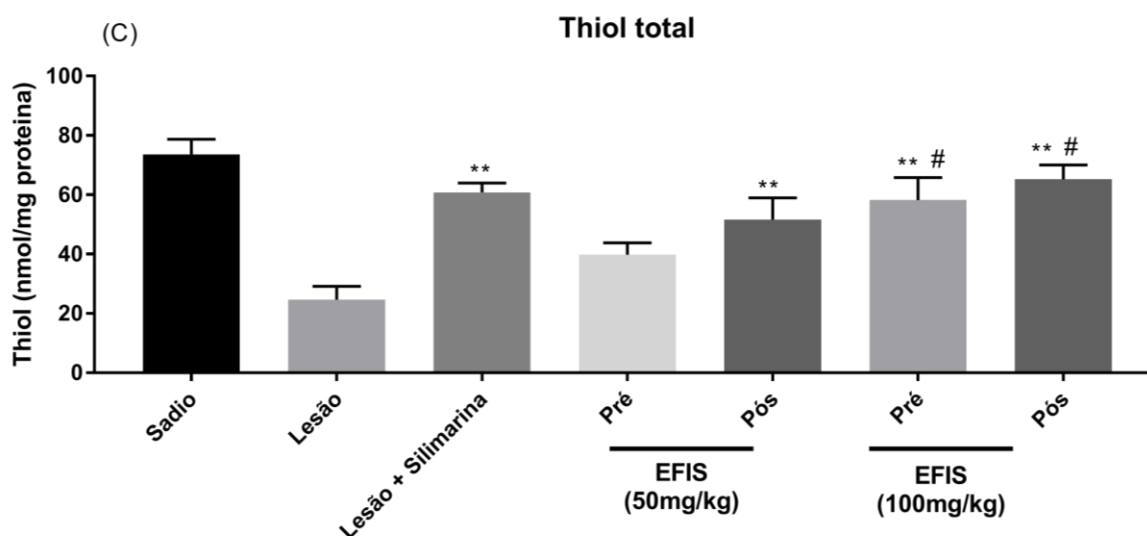


Figura 7(C). Efeito do pré ou pós tratamentos com EFIS sobre a concentração de grupos Tiois em camundongos albinos Swiss com lesão hepática induzida por paracetamol. Sadio = Grupo sem lesão hepática; Lesão = Grupo com lesão hepática e tratado com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); Lesão + silimarina = Grupo com lesão hepática e tratado com Silimarina (25 mg/kg; v.o.); Pré- 50e Pré-100 = Grupos tratado antes da indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente; Pós-50 e Pós-100 = Grupos tratado após a indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente). Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo lesão ***. # $p < 0,001$, quando comparado com o grupo sadio



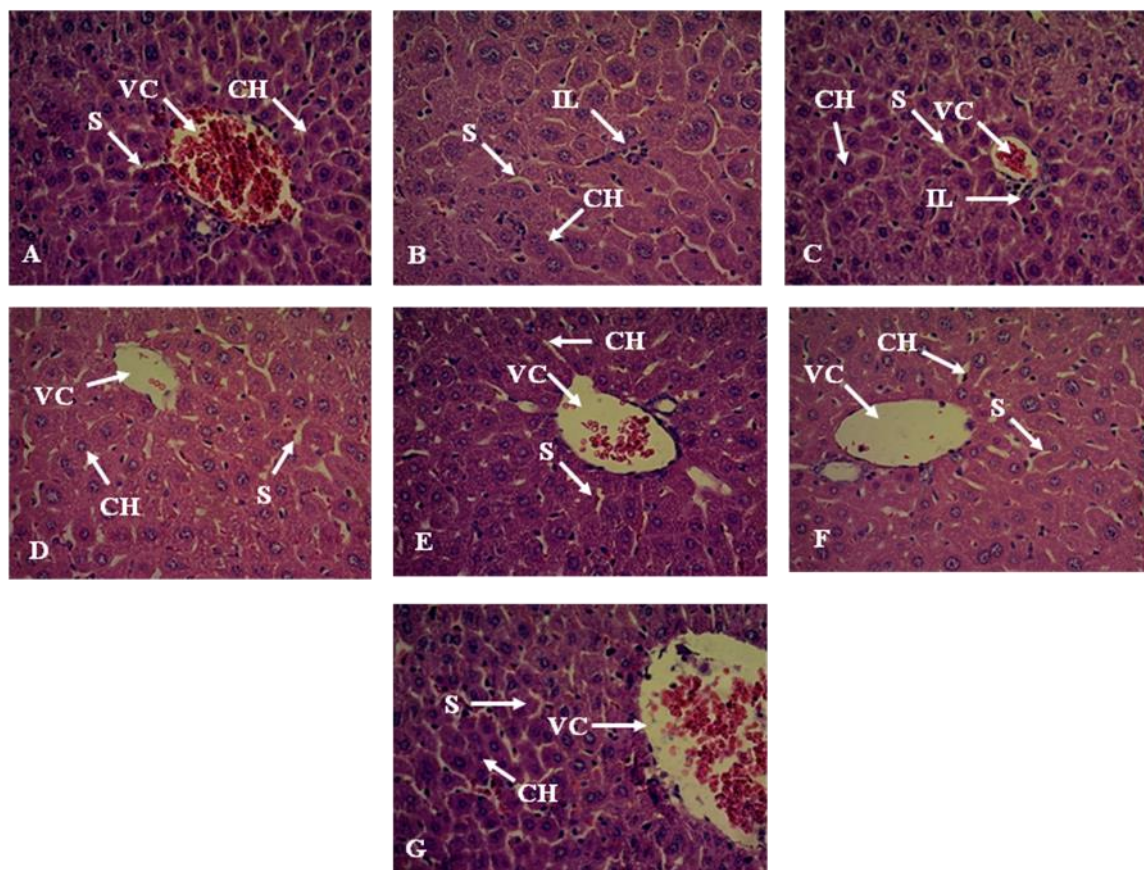
5.3 Efeito do EFIS antes ou após a indução de lesão hepática por paracetamol sobre tecido hepático de camundongos albinos Swiss.

5.3.1 Estudo Histopatológico do tecido hepático de camundongos de camundongos albinos Swiss.

A figura 8 mostra as fotomicrografia de amostras de tecido hepático de camundongos albinos Swiss pré-tratados ou pós -tratados com EFIS em modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol. As amostras foram coletadas de cada grupo no oitavo dia, observadas com aumento de 400x. A observação histológica do tecido hepático de camundongos albinos Swiss do grupo sadio (fig 8A) mostraram arquitetura normal do tecido hepático; Veia centro lobular (VC), irradiando-se para fora da veia os cordões de hepatócitos (CH) bem organizado nas unidades estruturais das células entre os quais estão os capilares

sinusóides (S), muito bem arranjados, quando comparados ao grupo lesão hepática/salina (fig 8B) que apresentou uma histopatologia com alterações nos cordões de hepatócitos (CH), capilares sinusóides (S) e veias centrais distendidas (VC), congestão hepática e discreta infiltração leucocitária (IL). Por outro lado as observação histológica do tecido hepático pré (Fig 8D e E) ou pós (Fig 8F e G) tratados com EFIS nas doses repetidas (50 mg/kg ou 100mg/Kg) antes e após a indução da lesão hepática por paracetamol, quando comparados com os grupos sadio (Fig 8A) e lesão/silimarina (fig 8C) mostrando similaridades da arquitetura normal do tecido hepático. Contudo o grupo lesão/silimarina (Fig 8C) apresentou áreas com discreta infiltração leucocitária (IL). Os resultados deste estudo, sugerem que os grupo pré e pós tratados com EFIS (50 ou 100 mg/Kg; v.o.) apresentaram melhor resposta com uma possível ação angiogênica, quando comparados ao grupo com lesão hepática/silimarina que apresentou discreta infiltração leucocitária (IL).

Figura 8. Fotomicrografias de tecido hepático de camundongos albinos Swiss pré-tratados ou Pós tratados com EFIS em modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol **A** = sadios; **B** = lesão hepática/salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); **C** = lesão hepática/ silimarina (25 mg/kg; v.o.); **D**= Pré- EFIS 50 (50mg/kg; v.o); **E** = Pós EFIS 50 (50mg/kg; v.o); **F** = Pré EFIS 100 (100 mg/kg; v.o); **G** = Pós EFIS 100 (100 mg/kg; v.o). **S**=sinusóides hepáticos; **VC**= veia central; **CH**= cordão de hepatócitos; **IL**=Infiltração de leucócitos (Aumento 400x)



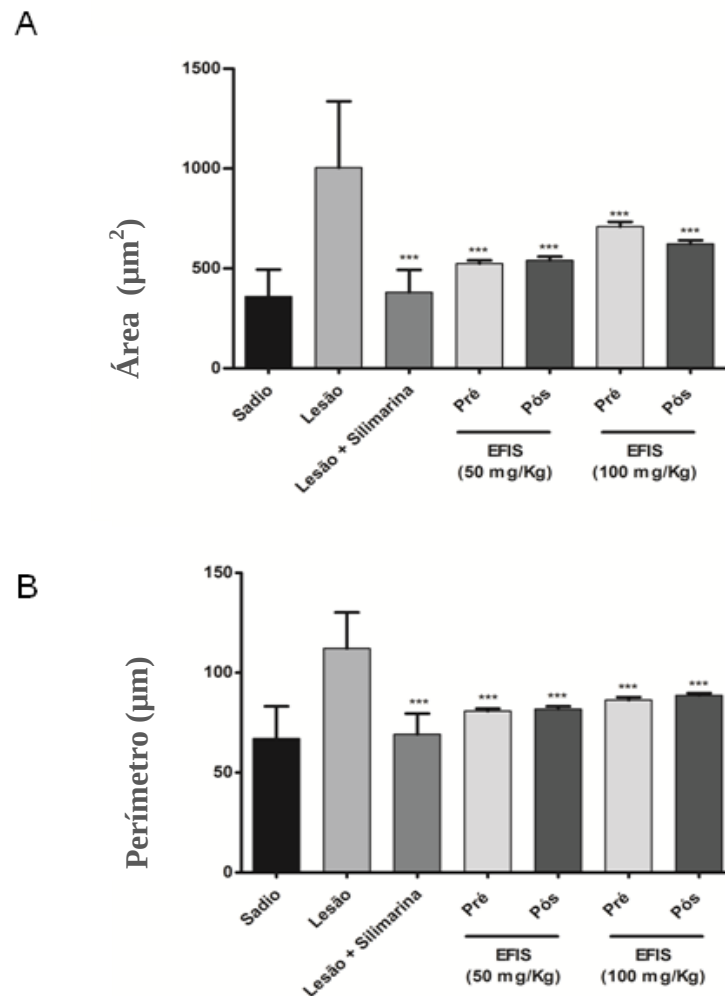
5.4 Análise Histomorfométrica do tecido hepático de camundongos albinos Swiss

5.4.1 Área e perímetro dos núcleos dos hepatócitos.

Os resultados da histomorfometria dos núcleos dos hepatócitos estão representados na figura 9 A e B. As áreas e perímetros dos núcleos dos hepatócitos de camundongos albinos Swiss do grupo sadio quando comparado ao de lesão/salina apresentou diferença significativa ($p < 0,001$). Contudo os grupos de animais submetidos ao pré ou pós tratamento com doses repetidas por EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o.) quando comparados entre si foram similares, da

mesma forma foram semelhantes quando comparados com os grupos sadio e lesão/silimarina (25 mg/Kg; v.o). Por outro lado, os grupos pré e pós tratados com EFIS, sadio e silimarina quando comparados com grupo lesão/salina, mostraram diferença significativa ($P < 0,001$).

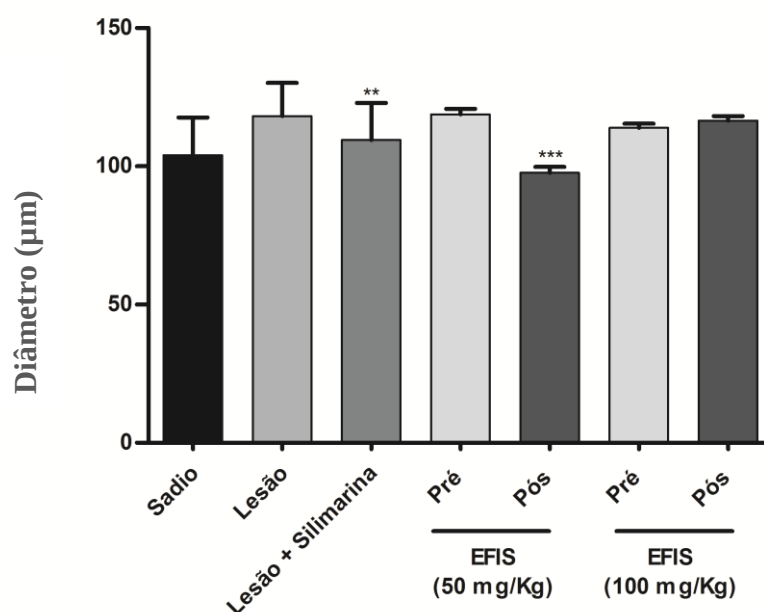
Figura 9. Histomorfometria da área e perímetro dos núcleos dos hepatócitos de camundongos. **(A)** Área dos hepatócitos; **(B)** Perímetro dos hepatócitos. Sadio = Grupo sem lesão hepática; Lesão = Grupo com lesão hepática e tratado com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); Lesão + silimarina = Grupo com lesão hepática e tratado com Silimarina (25 mg/kg; v.o.); Pré- 50 e Pré-100 = Grupos tratado antes da indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente); Pós-50 e Pós-100 = Grupos tratado após a indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente). Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. ** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo lesão ***.



5.4.2 Diâmetro dos sinusóides hepáticos

Foram quantificados e analisados para cada grupo de camundongos albinos um total de 240 capilares sinusoide dos hepatocitos. As análises histomorfométricas dos diâmetros dos capilares sinusóides dos hepatocitos dos camundongos albinos grupo do sadio quando comparado ao grupo lesão/salina apresentaram diferença significativo ($P < 0,001$). Os diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos dos grupos pré e pós tratados com dose repetidas por EFIS (50 e 100 mg/Kg; v.o.) quando comparados entre si foram similares da mesma forma quando comparados com os grupos sadio e lesao/silimarina (25 mg/kg; v.o.) Por outro lado diâmetros dos sinusóides dos grupos pré e pós tratados por EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o.), sadio e lesão/silimarina quando comparados o grupo com lesão/salina apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$). Os resultados da histomorfometria do diâmetro dos sinusóides estão representados na figura 10.

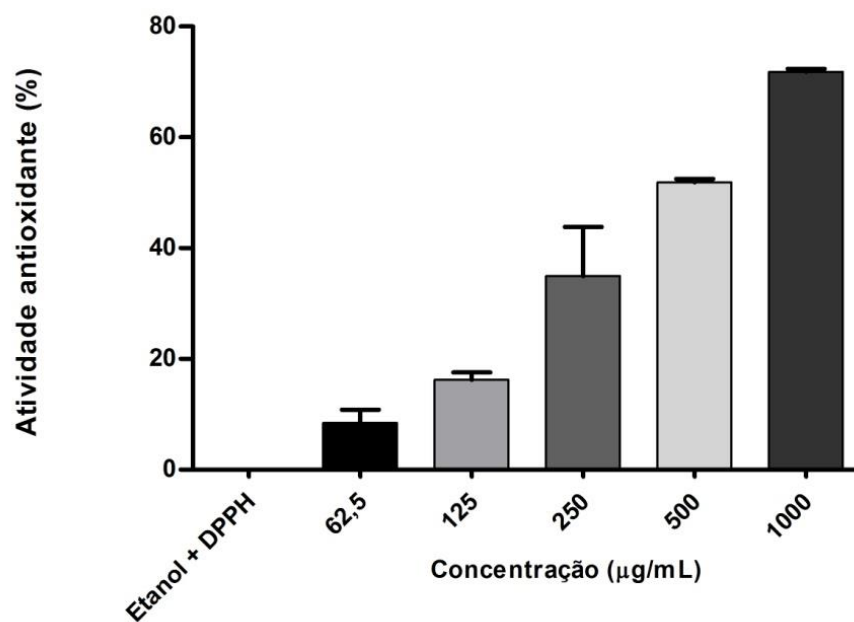
Figura 10. Histomorfometria dos diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos de camundongos. Sadio = Grupo sem lesão hepática; Lesão = Grupo com lesão hepática e tratado com salina 0,9% (10 ml/kg; v.o.); Lesão + silimarina = Grupo com lesão hepática e tratado com Silimarina (25 mg/kg; v.o.); Pré- 50e Pré-100 = Grupos tratado antes da indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente; Pós-50 e Pós-100 = Grupos tratado após a indução da lesão hepática com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o., respectivamente). Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão $**p < 0,001$, quando comparado o grupo silimarina com o grupo lesão. $***p < 0,001$, quando comparados os grupos tratados com EFIS com o grupo de animais sadios



5.5 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* do EFIS pelo método de varredura do radical livre DPPH

Os resultados do potencial antioxidante do EFIS (Figura 11) na concentração 1000 µg/mL apresentou 71,84% $\pm$ 0,90 de atividade antioxidante; na concentração 500 µg/mL, 51,89% $\pm$ 1,10; na concentração 250 µg/mL, 34,95% $\pm$ 8,90; na concentração 125 µg/mL 16,26% $\pm$ 1,30 e na concentração 62,5 µg/mL, 8,44% $\pm$ 2,40.

Figura 11. Avaliação da atividade antioxidante do EFIS em diferentes concentrações.



6 DISCUSSÃO

A lesão hepática induzida por drogas é um problema clínico importante (PIRMOHAMED et al., 2004). Ela surge através de mecanismos iniciados pelo dano químico às células do fígado, desencadeando respostas biológicas, que podem resultar em toxicidade (KAPLOWITZ, 2005). Apesar de importantes progressos na investigação das patogêneses do fígado, os tratamentos ainda são insatisfatórios (ARTEEL, 2003). As formulações fitoquímicas e extratos preparados a partir de plantas medicinais populares com propriedades hepatoprotetoras, surgem como alternativa no tratamento de doenças hepáticas (WILLIAMS et al., 2002).

Atualmente, um dos modelos utilizados para provocar lesão hepática em roedores e verificar a atividade hepatoprotetora de extratos e compostos é o modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol (PCM) (KUMAR, 2004; AHMED, 2011). A overdose aguda de PCM, além de danos ao tecido hepático e aumento do nível das enzimas indicadoras de lesão, pode levar a insuficiência do órgão, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e morte celular necrótica (KUMAR, 2004).

Os flavonóides são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável, portanto, de considerável interesse científico e terapêutico. Compõem uma ampla classe de compostos polifenólicos, cuja síntese não ocorre na espécie humana. (GEORGIEV et al., 2014). São considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, e encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos. Nas plantas tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (LOPES et al., 2010).

Dentre os flavonóides com ação medicinal estão os flavonóis, com ênfase nas quercetinas e o caempferol, nas concentrações de 0,1; 1,0; 3,0 e 100,0 μM , em tratamento

agudo. Estes dois compostos, em ação conjunta, demonstram ter grande potencial anti-inflamatório (RIBEIRO et al., 2006).

A classe de flavonóis, de maneira geral, exerce efeito hepatoprotetor ao fígado, protegendo-o contra a falência induzida por isquemia-reperfusão, nas concentrações de 125,0; 250,0 e 500 mg/mL em tratamento por 7 dias (DONG et al., 2013; WANG et al., 2013). Em relação aos isoflavonóides, estudos demonstraram que, nas doses de 1 a 10 µM estes compostos são grandes doadores de elétrons por apresentarem estruturas químicas conjugadas em anel β, ricas em grupos hidroxilas, que tem grande ação antioxidante por reagirem e inativarem ânions superóxido (YANG et al., 2013).

Estudos fitoquímicos utilizando o extrato de folhas de *Indigofera suffruticosa* mostraram que esta espécie apresenta flavonóides em sua composição (LEITE et al., 2003). Estes compostos tem o potencial de proteger o colesterol-LDL da oxidação (inibindo formação de placa aterosclerótica) e de regenerar antioxidantes primários, como a vitamina C, no organismo (LOPES et al., 2010). Desta forma é possível sugerir que o EFIS por ter flavonóides em sua composição atue estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo

Nossos resultados demonstraram, em relação aos marcadores da função hepática (ALT, AST e ALP), uma acentuada capacidade de proteção e prevenção devido ao pré ou pós tratamentos com EFIS (50 e 100 mg/kg; v.o.) apresentar uma redução significativa dos níveis dessas enzimas.

O efeito hepatoprotetor em modelos experimentais tem sido evidenciado pela diminuição dos níveis séricos das enzimas ALT, AST e ALP. Em estudo semelhante, Tsai, Ming-Shiun e colaboradores (2018), mostrou que o pré-tratamento utilizando o extrato com Kaempferol (125mg / kg) antes da injeção de propacetamol (agente indutor de lesão hepática derivado do paracetamol) diminuiu significativamente os níveis de ALT e AST. O

kaempferol é um flavonóide utilizado na medicina chinesa e encontrado em muitos medicamentos fitoterápicos. Tsai, Ming-Shiun et al (2018) sugere que este flavonóide protege o fígado contra lesões induzidas pelo paracetamol através de propriedades anti-oxidativas.

Bhattacharjee et al (2007) buscando avaliar o efeito protetor do isolado protéico de *Phyllanthus niruri* L. (*P. niruri*) com indução de dano ao fígado através de tetracloreto de carbono de CCl₄, mostrou aumento do nível sérico de ALP no soro de camundongos. O tratamento com o isolado protéico de *P. niruri* alterou significativamente os níveis de ALP para quase normal. Os resultados sugerem que a proteína isolada de *P. niruri* protege o tecido hepático contra o dano oxidativo e de alguma forma ajuda a estimular o mecanismo de reparo presente neste tecido, podendo ser usado como um hepatoprotetor eficaz contra o dano hepático induzido por CCl₄.

A redução dos níveis de bilirrubina total, colesterol, ALT, AST e fosfatase alcalina também foram observados em outros experimentos utilizando-se extratos de plantas como o da *Caralluma umbellata*, uma erva perene e suculenta. Os autores concluíram que o extrato apresenta atividade hepatoprotetora por restaurar os níveis das enzimas séricas e prevenir o estresse oxidativo. (SHANMUGAM et al., 2013). Similarmente aos dados descritos acima, a *Melia azedarach* L., conhecida como cinamomo, utilizada para o tratamento da hanseníase e processos inflamatórios, foi objeto de estudo de Ahmed e colaboradores (2011). O extrato metanólico de *Melia azedarach* (500 mg/ kg v.o) administrado em ratos durante sete dias, seguida da administração de paracetamol no 5º dia apresentou atividade hepatoprotetora, reduzindo os níveis de AST, ALT e fosfatase alcalina.

Um dos vários tipos de danos causados ao fígado é o aumento do estresse oxidativo e/ou redução das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (LOGUERCIO; FEDERICO, 2003). O organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes: o enzimático e o não enzimático. Faz parte do sistema enzimático, as enzimas: SOD e CAT. A SOD é a primeira

defesa que protege as células contra as ERO (espécies reativas de oxigênio) e seus derivados. Ela é responsável por transformar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A segunda enzima do sistema antioxidante é a catalase (CAT), ela é responsável por converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. (BARREIROS et al., 2006). Portanto, o sistema antioxidante é crítico para a desintoxicação de radicais livres. A superóxido dismutase (SOD) reduz a concentração de radicais superóxido altamente reativos, enquanto a catalase (CAT) protege os tecidos dos radicais hidroxila também extremamente reativos (YANG et al., 2008).

Os resultados deste estudo evidenciam que o pré ou pós-tratamento com EFIS preveniu uma redução das defesas antioxidantes SOD e CAT pelo PCM, protegendo o fígado contra injúrias oxidativas. Esse estudo também indica um maior potencial curativo para o grupo com lesão e pós- tratado com EFIS (100 mg/kg; v.o.) Pode ser considerado uma alternativa terapêutica a silimarina. A redução da atividade da SOD causada por intoxicação por PCM é citada por vários autores (SHANMUGAM et al., 2013). Esses autores demonstram que a utilização desses extratos após a administração de PCM em camundongos albinos *Swiss* foi capaz de aliviar a redução das enzimas SOD e CAT, devido ao sequestro de radicais livres pelos extratos.

Estudo utilizando apigenina (100-200 mg / kg v.o) com o objetivo de analisar o seu efeito protetor na lesão de fígado de camundongo induzida por D-galactosamina (D-GalN) / lipopolissacarídeo (LPS), verificou um aumento nas atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase, que foi refletido na gravidade da lesão hepática (ZHOU RJ et al., 2017)

No estudo utilizando ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) (6, 12 ou 25 mg / kg v.o). Após a última administração de 4-HPA, uma dose única de PCM via intraperitoneal foi aplicada nos animais. O uso desse agente hepatotóxico causou um aumento de marcadores de estresse oxidativo SOD e CAT, mas o pré-tratamento com 4-HPA impediu os efeitos tóxicos de maneira dose-dependente (ZHAO, HONGQIONG et al., 2018).

Estudo recente utilizando camundongos, mostrou que o pré-tratamento utilizando o extrato com Kaempferol (125mg / kg) recuperou a atividade das enzimas antioxidantes do fígado (SOD e CAT), sugerindo que o pré-tratamento com kaempferol protege contra a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol, reduzindo o estresse oxidativo. (TSAI, MING-SHIUN et al., 2018).

O fígado é um órgão de suma importância e desempenha um papel significativo no metabolismo e desintoxicação de toxinas exógenas e agentes terapêuticos (RAM, 2001 e SETTY et al., 2007). Grande parte do arsenal terapêutico utilizado no tratamento do câncer tem impacto significativo no trato gastrointestinal. A observação histológica é uma ferramenta importante para a detecção de alterações morfológicas no fígado causadas por compostos bioativos. As plantas pertencentes à família Fabaceae possuem propriedades medicinais, especialmente a planta *I. suffruticosa*. De acordo com os resultados encontrados por Vieira et al. (2007) extratos de folhas de *I. suffruticosa* foram utilizados no Sarcoma 180 em camundongos na dose de 50 mg / kg i.p. e mostrou uma atividade redutora de tumor. A partir dos dados desse estudo, foi realizada observação histológica, que mostrou que não houve alteração estrutural no tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180 após tratamento com extrato de folhas de *I. suffruticosa* obtido por infusão e maceração. Resultados similares estudados por SILVA et al., (2014) e LIMA et al., (2014) demonstraram que os extratos de folhas de *I. suffruticosa* preservaram as arquiteturas hepáticas. Sendo assim, o resultado deste estudo mostrou que o grau de lesão hepática nos animais que receberam overdose de paracetamol e submetidos ao pré ou pós-tratamento com EFIS foi visivelmente reduzido, mostrou uma restauração da fisiologia normal dos níveis séricos dessas enzimas hepáticas. Esses dados podem ser confirmados na observação histopatológica do tecido hepático. Os resultados da observação histológica deste estudo, sugerem que os grupo pré e pós tratados com EFIS (50 ou 100 mg/Kg; v.o.) apresentaram melhor resposta

com uma possível ação angiogênica, quando comparados ao grupo com lesão hepática/silimarina. O EFIS revelou atuar de forma preventiva e curativa na toxicidade causada pelo PCM, apresentando melhores resultados em relação ao tratamento convencional com a silimarina. O resultado relevante deste estudo foi encontrado nas observações histológicas das unidades estruturais das células que apresentaram constituintes; (citoplasma, nucleos e nucléolos) do tecido epitelial dos hepatócitos dos grupos EFIS de forma semelhantes ao grupo sadio. No grupo com lesão/salina, foram observadas áreas de infiltração de leucócitos, congestão e dilatação dos sinusóides hepáticos. De acordo com relatos encontrados na literateratura a fração de alcalóides bis-indolica do indican e o extrato de folha da espécie em questão é detentora da preservação da arquitetura do tecido epitelial do fígado. LIMA et al (2014), demosntrou que o a fração alcaloide bis-indolica indican de folhas de *I. suffruticosa* reduziu o tumor solido de camundongos, mostrando que não houve alterações no epitélio hepático. Posteriormente Silva et al., 2014 investigou a histopatologia e histomorfometria do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180 submetido ao tratamento com extrato de folhas *I. suffruticosa* obtido por infusao e maceração demosntrando ausencia de infiltrações leucocitária do tecido epitelial hepático, mostrando ainda que a área e perímetro dos núcleos e diâmetro dos capilares sinusóides hepáticos apresentam estruturas bem preservadas, sugerindo um agente alternativo hepatoprotetor. A atividade curativa e protetora da planta pode ser atribuída ao elevado teor de compostos fenólicos e flavonóides (LEITE et al., 2006) e a fração de alcaloides bis-indolicos indican foi identificada, isolada e purificada por Vieira et al., 2011. Os Indigóides pertencem à classe de alcaloides bis-indólicos, são pigmentos presentes em plantas do gênero Indigofera. O Indican é precursor dos pigmentos indigóides (índigo e indirubina) sendo, portanto, material de partida da biossíntese desses metabólitos (MAUGARD, et al., 2001). O Indican sofre hidrólise através da ação da enzima β -glicosidase, originando Indoxil (SANDOVAL et al.,

2010). A oxidação do indoxil, originando as moléculas de índigo e indirubina, ocorre espontaneamente. Essas moléculas são insolúveis em água e apresentam atividades biológicas (SANDOVAL et al., 2010). Esses dados podem estar correlacionados com atividade do EFIS de forma preventiva e curativa na toxicidade causada pelo PCM. Corroborando com esses resultados, o extrato de folhas da *I. suffruticosa* apresentam atividades: antiinflamatória (LEITE et al., 2003), embriotóxica (LEITE et al., 2004), antimicrobiana (LEITE et al., 2006) e terapia alternativa anticâncer e antitumoral (VIEIRA et al., 2007), enquanto a fração alcaloide bis-indólica Indican apresentou atividade hepatoprotetora (SILVA et al 2014)

Os resultados da análise histomorfométrica mostraram um alargamento do diâmetro dos sinusóides hepáticos e aumento do núcleo das células (diâmetro e perímetro) no grupo de animais com lesão, uma característica de displasia e anaplasia (SHANMUGAM et al., 2013). Enquanto que os grupo tratados com EFIS foram semelhantes ao grupo silimarina, sugerindo que EFIS preserva a arquitetura do tecido hepático. Esses dados estão de acordo com análises histológicas e morfométricas de experimentos realizados por Lima et al. (2014) que mostrou a ausência de alteração estrutural no epitélio hepático e diâmetro dos sinusóides de camundongos portadores de sarcoma 180 após tratamento com Indican isolado de folhas de *I. suffruticosa*, porém alterações significativas foram observadas no grupo controle com sarcoma 180.

A porcentagem de atividade antioxidante também pode ser proporcional à quantidade de DPPH consumida pela amostra (RENUKADEVI e SULTANA, 2011). Desta forma, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua absorbância e maior a sua atividade antioxidante. A atividade antioxidante do extrato etanólico de EFIS na concentração 1000 µg/mL e 500 µg/mL mostrou presença de substâncias capazes de doar elétrons e assim reduzir radicais livres. O EFIS têm grande potencial antioxidante diretamente relacionado com o aumento da dose. Esses resultados são semelhantes aos

encontrados por Renukadevi e Sultana (2011) referente aos extratos metanólicos *Indigofera tinctoria*, que mostrou atividade antioxidante significativa nas concentrações testadas.

Estudos futuros com o extrato (EFIS) utilizado neste trabalho, bem como dos flavonóides presentes em sua composição devem ser realizados. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o EFIS apresenta potencial hepatoprotetor, curativo e atividade antioxidante.

7 CONCLUSÃO

- O pré ou pós-tratamento com EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.) antes da administração de overdose de paracetamol, diminuiu significativamente as concentrações séricas das enzimas aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) aumentadas pelo paracetamol.
- O grau de lesão hepática nos animais que receberam overdose de paracetamol e submetidos ao pré ou pós-tratamento com EFIS foi visivelmente reduzido. A arquitetura tecidual do fígado desses animais foi comparável àquela dos animais saudáveis (veia centrolobular sem alterações, cordões hepáticos muito bem arranjados e capilares sinusóides sem distensão). A análise histomorfométrica dos animais tratados com EFIS também não revelou nenhuma alteração na área e perímetro dos hepatócitos ou no diâmetro dos sinusóides.
- O pré tratamento ou pós tratamento com EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.) restaurou as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e de grupamentos tióis, todos significativamente reduzidos nos animais com lesão hepática induzida pelo paracetamol.
- Através do método de captura do radical livre DPPH, o EFIS (125,250,500, 1000 µg/ mL) apresentou uma atividade antioxidante concentração dependente, apresentando-se como um bom limpador de radicais livres na concentração de 1000 µg/ mL (71,84%).

- Administrados de acordo com o esquema de preventivo (pré-tratamento) ou curativo (pós-tratamento), o EFIS (50 ou 100 mg/kg; v.o.) exerceu efeito hepatoprotetor e curativo da hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos Swiss. Dessa forma, pode-se apresentar como uma alternativa de uso clínico para a prevenção ou intervenção da hepatotoxicidade induzida por overdose de paracetamol.
- É provável que a atenuação do estresse oxidativo, principal causa da hepatotoxicidade induzida por paracetamol, seja um dos mecanismos envolvidos nos efeitos hepatoprotetor e hepatocurativo do EFIS e, esteja associado à presença de compostos com atividade antioxidante (flavonóides), já detectados em *I. suffruticosa*. Novas investigações são necessárias para caracterizar esse(s) composto(s) presente no EFIS e elucidar seu possível mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

ACHLIYA, G. S.; WADODKAR, S. G.; DORLE, A. K. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi Ghrita against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 90, n. 2-3, p. 229-32, Feb 2004.

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods of Enzimology**, v.105; p.121-127:1984.

AHMED, M. F.; RAO, A. S.; THAYYLL, H.; AHEMAD, S. R. Role of Melia azedarach leaf extract in Paracetamol Induced Hepatic damage in rats. **Pharmacognosy Journal**, v.3, n.21, p.60-64, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semiarid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n.1, p. 325-354, 2007

ARTEEL, G. E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. **Gastroenterology**, v. 124, n. 3, p. 778-90. ISSN 0016-5085. Mar 2003.

BALL, K. R.; KOWDLEY, K. V. A review of Silybum marianum (milk thistle) as a treatment for alcoholic liver disease. **J Clin Gastroenterol**, v. 39, n. 6, p. 520-8, Jul 2005. ISSN 0192-0790.

BELANGER, M.; BUTTERWORTH, R. F. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. **Metabolic Brain Disease**, New York, v. 20, n. 4, p. 409- 423, 2005.

BIEDERMANN, D.; VAVŘÍKOVÁ, E.; CVAK, L.; KŘEN, V. Chemistry of silybin. **Nat. Prod. Rep.**, 31, 1138–1157. 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.

BHATTACHARJEE R, SIL PC. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties. **Food Chem Toxicol** 45:817–826. 2007.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

CADENAS, E.; SIES, H. The lag phase. **Free Radical Research**, v.28, n.6, p.601-609, 1998.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979. ISSN 0031-9333.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 6, p. 749-62, Mar 2010. ISSN 1873-4596.

CORMACK, D.H. Fundamentos de Histologia 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003, p.371.

DAVID, P.; ALEXANDRE, E.; CHENARD-NEU, M.; WOLF, P.; JAECH, D.; RICHERT, L. 2002 Failure of liver cirrhosis induction by thiocetamide in Nagase analbuminaemic rats. **Laboratory Animals**, 36 (2): 158-164.

DHIMAN, R. K.; CHAWLA, Y. K. Herbal medicines for liver diseases. **Dig Dis Sci**, v. 50, n. 10, p. 1807-12, Oct 2005. ISSN 0163-2116.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v.101, p. 33-39, 2000.

DONG, D. et al. Naringin prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Journal of Functional Foods**, v.12, p. 179-191, 2015.

DONG, D. et al. Protective effects of the total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 62, p. 120-30, Dec 2013. ISSN 1873-6351.

FERNANDES, A. Noções de toxicologia e plantas tóxicas. 2ª ed. Fortaleza: BNB, 80p., Monografia, 1987.

FLORA, K. et al. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n. 2, p. 139-43, Feb 1998. ISSN 0002-9270.

FRASCHINI, F.; DEMARTINI, G.; ESPOSTI, D. Pharmacology of silymarin. **Clinical Drug Investigation**, v. 22, n. 1, p. 51-65, 2002.

GAMBERINI, M. T. et al. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86 Suppl 2, p. 137-9, 1991.

GEORGIEV V., ANANGA A., TSOLOVA V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**. 2014;6(1):391-415.

GONZÁLEZ, A. et al. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 39, n. 3, p. 217-20, Aug 1993. ISSN 0378-8741.

GONZALEZ F.H.D, SILVA S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. c. 8, p. 318-337, 2006.

GU, X.; MANAUTOU, J. E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert Rev Mol Med**, v. 14, p. e4, Feb 2012. ISSN 1462-3994.

HACKETT, E.S.; TWEDT, D.C.; GUSTAFSON, D.L. Milk thistle and its derivative compounds: A review of opportunities for treatment of liver disease. **J. Vet. Intern. Med**, 27, 10–16. 2013

HASTINGS, R. B. Medicinal Legumes of Mexico: Fabaceae, Papilonoideae, Part One. **Economic Botany**, v. 44, n.3, p. 336-348.1990.

HEUBI, J. E.; BARBACCI, M. B.; ZIMMERMAN, H. J. Therapeutic misadventures with acetaminophen: hepatotoxicity after multiple doses in children. **J Pediatr**, v. 132, n. 1, p. 22-7, Jan 1998. ISSN 0022-3476.

HSU, Y. W. et al. Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 9, p. 2281-8, Sep 2009. ISSN 1873-6351.

ILAVARASAN, R. et al. Antioxidant activity of *Thespesia populnea* bark extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 87, n. 2-3, p. 227-30, Aug 2003. ISSN 0378-8741.

IFCC; Reference Procedure for Measurement of Catalytic Concentration of Aspartate Aminotransferase. **Clin Chem Lab Med**, 40 (7): 725-33, 2002.

IFCC; Reference Procedure for Measurement of Catalytic Concentration of Alanine Aminotransferase. **Clin Chem Lab Med**, 40 (7): 718-24, 2002.

JACOBS, B. P. et al. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. **Am J Med**, v. 113, n. 6, p. 506-15, Oct 2002. ISSN 0002-9343.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. **Drug Metab Rev**, v. 44, n. 1, p. 88-106, Feb 2012. ISSN 1097-9883.

JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. **J Hepatol**, v. 55, n. 1, p. 227-8, Jul 2011. ISSN 1600-0641.

JAVED, S.; KOHLI, K.; ALI, M. Reassessing bioavailability of silymarin. **Altern Med Rev**, v. 16, n. 3, p. 239-49, Sep 2011. ISSN 1089-5159

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-79, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 1523-0864.

JUNIOR, J. B. S.; DUTRA, R.; FRITZEN, M. Estudo do uso do paracetamol realizado em uma farmácia comercial. Santa Catarina. Revista Eletrônica **Estácio Saúde**. V. 2, N. 2, P. 14 – 21, 2013.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 6, p. 489-99, Jun 2005. ISSN 1474-1776.

KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. Cap. Fármacos anti-inflamatórios não-esteroides, fármacos antirreumáticos modificadores de doença, analgésicos não-opiídeos e fármacos usados no tratamento da gota. In: FURTS, D. E.; ULRICH, R. W.; São Paulo – SP. AMGH editora. P. 515 – 538. 2010.

KING, J. Enzimologia Clínica Practica. Editorial Acribia: Zaragoza – Espanha. 1968.

KUMAR, G. et al. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. **J Ethnopharmacol**, v. 92, n. 1, p. 37-40, May 2004. ISSN 0378-8741.

LARSON, A. M. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. **Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 1364-72, Dec 2005. ISSN 0270-9139.

LEITE, S.P. *Indigofera suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas. Tese (Doutorado em produtos naturais). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2003.

LEITE, S.P et al “Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves,” **Reproductive Toxicology**, vol. 18, no. 5, pp. 701–705. 2004.

LEITE, S. P. et al. Antimicrobial Activity of *Indigofera suffruticosa*. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 3, n. 2, p. 261-5, Jun 2006. ISSN 1741-427X.

LEMOS, A. H. Controle e prevenção de doenças pela medicina natural e ortomolecular. São Paulo: Atheneu, 2006. 331p.

LIMA, I. R. et al. Indican from Añil (*Indigofera suffruticosa* Miller) as an herbal protective agent to the liver. **Anal Quant Cytopathol Histopathol**, v. 36, n. 1, p. 41-5, Feb 2014. ISSN 0884-6812.

LITOVITZ, T. L. et al. 1999 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. **Am J Emerg Med**, v. 18, n. 5, p. 517-74, Sep 2000.

LOGUERCIO, C; A. FEDERICO. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology and Medicine** 34 (1):1-10. 2003.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do paracetamol (Acetaminofem). **Revista Brasileira de Farmácia**. V. 93, N. 4, P. 411–414, 2012.

LOPES R.M., OLIVEIRA T.D., NAGEM T.J., PINTO A.D.S. Flavonoides. **Biotechnologia Ciencia & Desenvolvimento**. 2010;3(14).

LUO, J. et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a potential risk factor of cardiovascular disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, n. 3, p. 193-9, Mar 2015. ISSN 1473-5687.

LUPER, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. **Altern Med Rev**, v. 3, n. 6, p. 410-21, Dec 1998. ISSN 1089-5159.

MADDREY, W. C. Drug-induced hepatotoxicity. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, p. S83-S89, 2005.

MARQUES, T. R. Aproveitamento tecnológico de resíduo de acerola: farinhas e barras de cereais. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

MARTINS E.R, CASTRO D.M, CASTELLANI D.C, DIAS J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV. 2000

MATOS, L. C; MARTINS, B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. **Medicina Interna**, v. 12, n 4, 2005.

MAUGARD, T.; ENAUD, E.; CHOISY, P.; LEGOY, M. D. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). **Phytochemistry**, v. 58, p. 897-904. 2001.

MEIRA, C.; SILVA, R. C.; MOYANO, M.; MORAIS, N.; LAGUNA, P.; NERY, F.; PINTO, A. Paracetamol: para além da toxicidade hepática. **Associação Cuidados Intermédios Médicos**. V. 2, P. 26-31, 2013.

MINCIS M. Hepatite alcoólica. In: MATTOS AA, DANTAS- CORREA EB. Editores. Tratado de Hepatologia. Rio de Janeiro, Editora Rubio Ltda. 2010;357-369

MURIEL, P.; RIVERA-ESPINOZA, Y. Beneficial drugs for liver diseases. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 93-103, Mar 2008. ISSN 0260-437X.

MURPHY, J. M.; CABAN, M.; KEMPER, K. J. Milk Thistle (*Silybum marianum*). The Longwood Herbal Task Force. **The Center for Holistic Pediatric Education and Research**. 25 p., 2000.

NEMETH, E. et al. Hecpudin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090-3, Dec 2004. ISSN 1095-9203. .
Colider – MT. FACIDER Revista Científica

NEWSOME, P. N.; PLEVRIS, J. N.; NELSON, L. J.; HAYES, P. C. Animal models of fulminant hepatic failure: A critical evaluation. Liver Transplantation, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 21-31, 2000.

OLALEYE, M. T. et al. Protective effects of *Parinari curatellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. **Saudi J Biol Sci**, v. 21, n. 5, p. 486-92, Nov 2014. ISSN 1319-562X.

OLIVEIRA, R. K. F. ; LEITE, S. P. . Estudo Toxicológico do Indican de folhas de Indigofera suffruticosa Mill (FABACEAE).. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica, 2016, Recife. XXIII CONIC, 2016.

PANIZZA S., ROCHA A. B., GECCHI R., SILVA R. A. P., **Rev. Ciênc. Farmac.**, 10, 101—106 (1998).

PARK K, WILLIAMS DP, NAISBITT DJ, KITTERINGHAM NR, PIRMOHAMED M. Investigation of toxic metabolites during drug development, **Toxicol Appl Pharmacol**; 207: pp.425-434. 2005.

PASTORI, D. et al. The efficacy and safety of statins for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Dig Liver Dis**, v. 47, n. 1, p. 4-11, Jan 2015. ISSN 1878-3562.

PESSAYRE D,LARREY D. Acute and chronic drug-induced hepatitis. **Bailieres Clin Gastroenterol**; 2: 385-422. 1998.

PINTO, N. Q. O.; SILVA, G. A.; SANTOS, E. C. G.; BRITO, N. J. N. Atuação do profissional farmacêutico frente ao uso indiscriminado de Paracetamol como medicamento de venda livre. V. 7, P. 1 – 20, 2015.

PIRMOHAMED M, JAMES S, MEAKIN S, GREEN C, ET AL. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: propective analysis of 18 820 patients. **BMJ**; 329: 15-19. 2004

RAJESH, M. G.; LATHA, M. S. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. **J Ethnopharmacol**, v. 91, n. 1, p. 99-104, Mar 2004. ISSN 0378-8741.

RAM,V.J. Herbal preparation as a sorce of hepatoprotective agents. **Drug News Perspect.**,14(6): 353-63, 2001.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A.; DOLAK, J. A.; WALLER, R. L. Mechanisms of Carbon Tetrachloride Toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 43, p. 139-154, 1989.

RENUKADEVI, K.P; S.S. SULTANA. Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung câncer cell line NCI- h69. **Int. J. Pharmacol.**, 7 : 356- 362. 2011

RIBEIRO, I. M. S., SILVA, M. A., RANGEL, J. H. A. R. Levantamento Botânico de Leguminosas Forrageiras Nativas da Bacia Leiteira do Estado de Alagoas. Maceió, **EPEAL**, 5p., 1984.

RIBEIRO J.N., OLIVEIRA T.T.D., NAGEM T.J., FERREIRA JUNIOR D.B., PINTO A.D.S. Avaliacao dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. **RBAC**. 2006;38(1): 23-27.

RIET-COREA, F. Comunicação pessoal (Lab. Diagnósticos UFPel, Pelotas, RS). Roig Y Mesa, J. T. Plantas Medicinales aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana, 1974. **Editorial Ciência y Técnica**, 163-5, 2000.

SABIR, S.M.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 226-232, 2008.

SHAILAJAN, S. et al. Effect of *Asteracantha longifolia* Nees. against CCl₄ induced liver dysfunction in rat. **Indian J Exp Biol**, v. 43, n. 1, p. 68-75, Jan 2005. ISSN 0019-5189.

SHANMUGAM, G.; AYYAVU, M.; RAO, D. M.; DEVARAJAN, T.; SUBRAMANIAM, G. Hepatoprotective effect of *Caralluma umbellata* against acetaminophen induced oxidative stress and liver damage in rat. **Journal of Pharmacy Research**, v.6, p.342-345, 2013.

SANDOVAL, F.S.; MÉNDEZ, C.C.; CARDADOR, A.M. Preliminary study of the Indican production in tissue cultures os *Indigofera suffruticosa* MILL. **e-Gnosis**, v.8, p. 1-7, 2010.

SETTY SR, QUERESHI AA, SWAMY AHMV, PATIL T, PRAKASH T, PRABHU K, GOUDA AV: hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic onjury in rats. **Fitoterapia** 2007; 78:451-454.

SILVA, I. B.; LIMA, I. R. ; SANTANA, M.A.N. ; LEITE, R. M. P. ; LEITE, S. P. . *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae): Hepatic Responses in Mice Bearing Sarcoma 180. **International Journal of Morphology** (Online), v. 32, p. 1228-1233, 2014.

TAJIRI K, SHIMIZU Y. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. **World J Gastroenterol**, 14(44): 6774–6785, 2008.

TIMBRELL, J.A. November 18, by CRC Press Reference - 464 Pages - 232 B/W ISBN 9780849373022. 2008

TÚNEZ, I.; MUÑOZ, M. C.; VILLAVIVENCIO, M. A.; MEDINA, F. J.; PRADO, E. P.; ESPEJO, I.; BARCOS, M.; SALCEDO, M.; FEIJÓO, M.; MONTILLA, P. 2005. Hepato-and neurotoxicity induced by thiocetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmaceutical Research**, 52 (3): 223-228.

TSAI, MING-SHIUN, YING-HAN WANG, YAN-YUN LAI, HSI-KAI TSOU, GAN-GUANG LIOU, JIUNN-LIANG KO, SUE-HONG WANG. “Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice.” **Toxicology letters** 290 (2018): 97-109.

VIEIRA, J. R. et al. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, n. 3, p. 355-9, Sep 2007. ISSN 1741-427X.

VIEIRA, J.R.C. Investigação farmacognóstica e biológica de folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill sobre *Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

WILLIAMS, R. Global challenges in liver disease. **Hepatology**, 44(3):521-6, 2006

WILLIAMS D.P, Kitterinham N.R, Naisbitt D.J, Pirmohamed M et al. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Curr Drug Metab**; 3: 351-366. 2002.

YANG G.M., YAN R., WANG Z.X., ZHANG F.F., PAN Y., CAI B.C. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Chin J Nat Med.** 2013;11(5):519-24.

ZHAO, HONGQIONG, ZHIHUI JIANG, XUEMEI CHANG, HUITING XUE, WUMAIERJIANG YAHEFU, XIAOYING ZHANG “4 HYDROXYPHENYLACETIC ACID PREVENTS Acute APAP-Induced Liver Injury by Increasing Phase II and Antioxidant Enzymes in Mice.” **Frontiers in Pharmacology** 9 (2018): 653. *PMC*. Web. 3 Sept. 2018.

ZHOU RJ, YE H, WANG F, WANG JL, XIE ML. Apigenin inhibits d-galactosamine/LPS-induced liver injury through upregulation of hepatic Nrf-2 and PPAR γ expressions in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 2017 Nov 4;493(1):625-630

APÊNDICES

APÊNDICE A

Hepatoprotective efficacy of methanolic extract of *Indigofera suffruticosa* (Mill) on paracetamol–induced liver damage in mice

Izabela Rangel-Lima, * Ivanise Brito-Silva,* Roberta M Leite-Lima,* Tainá M Santos-Silva,* Mardonny Bruno Oliveira-Chagas, Ivone A Souza,^c Maria B Sousa-Maia, § Sônia Pereira-Leite.*

*Department of Embryology of Histology, Histomorphometry Laboratory, Federal University of Pernambuco, Brazil,

†Immunomodulation Laboratory and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco, Brazil.

‡ Department of Antibiotics, Experimental Cancerology Laboratory Federal University of Pernambuco, Brazil

§ Department of Physiology and Pharmacology Bioactive Products Laboratory Federal University of Pernambuco, Brazil

Corresponding author: Professor Dra. Sônia Pereira Leite:

Endereço Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife- Brasil - University of Pernambuco, Brazil, e- mail spleite6@hotmail.com

Abstract

Introduction and aim: *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) is abundant in northeastern Brazil and popularly used in the treatment of infectious and inflammatory processes. Several biological properties, such as anti-inflammatory, anticancer, antitumor, hepatoprotective and low toxicity, are reported for this plant. This study investigated hepatoprotective activity and the antioxidant effect of methanolic extract of *I. suffruticosa* (IS) leaves on Swiss albino mice submitted to experimental models of acetaminophen-induced liver injury. **Materials and methods;** The IS extract at 50 mg/kg (orally) was standardized according to the LD50 and its hepatoprotective property on Swiss albino mice evaluated during a 7-day period. On the eighth day, the acetaminophen-induced hepatic injury was performed. Histomorphometric analysis of liver tissue, antioxidant activity and blood enzyme levels of alanine aminotransferase (AST), aspartate aminotransferase (ALT) and bilirubin were measured. **Results:** The IS extract restored serum enzyme levels and results were close to those of positive control (silymarin) when compared to the negative control. Histopathological and histomorphometric analyzes confirmed IS extract hepatoprotective activity, showing reorganization of structural units of cells, nuclei and sinusoidal capillaries of hepatocytes, reducing the damage on liver tissue and increasing organ regeneration rate. The IS extract showed high antioxidant potential at 1000 and 500 µg/mL concentrations. **Conclusions:** This study suggests that *I. suffruticosa* has hepatoprotective activity and high antioxidant potential

Keywords: histomorphometric; histopathology; acetaminophen; antioxidant; models; liver

1. INTRODUCTION

The liver plays an important role in maintaining metabolic homeostasis and biotransformation of chemicals in the body.¹ Hepatic diseases are a worldwide health problem, and are triggered mainly by viruses, metabolic diseases or chemical compounds.²⁻⁴

The treatment of such diseases is carried out conventionally using synthetic pharmaceuticals, or, secondarily, by using isolated compounds or parts of medicinal plants used in popular medicine.^{5, 6}

However, there are still few drugs used to treat liver diseases with significant effects on humans.⁷ Thus, medicinal plants with hepatoprotective or curative activity used for the treatment of hepatic disorders become important subjects of studies to elucidate their

mechanism of action and characterize compounds that can be used for the development of new hepatoprotective drugs.⁸

Some experimental models are used to demonstrate the hepatoprotective action of certain plants, especially against paracetamol.⁹ Paracetamol may promote hepatocellular injury through three mechanisms, independently or in association. The first and most common mechanism is ingestion of doses higher than 10 g by adults and up to 150 mg/kg by children, popularly known as "overdose". The second mechanism is the cytochrome P450 (CYP) over activation, resulting from the use of enzyme-inducing drugs and chronic alcohol abuse. Finally, the third mechanism occurs with glucagon depletion in hepatocytes through alcohol intake or malnutrition.¹⁰ *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) is abundant in the northeastern Brazil, and has intense popular use for treatment of infections, inflammations and other processes, without reports of harmful side effects to humans. The phytochemical investigation of leaf extracts of *I. suffruticosa* revealed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, proteins, carbohydrate, triterpenes and indigo coumarin.^{11,13} Pharmacological studies showed aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* have anti-inflammatory, antimicrobial and embryotoxic properties, besides being used as alternative anticancer and antitumor therapy.¹²⁻¹⁶ The aqueous leaf extract of *I. suffruticosa* has been shown to inhibit egg hatching, larval ecdyse and to have detergent effects on oviposition of *Aedes aegypti* mosquitoes.¹⁷ Mice carrying sarcoma 180 had hepatic response to subchronic treatment with extract of *I. suffruticosa*.¹⁸ The phytochemical properties of two (2) compounds from *I. suffruticosa* leaves, indigo and indirubin, were identified, isolated and purified by Vieira et al.¹⁹ Later, the bis-indolic alkaloid fraction of leaves of *I. suffruticosa* was investigated and proved to be a phytotherapeutic agent of liver.²⁰ The plant has low toxicity, with 98% viability of larvae.²¹ The structural organization of the renal tubules and hepatocyte nuclei of mice were preserved after treatment with *I. suffruticosa*.^{21, 22}

Due to the anti-inflammatory, anticancer and antitumor properties, and because it is a liver protective agent with previously reported low toxicity, we hypothesize the plant can be used as a hepatoprotective phytotherapeutic agent.

This study investigated the effect of *I. suffruticosa* on the hepatoprotective activity as well as its antioxidant effect through an experimental model of paracetamol-induced hepatic lesion in Swiss albino mice.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Methanol, distilled water, 10% formalin, 0.9% normal saline solution, hematoxylin, eosin, silymarin and acetaminophen were supplied by Merck (Germany).

2.2. Plant material and extraction

Leaves of *I. suffruticosa* were collected in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil, in July 2014. The sample was certified by the biologist Marlene Barbosa from the Department of Botany at the Federal University of Pernambuco (UFPE) and it is deposited under the No. 43694 in the Herbarium of the Center for Biological Sciences –(UFPE). Leaves of *I. suffruticosa* (1.3 kg) were washed in running water, pulverized and extracted with methanol (MeOH) at room temperature for 48 hours. Then, the solvent was filtered and evaporated at 35°C under reduced pressure. The IS methanolic extract yielded 54.5 g

2.3. Experimental animals

Eighteen (18) healthy male Swiss albino mice, aged 40 days, weighing on average 35 to 45 g were acquired from the Aggeu Magalhães Research Center (Pernambuco, Brazil). Animals received water and feed. They were kept under standard environmental conditions of temperature, humidity 12:12 light-dark cycle. The Committee on Animal Research and Ethics of UFPE approved the experiments under opinion No. 500/12, process No. 23076.025195/2012-64 of 2012.

2.4. Experimental design and treatment arrangement

Swiss albino mice were randomly divided into 3 groups (G1, G2 and G3) containing 6 animals each. The control groups were G1 - negative with 15 ml/kg of oral saline solution (O), G2 - positive with Silymarin (25 mg/kg, orally) and G3 – pre-treated with methanolic extract of *I. suffruticosa* (IS) leaves (50 mg/kg, orally). The IS extract dose was based on LD50.¹⁴ All groups received 300 mg/kg oral acetaminophen on the eighth day after pretreatment. After 24 hours, they were euthanized for collection of blood and liver samples.

2.5. Levels of transaminases

Serum enzyme levels of groups G1, G2 and G3 of Swiss albino mice submitted to pretreatment with IS extract prior to paracetamol-induced hepatic injury were measured using alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin. The blood collection was through cardiac puncture 24 hours after paracetamol application. Blood samples were centrifuged (3,000 rpm for 15 min at 4°C) to separate serum, which was stored at -20°C for analysis of enzymatic dosages.

2.6. Histopathological and histomorphometric analysis of liver

The liver of control groups (G1 and G2) and treatment group (G3) were fixed in 2.5% formaldehyde and stained with hematoxylin and eosin (HE).²³ Thirty histological sections were analyzed through four random fields. The histological sections were digitized using a digital video camera (Leica DFC 280, Wentzler, Germany) coupled to a light microscope (Leica Microscopy & Systems GmbH, Wentzler, Germany) under 40x final magnification. Morphometric evaluation, the perimeter of hepatocyte nuclei and the diameter of sinusoidal capillaries were determined using the Scion Image software (Scion Corporation, New York, USA).

2.7. Antioxidant activity

The antioxidant test was performed by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) in a 96-well plate. IS extract solutions were prepared at the concentrations 1,000, 500, 250 and 125 µg/ml, and DPPH with absorbance between 0.6 and 0.7 at 517 nm. Samples were incubated at 1:1 (V/V) of DPPH for 40 minutes at 25°C, analyzed in a microplate reader at 517 nm and related to the negative control (DPPH and ethanol). The positive control was Ascorbic Acid. The ability to eliminate DPPH (% of antioxidant activity) was calculated using the following equation:

$$\text{Elimination DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

2.8. Statistical Analysis

The results for levels of transaminases, as well as histopathological and histomorphometric parameters of hepatocytes nuclei were expressed as mean ± SEM (standard error of the

mean) and analyzed by Kruskal-Wallis test at $p < 0.001$. The antioxidant activity was analyzed by Tukey test ($p \leq 0.05$) using the Assistat software - version 7.6 beta.

3. Results

3.1. Levels of transaminases

Table 1 shows the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin of Swiss albino mice treated with IS extract prior to paracetamol-induced hepatic injury (PCM). The animals of the group (G1) showed high levels of ALT (94.48 ± 6.89), AST (120.98 ± 13) and bilirubin (7.9 ± 3.5) compared to animals treated with silymarin (G2): ALT (31.36 ± 4.78), AST (36.65 ± 5.35) and bilirubin (1.4 ± 0.5), which reduced serum enzyme levels. Results of G2 were close to those treated with IS extract (G3): ALT (37.78 ± 4.56), AST (39.24 ± 5.78) and bilirubin (2.1 ± 1.2). The reduction in serum levels of these important markers related to liver integrity suggests a hepatoprotective activity of the IS extract against paracetamol-induced hepatic injury.

Table 1 - Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin in Swiss albino mice treated with IS extract prior to paracetamol-induced hepatic injury (PCM)

Group	Dose (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirubin (mg/L)	Results are expressed as mean $\pm$
G1	15 ml/kg	$94.48 \pm 6.89^{**}$	$120.98 \pm 13.67^{**}$	$7.9 \pm 3.5^{**}$	
G2	25 mg/kg	31.36 ± 4.78	36.65 ± 5.35	1.4 ± 0.5	
G3	50 mg / kg	$37.78 \pm 4.56^*$	$39.24 \pm 5.78^*$	$2.1 \pm 1.2^*$	

SEM; * statistically significant compared to animals treated with saline solution ($p < 0.05$); ** statistically significant for animals treated with silymarin and IS extract ($p < 0.05$).

3.2. Histopathological and histomorphometric analysis of liver

Hepatic tissue samples collected from each group on the eighth day were evaluated at 400x magnification. A photomicrograph of each group is shown in Figure 1. Histological analysis of hepatic tissue after pretreatment with oral 50 mg/kg of IS extract (G3) and the positive control (G2) receiving silymarin (25 mg/kg) prior to paracetamol-induced hepatic injury showed normal hepatic tissue. Lobular central vein (CV) radiating out of the vein, well-reorganized hepatocyte cords (HC) in the structural units of cells among which are the well-arranged sinusoidal capillaries (S), suggesting a possible angiogenic action compared to the negative saline control (G1). The G1 showed structural differences in the hepatic tissue whose

hepatocyte cords (HC) showed no organized cellular structural units, congested sinusoidal capillaries (S) and areas of necrosis with discrete leukocyte infiltration (LI).

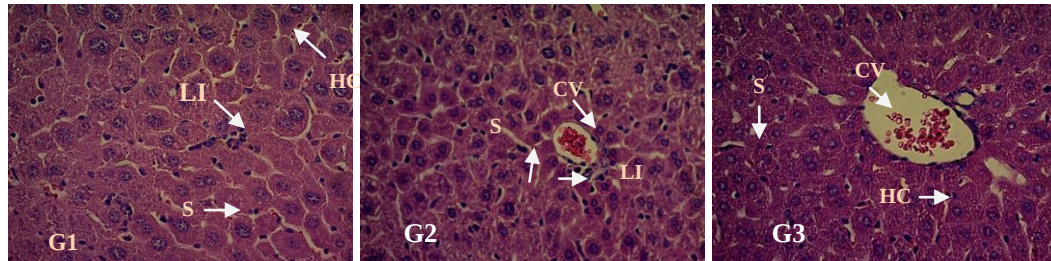


Fig. 1. Photomicrograph of Swiss albino mice hepatic tissue (Magnification 400x). **G1** = hepatic tissue/administered saline solution; **G2** = hepatic tissue/administered Silymarin; **G3** = hepatic tissue/administered IS extract. Formalin-fixed, HE - stained. Leukocyte Infiltration (LI), sinusoidal capillaries (S), central veins (CV), hepatocyte cords (CH).

3.2.1. Area and perimeter of hepatocyte nuclei.

The areas and perimeters of hepatocyte nuclei of the three groups were randomly compared and are shown in Figures 2 and 3. The areas and perimeters of G3 (0.106 ± 0.025 and 1.145 ± 0.140) showed no significant difference compared to those of G2 (0.094 ± 0.027 and 1.082 ± 0.150). However, the areas and perimeters of G1 (0.434 ± 0.127 and 1.650 ± 0.669) showed significant difference when compared to those of G2 (0.094 ± 0.027 and 1.082 ± 0.150) and G3 (0.106 ± 0.025 and 1.145 ± 0.140) ($P < 0.001$).

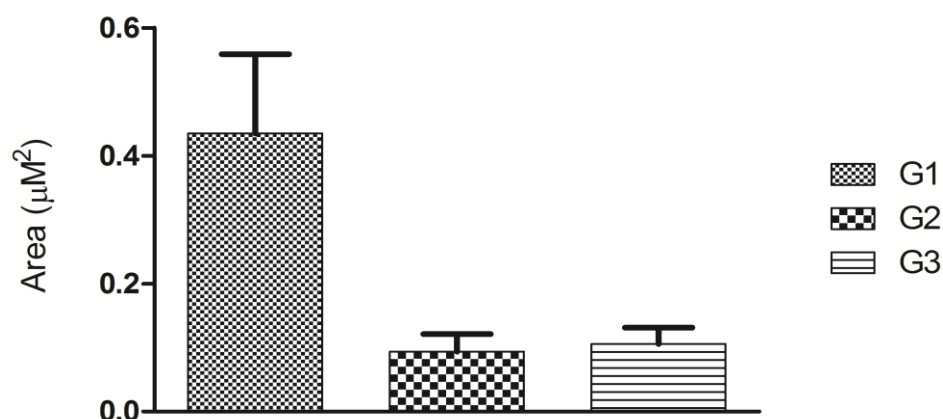


Fig. 2. Histomorphometry of hepatocyte nuclei of mice (area): **G1** = hepatic tissue/administered saline solution; **G2** = hepatic tissue/administered Silymarin; **G3** = hepatic tissue/administered IS extract. Data were subjected to analysis of variance using Tukey test ($P < 0.001$). N- 240 hepatocyte nuclei

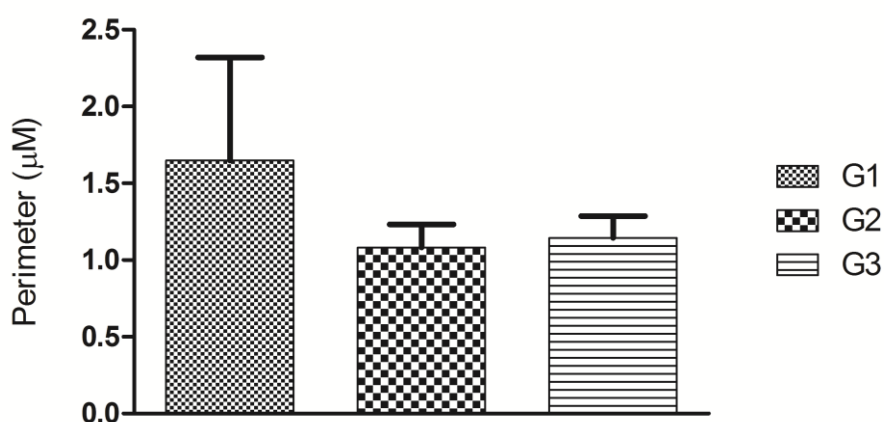


Fig. 3 - Histomorphometry of hepatocyte nuclei of mice (perimeter): G1 = hepatic tissue/administered saline solution; G2 = hepatic tissue/administered Silymarin; G3 = hepatic tissue/administered methanolic extract of *IS*. Data were subjected to analysis of variance using Tukey test ($P < 0.001$). N- 240 hepatocyte nuclei

3.2.2. Diameter of hepatic sinusoidal capillaries

Sinusoidal capillaries of G3, subjected to subchronic pretreatment with 50 mg/kg of *IS* extract, G2 positive control/silymarin and G1 negative/saline solution, were randomly compared and are shown in Figure 4. The hepatic sinusoidal capillaries of G3 mice (28 ± 11.86) showed no significant difference when compared to G2 (30.85 ± 7.81). However, G1 (59 ± 14) showed significant difference when compared to G2 (30.85 ± 7.81) and G3 (28 ± 11.86) ($P < 0.001$).

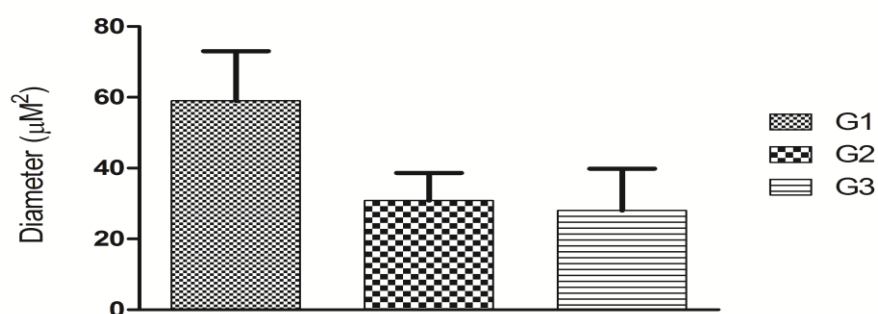


Fig. 4. Histomorphometry of hepatic sinusoidal capillaries of mice (diameter): G1 = hepatic tissue/administered saline solution; G2 = hepatic tissue/administered silymarin; G3 = hepatic tissue/administered *IS* extract. Data were subjected to analysis of variance using Tukey test ($P < 0.001$). N- 240 hepatic capillaries.

3.4. *In vitro* antioxidant activity of *IS* extract by DPPH free-radical scanning method

The IS extract antioxidant potential is shown in Figure 5: $73.79\% \pm 1.5915$ of antioxidant activity at 1,000 $\mu\text{g/mL}$; $79.58\% \pm 1.0231$ at 500 $\mu\text{g/mL}$; $67.25\% \pm 2.6531$ at 250 $\mu\text{g/mL}$ and $57.12\% \pm 0.4641$ at 125 $\mu\text{g/mL}$. Results suggest EMFIS have great antioxidant potential at 1,000 and 500 $\mu\text{g/mL}$ and may contain substances capable of donating electrons; thus reducing free radicals.

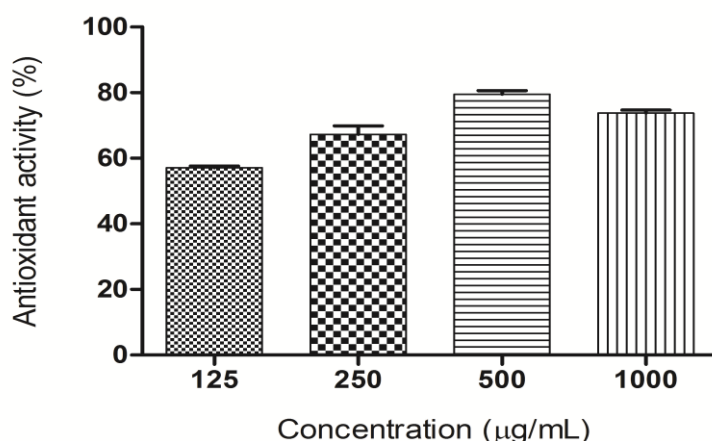


Fig. 5. Comparison of IS extract antioxidant activity at different concentrations. Data were subjected to analysis of variance using Tukey test ($P < 0.001$).

4. Discussion

Liver diseases are a worldwide health problem mainly triggered by viruses, metabolic diseases or chemical compounds.²⁻⁴ The hepatoprotective activity of extracts and compounds has been verified through the model of paracetamol-induced intoxication (PCM).^{9,26,27} The increase in serum enzyme levels is among the evidence of PCM-induced hepatic injury.²⁸ Serum enzymes levels act as markers reflecting both hepatocellular necrosis and their release into the blood after damage to cell membrane.^{29,30}

The *I. suffruticosa* has been used in traditional medicine for the treatment of infections and inflammation without reports of side effects to humans. These data were demonstrated by its properties: anti-inflammatory, embryotoxic, antimicrobial, anticancer, antitumor, hepatoprotective and low toxicity.^{12-15, 16} This study investigated the effects of methanolic extract of *I. suffruticosa* (IS) leaves on and its antioxidative action on Swiss albino mice submitted to paracetamol-induced liver injury.

The results of liver enzyme function markers showed a marked protection capacity in mice submitted IS extract pretreatment prior to paracetamol –induced hepatic injury, showing a

restoration of serum enzyme levels of ALT, AST and bilirubin, reduced hepatic tissue damage and increased organ regeneration rate. This effect was similar to the group treated with silymarin (G2). Possibly, this effect is associated with the extract antioxidant activity. On the other hand, the negative control (G1) had increased serum enzyme levels. The serum enzyme levels using *Caralluma umbellata*, a perennial and succulent herb, were investigated. Pretreatment with ethanolic extract followed by paracetamol administration led to reduced levels of total bilirubin, cholesterol, ALT, AST, and alkaline phosphatase. The extract showed hepatoprotective activity for restoring serum enzyme levels and preventing oxidative stress.³¹ Similar data were described for *Melia azedarach* L. (cinnamon) used for treatment of leprosy and inflammatory processes. The methanolic extract of *Melia azedarach* (500 mg/kg) administered in rats for seven days, followed by the paracetamol administration on the 5th day showed a hepatoprotective activity, reducing levels of AST, ALT and alkaline phosphatase and increasing enzyme activity.²⁷ The hepatoprotective potential in our study was due to the IS extract pretreatment at 50 mg/kg, which showed restoration of normal physiology of serum enzyme levels. These data can be corroborated by histological analysis of liver. Histological analysis is an important tool for detection of morphological changes in the liver caused by bioactive compounds. The results of histological analysis showed structural organization in the hepatic tissue of mice subjected to paracetamol-induced injury after subchronic pretreatment with methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves, similarly to the positive control/silymarin. However, hepatic tissue changes observed for the negative/saline solution control included: congested sinusoids, changes in hepatocyte cords and areas of necrosis and hemorrhage, characterizing leukocyte infiltration. Our data corroborate the results found by Silva et al.²¹ who demonstrated that the aqueous extract of *I. suffruticosa* leaves preserved the liver architecture, suggesting its use as alternative hepatoprotective agent.²¹ In this study, there was reorganization of hepatocyte structural units and sinusoidal capillary cells, suggesting a possible angiogenic action in the liver of mice treated with methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves and corroborating the pharmacological, anti-inflammatory, anticancer and antitumor properties of the extract..^{12, 15, 16, 20}

The histomorphometric analysis of the area and perimeter of hepatocyte nuclei and diameter of sinusoidal capillaries of mice subjected to paracetamol-induced injury after subchronic treatment with IS leaf methanolic extract were similar when compared to silymarin. The IS extract and silymarin showed no significant statistical differences. These data corroborate histological and morphometric analyses of experiments performed by Lima et al. (2013) who showed the absence of a structural change in the hepatic epithelium of mice carrying sarcoma

180 after treatment with Indican of *I. suffruticosa* leaves. However, significant changes were observed in the control group with sarcoma 180.¹⁹

The nuclei and sinusoidal capillaries of hepatocytes after subchronic treatment with extract and silymarin showed protective effect on the hepatic tissue of mice compared to the negative control. The results of this study suggest a possible angiogenic action due to a structural reorganization of glandular epithelial tissue, cells, nuclei and sinusoidal capillaries of hepatocytes after subchronic treatment with methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves. This may also be due to its interference with DNA synthesis. The same mechanisms of leaf extract of *I. suffruticosa* may be involved in the embryo development in mice.¹⁴ Biological activities of compounds detected in the methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves may be related to the antitumor activity found by Vieira et al.¹⁵ Other studies have reported the preservation of structural organization of renal tubules and hepatocyte nuclei of mice following treatment with *I. suffruticosa*.^{21, 22}

Muthulingam et al, using paracetamol as acute hepatotoxicity model, reported that the treatment of animals with aqueous extract of *Indigofera tinctoria* showed marked reduction of necrosis and liver tissue degeneration.³⁰ The efficacy of any hepatoprotective drug is essentially dependent on its ability to reduce harmful effects or maintain the normal hepatic physiology that has been disrupted by a hepatotoxin.^{31,32} Silymarin extracted from seeds of Marian thistle (*Silybum marianum*) consists of many polyphenolic flavonoids, including silibinin (the main one), isosilybine, silycristin and silydianin.³³ Silymarin has been used for centuries because of its known hepatoprotective effects and several pharmacological properties.³²

Lipid peroxidation is a chain reaction of polyunsaturated fatty acids of cell membranes generating free radicals that change their permeability, fluidity and integrity.³³ Antioxidant activity provides health benefits by inhibiting lipid peroxidation.³⁴ The percentage of antioxidant activity is proportional to the amount of DPPH consumed by the sample.³⁵ Thus, the higher the DPPH consumption per sample, the lower its absorbance and the higher its antioxidant activity.

Our study on the antioxidant activity of the methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves at 1,000 µg/mL and 500 µg/mL showed the presence of substances capable of donating electrons and thus reducing free radicals. These results suggest the methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves have a great antioxidant potential directly related to the dose increase. These results are similar to those found by Renukadevi et al. for methanolic extracts of *Indigofera tinctoria*, which showed significant antioxidant activity at the concentrations tested.³⁸ The

hepatoprotective activity of *I. suffruticosa* found in this study is probably related to chemical compounds capable of donating electrons and reducing free radicals;³⁷ a fact confirmed by the antioxidant activity of this plant that induces the inhibition of the tissue injury according to studies reported in the pertinent literature³⁹ Also, other studies are recommended to evaluate the curative efficacy on hepatic tissue of mice in experimental models of paracetamol-induced hepatic injury subjected to post-treatment with methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves. In conclusion, this study suggests that hepatic tissue of mice in experimental models of paracetamol-induced hepatic injury subjected to pretreatment with methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves showed restoration of hepatic physiology at serum enzyme levels, reorganization of tissue structural units, hepatic sinusoidal cells and capillaries, besides antioxidant potential, indicating reduced damage to the hepatic tissue and increased organ regeneration rate. These data suggest that *Indigofera suffruticosa* has hepatoprotective activity.

ABBREVIATION

- **AST:** aspartate aminotransferase
- **ALT:** alanine aminotransferase
- **CAPES:** Coordinator of Improvement of Higher Level Personnel
- **CNPq:** National Council of Scientific and Technological Development
- **CYP:** Cytochrome P450 system
- **DPPH:** 2,2-dephenyl-1-picry
- **G1:** negative saline
- **G2:** positive with Silymarin
- **G3:** methanolic extract of *I. suffruticosa* leaves
- **HE:** hematoxylin and eosin
- **IS:** indogofera suffruticosa
- **MeOH:** methanol
- **UFPE:** Federal University of Pernambuco

FINANCIAL SUPORTE

This study was supported by the Coordinator of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and National Council of Scientific and Technological Development (CNPQ) at Federal University of Pernambuco (UFPE)

CONFLICT OF INTEREST

None.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by the Graduate Program in Morphotechnology – UFPE.

REFERENCES

1. Brasileiro Filho, G. Patologia. 6 eds. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*. 2000.
2. Negi AS, Kumar JK, Luqman S, Shanker K, Gupta MM, Khanuja SP Recent advances in plant hepatoprotectives: A chemical and biological profile of some important leads. *Medicinal Research Reviews*, 2008; 28: 746-772.
3. Graier W, Malli R, Kostner GM. Mitochondrial protein phosphorylation instigator or target of lipotoxicity? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2009; 20:186-193.
4. Lens S, Crespo G, Carrión JA, Miquel R, Navasa MCrespo G, Carrión JA, Miquel R, Navasa M. Severe acute hepatitis in the dress syndrome: Report of two cases. *Annals of Hepatology*, 2010; 9: 198-201.
5. Aktay G, Deliorman D, Ergun E, Ergun F, Yesilada E, Cevik C. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 73: 121–129.
6. Dhiman, Chawla D. Herbal Medicines for Liver Diseases *Digestive. Diseases and Sciences* 2005; 50: 1807.
7. Muriel P, Rivera-Espinoza Y. Beneficial drugs for liver diseases. *J Appl Toxicol*. 2008; 28: 93-103.
8. Girish C, Koner BC, Jayanthi S, Ramachandra Rao K, Rajesh B, Pradhan SC Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009; 23:735-45.
9. Kumar G, Banu GS, Pappa PV, Sundararajan M, Pandian MR. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 92: 37– 40.

10. Lopes J, Matheus M E. Risk of hepatotoxicity with Acetaminophen. *Rev. Bras. Farm.* 1012; 93: 411-414.
11. Leite SP. *Indigofera Suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas. Tese (Doutorado em produtos naturais). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2003. 01-90.
12. Leite SP, Silva LLS, Catanho MTJA, Lima EO, Lima VLM. Anti-inflammatory Activity of *Indigofera suffruticosa* extract. *REBRASA* 2003; 7: 47-52.
13. Leite SP, Vieira JRC, Medeiros PL, Leite RMP, Lima VLM, Xavier SH, Lima EO. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2006; 3: 261–265.
14. Leite SP, Medeiros PL, Silva, EC, Maia MBS, Lima VLM, Saul DE, Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Reproductive Toxicology*. 2004; 701-705.
15. Vieira JRC, Souza IA, Nascimento SC, Leite SP. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2007; 1-5.
16. Vieira JRC, Souza IA, Nascimento SC, Leite SP. *Antitumoral ctivity of indigofera suffruticosa*. - *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco*. 2007; 52: 12-14
17. Vieira JRC, Leite RMP, Lima IR. Navarro DAF, Bianco EM, Nascimento SC, Leite SP. Oviposition and Embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on Early Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 741638: 1-6
18. Vieira JRC. Investigação farmacognóstica e biológica de folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill sobre *Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2011.
19. Lima I R, Vieira JRC, Silva IB, Leite R M P, Maia MBS, Leite SP. Indican from Anil (*Indigofera suffruticosa* Miller): An herbal protective agent in liver. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 2014; 36: 41 -45.
20. LIMA, I.R.: Investigação da *Indigofera suffruticosa* sobre atividade antitumoral e aspectos histológicos e morfométricos do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco), Recife. 2012
21. Silva IB, Lima I.R, Santana MAN, Leite RMP, Leite SP. *Indigofera suffruticosa* Mill (fabaceae): hepatic responses on mice bearing Sarcoma 180. *International Journal of Morphology*. 2014; 01: 01-10.
22. Santana MAN, Silva IB, Lima IR.; Vieira JRC, Leite RMP, Leite SP. Histomorphometric analysis in kidney tissue of mice treated with *Indigofera suffruticosa* Mill. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2015; 7:12-18.

23. Masson P. Tumors Humanism: Histologic. Diagnostics et Techniques. 2^a ed. Paris, *Librairie Maloine*. 1956; 106-48.
24. Singh SS, Handa. Hepatoprotective activity of *Apium graveolens* and *Hygrophila auriculata* against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995; 49 (3): 119–126.
25. Ahmed MF; Rao AS, Thayyll H, Ahemad SR. Role of *Melia azedarach* leaf extract in Paracetamol Induced Hepatic damage in rats. *Pharmacognosy Journal*, 2011; 3: 60-64.
26. Kaplowitz N. “Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Safety*. 2001; 24: 483–490.
27. Choi JS, Yoon TJ, Kang KR, Lee KH, Kim WH, Suh YH, Song J, Jung MH. Glycoprotein Isolated from *Acanthopanax senticosus* Protects against Hepatotoxicity Induced by Acute and Chronic Alcohol Treatment. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006; 29: 306-314.
28. Janbaz KH, Gilani AH. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*. 2000; 71: 25-33.
29. Shanmugam G, Ayyavu M, Rao DM, Devarajan T, Subramanim G. Hepatoprotective effect of *Caralluma umbellata* against acetaminophen induced oxidative stress and liver damage in rat. *Journal of Pharmacy Research*. 2013; 6: 342-345.
30. Renteria, I. B; Corona, M. R. C ; Rosales, P. C; Garza, H. G. L; Nava, D. C; Mendosa, F. J. A; Cantú, E.M.T: Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Annals of Hepatology*. 2007; 4: 251-254.
31. Kuppuswamy, R; Govindaraju, A; Velusamy, G; Balasubramanian, R; Balasundarm, J; Sellamuthu, M.: Effect of Dried Fruits of *Solanum nigrum* LINN against CCl₄-Induced Hepatic Damage in Rats. *Biological pharmaceutical bulletin*. 2003; 11: 1618-1619
32. Muthuligam FAF, Antihepatotoxic Efficacy of Methanolic Extract of *Indigofera tinctoria* (Linn.) on Paracetamol – Induced Liver Damage in Rats. *J. Nat. Prod. Plant Resour*. 2012; 2: 244-250.
33. My, G, Balasubramanian R, Balasundarm J, Sellamuthu M. Effect of Dried Fruits of *Solanum nigrum* LINN against CCl₄-Induced Hepatic Damage in Rats. *Biological pharmaceutical bulletin*. 2003; 11: 1618-1619.
34. Jia, J.D.; Bauer, M.; Cho, J.J.; Ruehl, M.; Milani, S.; Boigk, G.; Riecken, E. O.; Schuppan, D.:Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *Journal. Hepatology*, 2001; 3: 392- 398.
35. Stahl W, Aust O, Sies H MC. Polidori Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr*. 2001; 936: 83-93.
36. Shobana S, Naidu KA. Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids*. 2000; 62:107–110.

37. Alves CQ, Brandão HN, David JM, David JP, Lima LS. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC*. 2007; 5: 7- 8.
38. Renukadevi KP, Sultana SS. Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI- h69. *Int. J. Pharmacol.* 2011; 7:356- 362.
39. Devasagayam TPA, Devasagayam KB. Sainis. Immune system and antioxidants, especially those derived from Indian medicinal plants, Indian. *Journal of Experimental Biology*. 2002; 6: 639- 655.

TABLE 1.

Table 1 - Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin in Swiss albino mice treated with IS extract prior to paracetamol-induced hepatic injury (PCM)

Group	Dose (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirubin (mg/L)	Results are expressed as mean $\pm$ SEM
G1	15 ml/kg	94.48 $\pm$ 6.89**	120.98 $\pm$ 13.67**	7.9 $\pm$ 3.5**	
G2	25 mg/kg	31.36 $\pm$ 4.78	36.65 $\pm$ 5.35	1.4 $\pm$ 0.5	
G3	50 mg / kg	37.78 $\pm$ 4.56*	39.24 $\pm$ 5.78*	2.1 $\pm$ 1.2*	

SEM; * statistically significant compared to animals treated with saline solution ($p < 0.05$); ** statistically significant for animals treated with silymarin and IS extract ($p < 0.05$).

FIGURE 1, 2, 3, 4, and 5,

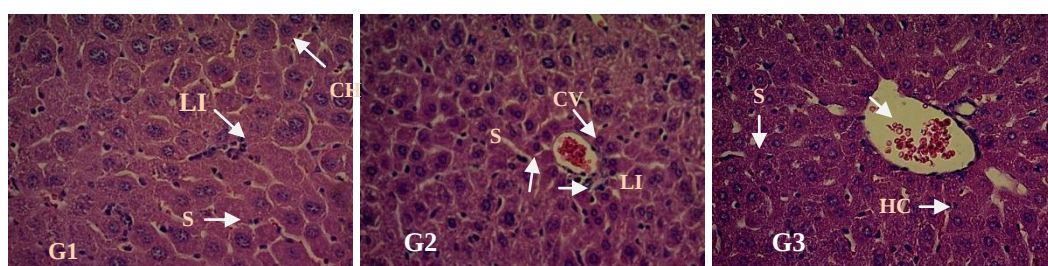


Fig. 1. Photomicrograph of hepatic tissue of Swiss albino mice (Magnification 400x). **G1** = hepatic tissue/administered saline solution; **G2** = hepatic tissue/administered Silymarin; **G3** = hepatic tissue/administered IS extract. Formalin-fixed, HE - stained. Leukocyte Infiltration (LI), sinusoid capillaries (S), central veins (CV), hepatocytes cords (CH).

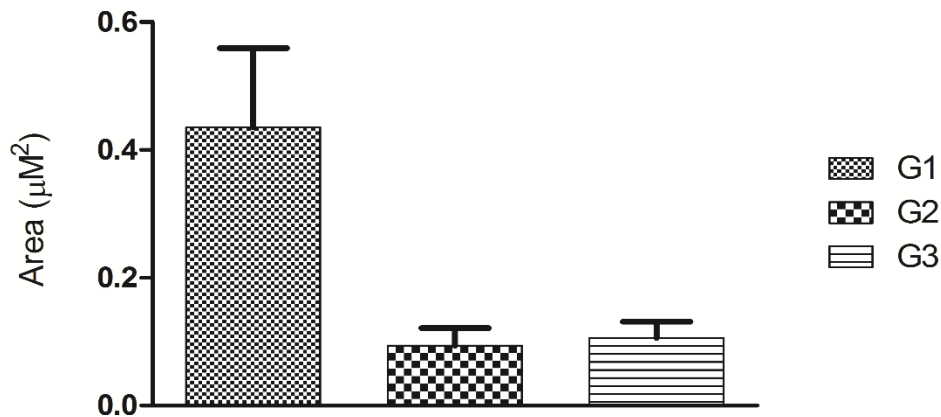


Fig. 2. Histomorphometry of the area of hepatocyte nuclei of mice: G1 = hepatic tissue/administered saline solution; G2 = hepatic tissue/administered Silymarin; G3 = hepatic tissue/administered IS extract. The data were analyzed by analysis of variance using the Tukey test ($P < 0.001$). N- 240 hepatocyte nuclei

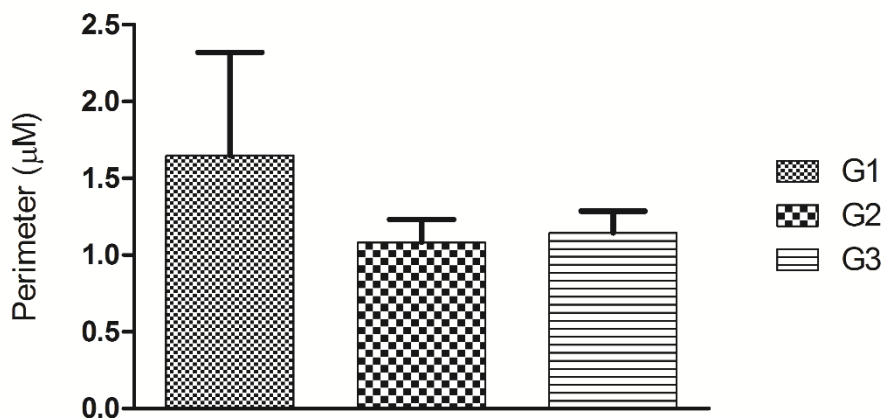


Fig. 3 - Histomorphometry of the perimeter of hepatocyte nuclei of mice: G1 = hepatic tissue/administered saline solution; G2 = hepatic tissue/administered Silymarin; G3 = hepatic tissue/administered methanolic extract of IS. The data were analyzed by analysis of variance using the Tukey test ($P < 0.001$). N- 240 hepatocyte nuclei

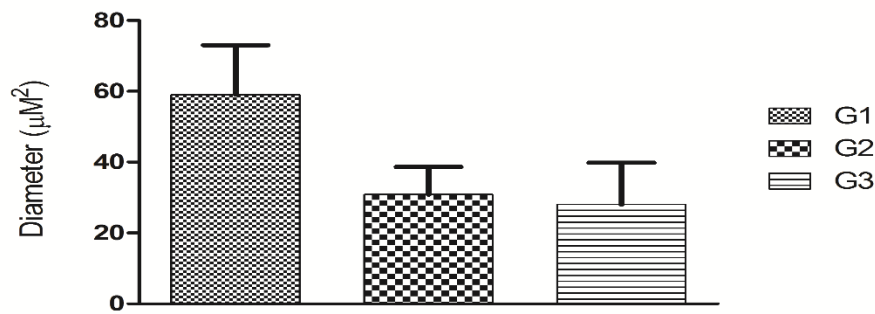


Fig. 4. Histomorphometry of the diameter of hepatic sinusoids capillaries of mice: G1 = hepatic tissue/administered saline solution; G2 = hepatic tissue/administered silymarin; G3 = hepatic tissue/administered IS extract. The data were analyzed by analysis of variance using the Tukey test ($P < 0.001$). N- 240 hepatic capillaries

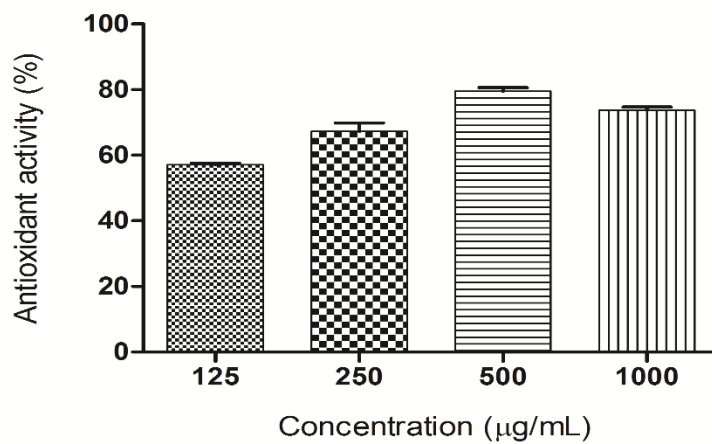


Fig. 5. Comparison of the antioxidant activity of the IS extract at different concentrations. The data were analyzed by analysis of variance using the Tukey test ($P < 0.001$).