

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Hyptis fruticosa* E
Baccharis trimera SOBRE A PROLIFERAÇÃO DO FÍGADO
APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS**

LUCIANO DA COSTA VIANA

ARACAJU
Julho – 2011

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Hyptis fruticosa* E
Baccharis trimera SOBRE A PROLIFERAÇÃO DO FÍGADO
APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Saúde e
Ambiente, na área de concentração em
Saúde e Ambiente.

LUCIANO DA COSTA VIANA

Orientador(eS):

**SÔNIA OLIVEIRA LIMA, D.S.c.
MARGARETE ZANARDO GOMES, D.S.c.**

ARACAJU
Julho - 2011

V614e Viana, Luciano da Costa

Efeito dos extratos aquosos de hyptis fruticosa e baccharis trimera sobre a proliferação do fígado após hepatectomia parcial em rato / Luciano da Costa Viana ; orientação [de] Sônia Oliveira Lima, Margarete Zanardo Gomes. – Aracaju, 2013.

67p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação de Mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1. Plantas medicinais. 2. Hepatectomia parcial. 3. Regeneração hepática. 4. Hyptis fruticosa. 5. Baccharis trimera. I. Lima, Sônia Oliveira. (orient.) II. Gomes, Margarete Zanardo. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 633.88

**EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Hyptis fruticosa* E
Baccharis trimera SOBRE A PROLIFERAÇÃO DO FÍGADO APÓS
HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS**

LUCANO DA COSTA VIANA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Sônia Oliveira Lima, D. Sc
Orientador

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc
Orientador

Francisco do Prado Reis , D.Sc
1º Examinador

Valdinaldo Aragão de Melo , D.Sc
2º Examinador

ARACAJU
Julho – 2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, amigos, orientadores e em especial a minha esposa Sheila e minha filha Letícia pela força e por estarem ao meu lado nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente **a Deus**, por abençoar e iluminar meus passos.

Aos meus pais, **Maria e Paulo**, pelo incondicional amor e incentivo, e por terem me educado e me preparado para a vida, me fortalecendo e ensinando com suas palavras e gestos a cada dia.

Aos meus **irmãos**, em especial, a minha irmã **Claudia** (In Memoriam) que sempre acreditaram e me incentivaram a lutar por meus objetivos.

A minha esposa, **Sheila**, minha cúmplice, pelo apoio e amor, pela renúncia de projetos pessoais em função deste objetivo em comum, pelos momentos mais felizes e por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis.

A minha filha **Letícia**, que por inúmeras vezes teve que se conformar com a minha ausência, e que me dá forças para sempre buscar mais conquistas.

A Prof^a. Dra. **Sônia Oliveira Lima**, pela intensa dedicação a este trabalho, pelos ensinamentos, e por ter tido muita paciência comigo.

A Prof^a Dra. **Margarete Zanardo Gomes**, pela energia estimulante, e por ter acreditado neste trabalho.

Ao prof. **Ricardo Luiz**, pelo apoio e incentivo desde o início e pelas diversas sugestões ao longo do trabalho.

Aos **colegas e amigos de trabalho** pela amizade e palavras de incentivo.

A **Clínica de Nefrologia de Sergipe (CLINESE)** pelo apoio e incentivo na busca deste objetivo.

Ao amigo **Denisson Pereira**, que deu o pontapé inicial para este sonho, pelo apoio e incentivo de sempre.

Aos amigos **Hugo Xavier, Daniele, Luciana e Elaine Andrade**, grandiosos amigos, exemplos de profissionais; eu não teria chegado aqui sem a ajuda de vocês.

Enfim, sem vocês nada seria possível! A todos só posso dizer: Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Hyptis Fruticosa</i>	14
2.2 <i>Baccharis trimera</i>	17
2.3 O fígado.....	19
2.4 Regeneração hepática.....	22
2.5 Modelo experimental para o estudo da regeneração.....	23
2.5.1 Fatores que influenciam e métodos que avaliam a regeneração hepática.....	26
2.6 Material e método.....	28
2.6.1 Material.....	28
2.6.1.1 Coleta das plantas e preparo dos extratos brutos aquosos.....	28
2.6.1.2 Animais.....	29
2.6.2 Método.....	29
2.6.2.1 Procedimentos Cirúrgicos.....	29
2.6.2.2 Análise da regeneração hepática.....	30
2.6.2.3 Análise estatística dos dados.....	31
2.6.3 Aspectos éticos.....	31
2.7 Referência Bibliográfica.....	32
3. CAPÍTULO 2 – Proliferative effect of aqueous extract of <i>Hyptis fruticosa</i> on liver regeneration after partial hepatectomy in rats.....	46
3.1 Introduction	47
3.2 Materials and Methods	47
3.3 Results	49
3.4 Discussion.....	51
3.5 Conclusion.....	52
3.6 References.....	53

4. CAPÍTULO 3 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Baccharis trimera</i> sobre a proliferação dos hepatócitos após hepatectomia parcial em ratos.....	55
4.1 Introdução.....	57
4.2 Material e método	57
4.3 Resultados.....	59
4.4 Discussão.....	61
4.5 Referências.....	63
5. CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS – A inserção da Pesquisa na Temática Saúde e Ambiente e na Ótica Interdisciplinar.....	65
ANEXO I.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Data present as means and standard deviation (SD). Results of individual liver regeneration index. Liver regeneration was assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 24 hr after partial hepatectomy.....	49
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – <i>Hyptis fruticosa</i> salzman ex. Benthian Labiati.....	16
Figura 02 – <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. – Ramos reprodutivos e vegetativos.....	18
Figura 03 – Arquitetura hepática microscópica.....	20
Figura 04 – Distribuição percentual do peso dos lobos do fígado do rato.....	24

CAPITULO 2

Figura 01 - Data presented as means and standard deviation of mean of liver regeneration index. The aqueous extract of <i>Hyptis fruticosa</i> (oral administration during 4 days before surgery) caused a significant increase at this parameter. Liver regeneration was assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 24 hr after partial hepatectomy. Statistical comparisons among the groups were performed by Mann-Whitney.....	49
--	----

CAPITULO 3

Figura 01 - Regiões centrolobular e interlobular dos grupos controle (A e B) e teste (C e D), exibindo imunomarcção nuclear positiva para PCNA.....	59
Figura 02 - índice médio de positividade (IP) de células PCNA-positivas nos grupos experimentais.....	59

EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Hyptis fruticosa* E *Baccharis trimera* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DO FÍGADO APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS

Objetivo: Avaliar os efeitos dos extratos aquosos das folhas de *Hyptis Fruticosa* e *Baccharis trimera* sobre a capacidade proliferativa do fígado após hepatectomia parcial de 70% em ratos. **Materiais e métodos:** O estudo foi realizado em 36 ratos Wistar albinos (300 a 450g). Todos os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos para cada extrato de planta, que consistiu de oito animais para cada grupo do estudo da *H. fruticosa* e 10 ratos para cada grupo da pesquisa com *B. trimera*: grupo controle, cujos ratos receberam água durante 4 dias e grupo teste, onde os ratos receberam extrato aquoso das respectivas plantas durante 4 dias na dose de 100 mg / kg / dia. No dia consecutivo deste tratamento, os animais de ambos os grupos foram submetidos a hepatectomia de aproximadamente 70% sob anestesia inalatória com éter. Após 24 horas, eles foram submetidos a uma nova operação para remover o fígado remanescente, e em seguida, eles foram sacrificados. A proliferação hepática foi avaliada por imuno-histoquímica PCNA, usando anticorpo monoclonal anti-PCNA primário (PC-10; DAKO A / S, Glostrup, Dinamarca). Todos os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Resultados:** no estudo com a *H. fruticosa* o índice de proliferação hepática foi significativamente maior no grupo Teste em relação ao grupo Controle. No grupo Teste esse índice era de $53,56\% \pm 18,91$ enquanto que o Controle apresentou índice de $21,12\% \pm 8,29$ ($p = 0,0003$). O extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* aumentou a proliferação hepática em cerca de 2,5 vezes. No estudo com a *B. trimera* em todos os animais estudados foi verificado imunomarcagem nuclear positiva mais abundante nos hepatócitos localizados nas regiões interlobulares do fígado. A análise quantitativa das células PCNA-positivas revelou Índices de Positividade médios significativamente maiores ($p = 0,02$) no grupo Teste ($77,1 \pm 13,6$) quando comparados ao grupo Controle ($45,8 \pm 12,9$). **Conclusão:** os estudos mostram que os extratos aquosos da *Hyptis fruticosa* e o da *B. trimera* na dose de 100mg/kg/dia estimula a proliferação do fígado por hepatectomia parcial em ratos.

Descritores: Plantas medicinais. Hepatectomia parcial. Regeneração hepática. *Hyptis fruticosa*. *Baccharis trimera*.

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Hyptis fruticosa* and *Baccharis trimera* ON THE PROLIFERATION OF LIVER AFTER PARTIAL HEPATECTOMY IN RATS

Objective: To evaluate the effects of aqueous extracts of leaves of *Hyptis Fruticosa* and *Baccharis trimera* on the proliferative capacity of the liver after 70% hepatectomy in rats. **Materials and methods:** The study was conducted in 36 Wistar albino rats (300 to 450g). All animals were randomly divided into two groups for each plant extract, which consisted of eight animals in each study group *H. fruticosa* and ten rats for each group research with *B. trimera*: control group, whose rats received water for 4 days and the test group, where rats received aqueous extracts of plants during their four days at a dose of 100 mg / kg / day. In consecutive days this treatment, the animals of both groups were subjected to approximately 70% hepatectomy under anesthesia with ether inhalation. After 24 hours, they underwent a new operation to remove the remnant liver, and then they were sacrificed. Liver proliferation was assessed by PCNA immunohistochemistry using monoclonal primary anti-PCNA (PC-10, DAKO A / S, Glostrup, Denmark). All data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical comparisons between groups were performed by Mann-Whitney test ($p < 0.05$). **Results:** In the study with *H. fruticosa* the rate of liver proliferation was significantly higher in test group compared to the control group. In the test group this index was $53.56 \pm 18.91\%$ while the index had control $21.12\% \pm 8.29$ ($p = 0.0003$). The aqueous extract of *Hyptis fruticosa* liver proliferation increased by about 2.5 times. In the study with *B. trimera* in all animals studied was found positive immunohistochemical nuclear staining more abundant in hepatocytes located in the interlobular regions of the liver. Quantitative analysis of PCNA-positive cells revealed positivity rate significantly higher mean ($p = 0.02$) in the Test group (77.1 ± 13.6) compared to the control group (45.8 ± 12.9). **Conclusion:** The studies show that aqueous extracts of *Hyptis fruticosa* and *B. trimera* the dose of 100mg/kg/day stimulates liver proliferation by partial hepatectomy in rats.

Keywords: Medicinal plants. Partial hepactomy. Liver regeneration. *Hyptis fruticosa*. *Baccharis trimera*.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais é comum no Brasil há muito tempo e é fruto da nossa flora extremamente rica em espécies vegetais. Estima-se que cerca de 10 mil espécies brasileiras das 55 mil espécies já catalogadas podem ser consideradas medicinais, aromáticas e úteis (BARATA; QUEIROZ, 1995; FERREIRAS, 1998; PASA, 2011).

Muitas destas plantas são usadas baseadas apenas no conhecimento popular e repassado de uma geração para outra (CUNHA et al, 2003). O Brasil, assim como outros países do mundo, tem se dedicado a estudos que comprovem as ações terapêuticas das plantas medicinais e, principalmente, a descobrir seus princípios ativos capazes de combater doenças e/ou melhorar a saúde da população como um todo (CORDELL; COLVARD, 2005; SOUZA; M.FERNANDES; PASA, 2010).

A *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth, Lamiaceae, é uma dessas plantas, popularmente conhecida no Brasil como "alecrim do campo" ou "alecrim do vaqueiro", é encontrada abundantemente na costa do nordeste brasileiro. Seu uso é recomendado na medicina popular para o tratamento de várias doenças, como distúrbios gastrointestinais, infecções de pele, congestão nasal, febre, cólicas e dor (PIO-CORRÊA, 1931; ROJAS et al, 1992;. SEPTÍMIO, 1994; SILVA A. et al, 2006). Propriedades antifúngicas, antimicrobianas e vasorelaxantes já foram relatadas (SOUZA L. et al, 2003;. DE OLIVEIRA et al, 2004; MOREIRA et al, 2010).

Outro exemplo de planta é a *Baccharis trimera* conhecida popularmente como carqueja. Encontrada por toda a América do Sul, essa planta é bastante conhecida no nordeste brasileiro, sendo utilizada popularmente no tratamento de reumatismo, diabetes, disfunções estomacais intestinais e como hepatoprotetor, além de propriedades antiinflamatórias e digestivas (LORENZI; MATOS, 2002; BIAVATTI et al, 2007; AGRA et al, 2007,2008).

Estas duas plantas, embora sejam de famílias e espécies diferentes possuem em comum o fato de serem usadas popularmente no trato digestório. O fígado possui características peculiares e regula importantes processos metabólicos (BHANDARKAR; KHAN, 2004; ACHLIYA; WADODKAR; DORIE, 2004). Devido sua localização é capaz de metabolizar em primeiro lugar as substâncias absorvidas pelo tubo digestivo (SMALTZER; BARE, 2006). Essa glândula possui também importantes funções de produção de proteínas,

armazenamento e metabolismo de vitaminas, desintoxicação de toxinas químicas externas ao organismo (GUYTON, 2006; MICHALOPOULOS, 2007).

Dados obtidos pelo Ministério da Saúde revelam que pelo menos 15% da população já esteve em contato com o vírus da hepatite B e que 1% apresenta doença crônica relacionada a esse vírus (FERREIRA C., 2004). Além disso, o Brasil tem um alto índice de consumo abusivo de álcool, fatores que sabidamente são predisponentes a doença do fígado, promovendo infiltração gordurosa e progredindo para uma cirrose ou câncer hepático (COSTA, 2004) cujo tratamento muitas vezes requer a realização de hepatectomias parciais ou transplantes do fígado (ADAM et al, 2006).

As hepatectomias parciais também são necessárias como tratamento para alguns traumas e outros tumores do fígado (BIONDO-SIMÕES et al, 2011). A ressecção do tecido hepático quando superior a 30% e inferior a 70% (HIGGINS; ANDERSON, 1931) promove a proliferação dos hepatócitos, o que pode aumentar com o uso de algumas substâncias como a *Hyptis pectinata* (SILVA R. et al, 2002) e *Sida cordifolia* (SILVA A. et al, 2006).

O estudo da proliferação hepática e de fatores que podem acelerar ou retardar esse processo tem uma importante relevância para a área da saúde (BIONDO-SIMÕES et al, 2007). Embora existam pesquisas que demonstrem efeitos terapêuticos das folhas de *Hyptis fruticosa* e *Baccharis trimera*, não foram encontradas relatos científicos sobre suas ações na proliferação do fígado. Propõe-se com este trabalho avaliar os efeitos dos extratos aquosos das folhas destas plantas sobre a proliferação dos hepatócitos após ressecção parcial do fígado de ratos.

De acordo com as normas do colegiado do programa de Pós-graduação da UNIT, esta dissertação encontra-se organizada em capítulos e os resultados estão apresentados sob a forma de artigos. O primeiro capítulo apresenta a revisão bibliográfica, o segundo e terceiro são artigos originados pela pesquisa e, por último, serão apresentadas as considerações finais da dissertação.

2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fitoterapia é uma forma de tratamento caracterizado pela utilização de plantas medicinais, em suas diferentes preparações sem a utilização de substâncias ativas isoladas (OMS, 2011). O mercado de fitoterápicos vem crescendo notadamente nos últimos anos ao ponto que atualmente gira em torno de 50 bilhões de dólares por ano (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). A Organização Mundial de Saúde recomenda o uso de fitoterápicos como forma de reduzir os custos dos programas de saúde pública, provendo fácil acesso para a população mais pobre, em especial nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

No Brasil, por possuir uma flora rica, o uso de ervas medicinais é bastante tradicional e amplo. E, a cada dia, tem se tornado mais comum devido à disseminação da moda naturalista e ao alto custo dos produtos farmacêuticos industrializados (FREITAS, 2005; PASA, 2011). O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados (OLIVEIRA K., 2010). Muitas espécies são usadas empiricamente sem respaldo científico quanto a eficácia e a segurança o que demonstra que em um país como o Brasil com grande biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas (FOGLIO et al, 2006). Em Sergipe, dentre os produtos naturais que tem incentivado pesquisas científicas estão algumas plantas que são utilizadas pela população com o objetivo de obter efeitos benéficos, a exemplo da *Hyptis fruticosa* (CÂNDIDO, 2006; FRANCO et al, 2011) e da *Baccharis trimera* (LOSQUI et al, 2009).

2.1 *Hyptis fruticosa*

O gênero *Hyptis* Jacq. possui aproximadamente 400 espécies distribuídas desde o Sul dos Estados Unidos à Argentina (BORDIGNON, 1992; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002, p.343-353), e apresentam grande diversidade morfológica no Cerrado brasileiro (HARLEY, 1988). Plantas de *Hyptis* spp. são de grande importância econômica e

etnofarmacológica e possuem propriedades medicinais (PIO-CORRÊA, 1931; ROJAS et al, 1992; SEPTÍMIO, 1994).

O Brasil, por apresentar em sua rica flora vários tipos de ervas, tem como prática o uso da fitoterapia pelas classes sociais mais baixas, principalmente de gêneros facilmente encontrados como é o caso do *Hyptis*. Especificamente no Nordeste, há o reconhecimento de novas espécies desse gênero, no Estado da Bahia. Harley em 1995 e 1996 fez grande contribuição nesse sentido (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002, 343p.). Em Sergipe, se desenvolve naturalmente na Região Litorânea e em parte da porção central do Estado, atraindo interesse de pesquisadores pelas propriedades medicinais (AZEVEDO et al, 2002).

A *Hyptis fruticosa*, no Brasil, é utilizada com frequência como aromatizante, De Araújo e colaboradores (1974), provavelmente, foram os primeiros a relatar estudo dos extratos metanólicos extraídos das raízes da planta, tendo como resultado inicial atividade anti-microbiana, com inibição da ação de germes Gram-positivos, Gram-negativos e ácido-resistentes; e posteriormente resultado referente a atividade anti-neoplásica, em relação ao carcinoma de Erlich, na forma cística, obtiveram-se 90,3% de inibição das células tumorais e, para o sarcoma 180, em camundongos albinos suíços, uma atividade de 49,6%.

Em trabalhos preliminares, inicialmente, foi caracterizada como *Lipia mycrophila* por Dantas M. et al (2001), Cambuí et al (2002), Santos H. et al (2002). Após estudo taxonômico, foi confirmada por especialistas do gênero como sendo da espécie *Hyptis fruticosa*. Segundo descrição do “New York Botanical Garden”, é uma planta de arbusto alto, verde-musgo, com flores azul-lilás e aromatizante. Essa espécie catalogada por R. M. Harley, em 1996, teve origem de vários locais do Nordeste brasileiro (figura 1).



FIGURA 1: *Hyptis fruticosa* salzman ex. Benth. Labiati.
 Fonte: The New York Botanical Garden, maio de 2011.

A espécie *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., *Lamiaceae* é conhecida como "alecrim-do-campo" no estado de Sergipe, Nordeste do Brasil (DANTAS T.; RIBEIRO, 2010). Estudos e descrições dessa espécie mostram seus principais efeitos medicinais: efeito analgésico (SILVA A. et al, 2006; CÂNDIDO, 2006; MENEZES et al, 2007) atividades anticonvulsivantes, além de efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do óleo essencial de *H. fruticosa* (MENEZES et al, 2007), atividade antiinflamatória e antioxidante (KUHN et al, 1995, p.227; ANDRADE et al, 2010) e atividade vasorelaxante (MOREIRA et al, 2010). Quinonas e diterpenoides foram isoladas das raízes e apresentaram atividades antimicrobiana e antitumoral (De ARAÚJO et al, 1974; MARLETTI et al, 1976; FRANCO et al, 2011).

Estudos farmacológicos correlacionando os efeitos do óleo para o sistema cardiovascular foram realizados em ratos (SANTOS M. et al, 2007). Além disso, o óleo tem sido considerado como uma importante alternativa de inseticida para o controle de larvas de *Aedes aegypti*, uma vez que proporciona uma rica fonte de compostos bioativos que são biodegradáveis e não tóxicos (SILVA W. et al, 2008).

O uso da *Hyptis fruticosa* é recomendado na medicina popular para o tratamento de várias doenças, como distúrbios gastrointestinais, infecções de pele, congestão nasal, febre, cólicas e dor (PIO-CORRÊA, 1931; ROJAS et al, 1992;. SEPTÍMIO, 1994). Apesar de ser coletada há décadas, não foi encontrado na literatura pesquisada trabalhos que comprovem alguma ação desta planta sobre o fígado, órgão que recebe os nutrientes absorvidos pelo intestino decorrente da ingestão oral (POCOCK et al, 2006).

2.2 *Baccharis trimera*

O gênero *Baccharis*, pertencente à família *Asteraceae*, está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero. No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, sendo a *B. Trimera* a espécie mais conhecida no nordeste brasileiro e a mais pesquisada quanto à composição química e/ou atividade biológica (LORENZETI; MATOS, 2002; VERDI et al, 2005).

A *Baccharis trimera* (Less.) DC., (figura 2) é uma planta subarbustiva, dióica, aromática, com altura variável entre 1,0 e 1,6 m (CASTRO H.; FERREIRA, 2000). É uma espécie de elevada rusticidade (CASTRO H.; FERREIRA, 2000) que cresce bem em condições de pleno sol (BONA, 2002), sendo típica de lugares abertos ou de campo (OLIVEIRA E. et al, 1999). É considerada invasora de pastagens, ocorrendo em solos pedregosos, margens das estradas, barracos ou lugares úmidos nas ribanceiras dos rios (CORREA JUNIOR et al, 1994).



FIGURA 2 – *Baccharis trimera* (Less.) DC.
– Ramos reprodutivos e vegetativos.
Fonte: BUDEL; DUARTE, 2009

Conhecida como carqueja, amplamente utilizada na medicina popular, seu uso é um hábito herdado dos indígenas e há séculos é utilizada para o tratamento de várias doenças. É de 1931 o primeiro registro escrito do uso da carqueja no Brasil, empregada na forma de infusão de folhas e ramos para o tratamento da esterilidade feminina e da impotência masculina, atribuindo-lhe ainda propriedades tônicas, febrífugas e estomáquicas. A partir daí, o uso medicinal aumentou principalmente para a solução de problemas hepáticos, disfunções estomacais e intestinais, diabetes, obesidade e reumatismo (AULER, 2004; CARREIRA, 2007). A carqueja é utilizada também como anti-helmíntico, contra anorexia, gripe, resfriado, assim como em feridas e ulcerações (DRESCH et al, 2006), antiinflamatória (GENE et al, 1992), analgésica entre outros (GENE et al, 1996).

Baccharis trimera é a espécie mais estudada farmacologicamente dentre todas as carquejas (BUDEL et al, 2009) e consta na Farmacopéia Brasileira IV (1988-2003). Estudos químicos revelaram a presença de flavonóides como quercetina, luteolina, nepetina, apigenina e hispidulina (SOIKE; LENG-PESCHLOW, 1987), saponinas, lactonas ses-

quiterpênicas (MORS et al, 2000; ALONSO; DESMARCHELIER, 2006) e taninos (BIANCHI et al, 1993). No óleo essencial foram encontrados α -pineno, β -pineno, carquejol, acetato de carquejila, canfeno e nopineno (MORS et al, 2000; SIMÕES-PIRES et al, 2005).

Considerando o potencial terapêutico descrito para a infusão (chá) da carqueja e a falta de estudos que avaliem sua ação tóxica, foi desenvolvido um trabalho que teve como objetivo a investigação, por meio de análise citogenética, dos efeitos tóxicos em nível celular desta planta. Após os tratamentos com as duas concentrações da infusão de *B. trimera*, foi verificado que através dos testes utilizados não houve ação citotóxica, após 24 h de tratamento, nas células de medula óssea de ratos Wistar tratados via gavagem, indicando, assim, uma segurança maior de uso desta planta pelo homem (PERON et al, 2008).

Segundo Verdi et al (2005), A *B. trimera* possui atividade antimutagênica e hepatoprotetora. A literatura corrente descreve a realização de estudos sobre o uso da carqueja, tendo sido observado a redução do ciclo mitótico, em concentrações elevadas, bem como o surgimento de anormalidades cromossômicas; a planta possui baixa toxicidade por via oral, porém possui moderada toxicidade por via intraperitoneal; a administração do extrato de carqueja em ratas exerce ação abortiva, sendo contra indicada durante a gestação e a lactação (PERON et al, 2008). Devido a suas propriedades anti-hepatotóxicas, a carqueja é aplicada em terapias hepáticas (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987).

Muitas plantas usadas tradicionalmente no tratamento de desordens hepáticas têm merecido grande interesse científico, uma vez que podem ser utilizadas como potencial fonte de novos agentes capazes de serem aplicados no tratamento e prevenção do dano do fígado (PAUL, 2005).

2.3 O fígado

O fígado, a maior glândula do corpo humano, pesa em média 1,5 kg e mede cerca de 28 cm transversalmente, 8 a 10 cm de altura e 16 cm de espessura (DELAMARCHE et al, 2006, p.99-100). Desempenha a enorme tarefa de manter a homeostasia metabólica do organismo. Isso inclui o processamento dos aminoácidos dietéticos, dos carboidratos, dos lipídios e das vitaminas; fagocitose de partículas da circulação esplâncnica; síntese das proteínas séricas; biotransformação dos metabolitos circulantes; e detoxicação e excreção

através da bile dos produtos endógenos de desgaste e dos xenobioticos poluentes (MICHALOPOULOS, 2007).

Do ponto de vista histológico o fígado está organizado em lóbulos (figura 3) com as áreas portais na periferia e as veias centrais no centro de cada lóbulo. A superfície hepática é dividida através de fissuras e ligamentos e os dois lobos principais são o direito e o esquerdo. Existem ainda os lobos quadrado, situado na face anterior, e o caudado, na fase posterior do fígado. Sua cor é marrom-avermelhada, sua superfície é lisa e sua consistência é firme, mas relativamente frágil, e ele é envolvido por uma fina cápsula hepática. No entanto de um ponto de vista fisiológico/funcional, o fígado está organizado em ácinos com o fluxo sanguíneo portal e arterial entrando pelas áreas portais/periporais. Em condições basais, o fígado, normalmente, recebe cerca de 25% do débito cardíaco. É peculiar entre os órgãos abdominais por apresentar duplo suprimento sanguíneo – a artéria hepática que transporta cerca de 400 ml/min e a veia porta que fornece cerca de 1000 ml/min (FREITAS, 2005; POCOCK et al, 2006, p. 427).

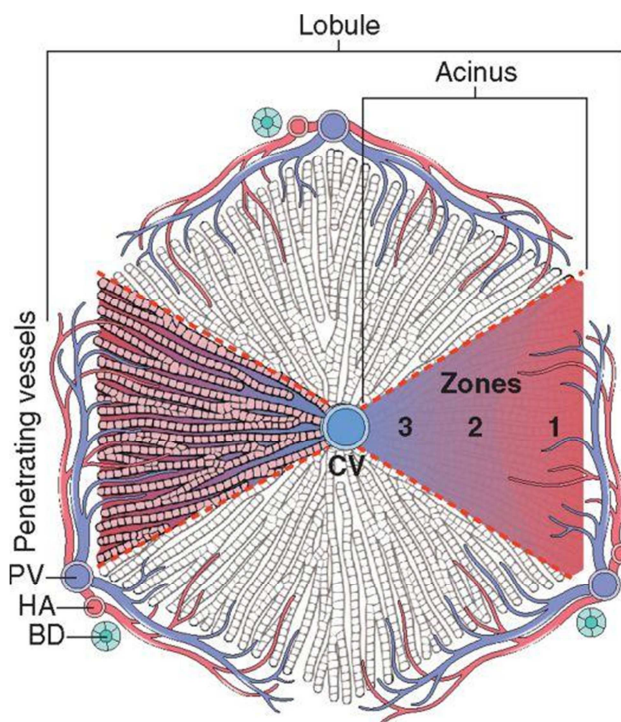


FIGURA.3 – Arquitetura hepática microscópica. O lóbulo hepático clássico é centrado em torno de uma veia central (ou vénula hepática terminal VHT). O ácino triangular tem na base os vasos penetrantes que se estendem a partir das veias porta (VP) e artérias hepáticas (AH) para penetrar no parênquima. O ápice é formado pela veia central. As zonas 1,2 e 3 representam regiões metabólicas distintas. DB – ducto biliar
Fonte: COTRAN et al, 1999.

O fígado pode ser considerado como uma fábrica química que produz, armazena, altera e excreta um grande número de substâncias que participam do metabolismo (SMELTZER; BARE, 2006, p.831). Está envolvido em aproximadamente 5000 funções e é composto por 5 tipos celulares diferentes arranjados sobre um complexo arcabouço extracelular (TOLENTINO et al, 2003), sendo cerca de 60% do número total destas células constituído por células parenquimatosas (hepatócitos) (RAMALHO F. et al, 1993; MICHALOPOULOS, 2007).

Os hepatócitos desempenham mais de 500 funções metabólicas que incluem a detoxificação de drogas e substâncias tóxicas, a degradação de hormônios esteróides e a utilização de lipídios na síntese de lipoproteínas. As células de Kupffer são membros altamente fagocíticos do sistema retículo-endotelial e tem a função de remover as toxinas do sangue venoso portal bem como a produção de citosinas na fase inicial do ciclo celular regenerativo. As células endoteliais formam um revestimento contínuo da luz sinusoidal selecionando os solutos e partículas que serão apresentados aos hepatócitos subjacentes. As células de Ito ou de armazenamento de lipídios apresentam aspecto de estrela e localizam-se no espaço de Disse. São responsáveis pela produção da matriz extracelular (HATA et al, 2007; SCHINONI, 2006).

O tecido hepático e o músculo esquelético constituem os principais locais de estoque de glicogênio. Quando a glicemia está elevada, o fígado sintetiza glicogênio. Quando a glicemia cai, o fígado utiliza o glicogênio armazenado para sintetizar glicose (glicogenólise), atuando para manter os níveis glicêmicos relativamente constantes. Este é o órgão mais importante para a gliconeogênese (produção de glicose pela conversão de aminoácidos, lipídios ou carboidratos simples). Todos esses processos são regulados por diversos hormônios (KUTCHI, 1998).

A disfunção do fígado resulta do dano das células parenquimais hepáticas, seja diretamente, por doenças hepáticas primárias, seja indiretamente, em virtude da obstrução ao fluxo biliar ou por desarranjos da circulação hepática. Os agravos que produzem disfunção hepatocelular podem ser causados por agentes infecciosos, tais como bactérias e vírus, por anóxia, distúrbios metabólicos, toxinas, medicamentos, deficiências nutricionais e estados de hipersensibilidade. A causa mais comum de dano parenquimal hepático é a má nutrição, especialmente no alcoolismo. A resposta das células parenquimais é quase a mesma para a maioria dos agentes nocivos: substituição do glicogênio por lipídios, produzindo infiltração gordurosa, com ou sem morte celular (SMELTZER; BARE, 2006). A morte celular de mais de 30% do parênquima do fígado pode induzir a proliferação hepática

de maneira desorganizada culminando em cirrose hepática (COSTA, 2004) ou de forma ordenada e organizada, sendo um espetacular exemplo de proliferação tecidual (MICHALOPOULOS, 2007).

2.4 Regeneração hepática

O fígado, sob condições normais, apresenta uma reduzida reprodução celular (FAUSTO; MEAD, 1989; KARRAN et al, 1979). A regeneração hepática, representa um mecanismo de proteção orgânica contra a perda de tecido hepático funcionante seja por injúria química, viral, perda traumática acidental, ou por hepatectomia parcial (HP) (MICHALOPOULOS, 1990; ASSY; MINUK, 1997; JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000).

A lenda de Prometeu, da Mitologia Grega, revela que desde a antigüidade o fenômeno regenerativo hepático era conhecido. Por ter roubado dos deuses do Olimpo o segredo do fogo e o revelado aos homens, Prometeu foi castigado por Zeus a ter seu fígado diariamente devorado por uma águia. No entanto, durante a noite, o fígado de Prometeu se regenerava, provendo à águia incessante alimentação, e conduzindo Prometeu à interminável tortura. Estudos têm demonstrado que a capacidade regenerativa hepática é quase que ilimitada, validando a antiga lenda de Prometeu (RAMALHO, 2000).

Jesus; Waitzberg; Campos (2000), baseados em alguns autores, afirmam que apesar de ser largamente utilizado, o termo “regeneração” é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pelo dano tecidual hepático promove hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente, até o restabelecimento da massa hepática primitiva. No entanto, os lobos ressecados não são recuperados.

Embora todas as células hepáticas participem do processo regenerativo, a maioria dos estudos focalizam os hepatócitos (MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO F. et al, 1993). Estes constituem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células (MICHALOPOULOS, 2007).

O hepatócito é uma célula estável, denominação esta devida à sua replicação celular sob condições de normalidade. Apenas um hepatócito entre 20.000 pode estar se dividindo em algum momento, durante a vida do ser humano ou animal, sendo que essa divisão pode

ocorrer no máximo, uma ou duas vezes para cada célula. Entretanto, quando o fígado é submetido a tratamento que reduza seu parênquima, suas células readquirem a capacidade de se multiplicar rapidamente, restaurando a massa hepática (ROZGA, 2002; JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000).

No fígado humano, a restauração da massa hepática após hepatectomia parcial parece ocorrer em duas a três semanas, e a restauração completa é verificada após três meses (NAGASUE et al, 1987; KHAN; MUDAN, 2007). Devido às limitações no uso de fígado humano para o estudo da regeneração/proliferação, a maioria das informações sobre este processo tem sido proveniente de modelos *in vivo* com pequenos animais (ratos e camundongos) ou utilizando células hepáticas em cultura (*in vitro*) (KONIARIS et al, 2003). O processo proliferativo hepático em ratos assemelha-se ao processo de proliferação do fígado humano, o que justifica seu amplo uso em várias áreas da pesquisa biomédica atual (endócrina, celular, genética e molecular) (ROZGA, 2002).

2.5 Modelo experimental para estudo da regeneração

A regeneração hepática é conhecida como um espetacular exemplo de crescimento tecidual organizado (RAMALHO et al, 1993; MICHALOPOULOS, 2007). O primeiro modelo experimental bem sucedido para o estudo da regeneração hepática foi introduzido por Higgins e Anderson em 1931. Esse modelo contemplou a remoção cirúrgica dos lóbulos lateral esquerdo e mediano do fígado de ratos, constituindo aproximadamente 67 a 70% da massa hepática total desses animais (JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000), e tem sido largamente utilizado para investigação da regeneração hepática (COURT et al, 2002).

O fígado do rato é dividido em quatro lobos principais: lobo caudado, lobo direito, lobo mediano e lobo lateral esquerdo. O lobo lateral esquerdo representa aproximadamente 30% do peso total do fígado, o lobo mediano 40%, o lobo direito representa 20% e o caudado 7%. O tecido hepático circundado a veia cava perfaz um total de 3% do peso do fígado (MADRAHIMOV et al, 2006) (figura 4).

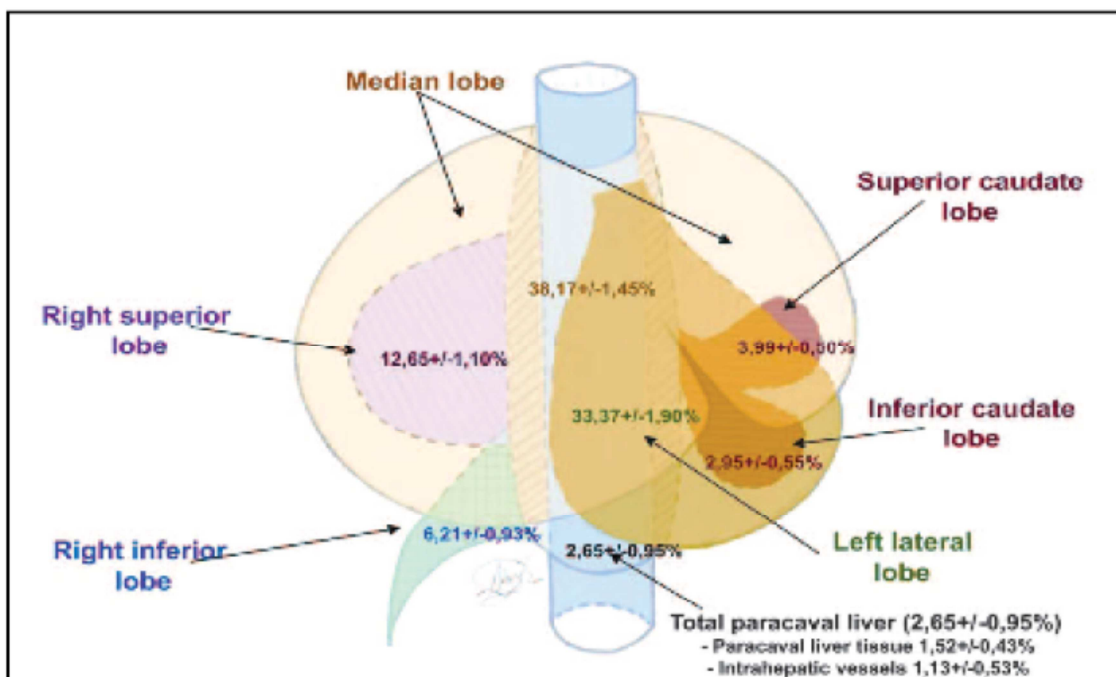


FIGURA 4 – Distribuição percentual do peso dos lobos do fígado do rato.
 FONTE: MADRAHIMOV et al,2006.

Desta forma, como o fígado do rato possui uma estrutura multilobular, a remoção dos lobos lateral esquerdo e mediano é realizada facilmente sem deixar danos aos lobos remanescentes, resultando na retirada de aproximadamente 70% (2/3) da massa hepática total desses animais (MICHALOPOULOS, 2007; MARTINS et al, 2007).

Em ratos, a cinética da resposta regenerativa inicia-se pela síntese de DNA, que ocorre 12 - 16 hs após a hepatectomia parcial (HP), sendo o pico máximo observado 24 a 26 hs após a cirurgia. Em seguida ocorre uma onda de mitoses, cujo pico é verificado aproximadamente 8 hs mais tarde (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). Durante a proliferação de hepatócitos ocorre liberação de fatores de crescimento como Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF), Fator Transformador do Crescimento-alfa (μ -TGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), os quais determinam estímulo mitogênico que atinge outras células hepáticas (MULLHAUPT; FEREN; FODORE, 1994).

A síntese de DNA das células não parenquimatosas inicia-se em média 24 hs após o mesmo processo verificado nos hepatócitos. Observa-se o pico mitótico nas células de Kupffer, células endoteliais e ductais, dentro de 48 , 96 e 48 hs após a HP, respectivamente (YOSHIDA et al, 1995). Imediatamente após a HP, ocorre ativação de 70 ou mais genes,

constituindo-se assim, o primeiro passo na cascata de eventos que direcionam à síntese de DNA (RAMALHO F. et al, 1993).

Os eventos desencadeados após a HP possibilitam a identificação de dois períodos distintos: o pré-replicativo (de 0 a 14 hs) e o replicativo (14 a 36 hs), caracterizando o processo de regeneração. Apesar do limite entre esses períodos não ser totalmente preciso, verifica-se que durante as 12 hs iniciais os hepatócitos saem do estado de repouso ou quiescência - fase G0, entrando no ciclo celular - fase G1, progredindo para a síntese de DNA. Verifica-se o início dessa fase 4 a 6 horas após a HP, com elevação precoce da expressão dos proto-oncogenes c-fos e c-myc, 30 a 60 minutos após a cirurgia. Na segunda fase ocorre a síntese de DNA propriamente dita ou fase S. Após a fase S, aproximadamente 4 a 6 hs são necessárias para que a célula entre em divisão, caracterizando a fase G2. Após 30 a 60 minutos do início do processo mitótico, obtêm-se dois novos hepatócitos. Durante a regeneração hepática, observa-se o sincronismo do pico de replicação de DNA, indicando que a maioria ou até mesmo todos hepatócitos encontravam-se na fase de repouso, e não em diferentes pontos do ciclo celular, fortalecendo o conceito que os hepatócitos em condições normais, raramente se dividem (FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995; FAUSTO, 2002; FAUSTO; RIEHLE, 2005).

Três dias após a HP, cerca de 80% da síntese de DNA ocorre na proximidade do Espaço Porta (ZONA1), indicando que os hepatócitos localizados no ácino hepático replicam o DNA mais precocemente que aqueles próximos à veia centrolobular, ou seja, o processo regenerativo ocorre predominantemente nas regiões mais próximas do Espaço Porta (RAMALHO et al, 1993; AGUIAR et al, 2009).

A eficiência da síntese de DNA após hepatectomia parcial está diretamente relacionada com o déficit tecidual. Em ratos adultos com remoção inferior a 30% do parênquima hepático, não se verificou síntese de DNA. Do mesmo modo, em cirurgias com remoção superior a 80% da massa hepática, a regeneração induzida é menos eficiente que a observada na hepatectomia parcial de 67 a 70% (FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995).). Lima et al (1986) observaram que em ratos a perda de aproximadamente 70% do parênquima do fígado, desencadeia um rápido processo regenerativo com acentuada infiltração gordurosa hepática os quais atingem um pico em torno da 24ª hora após hepatectomia parcial. A restauração da massa hepática completa-se em 7-10 dias (RAMALHO F. et al, 1993; COURT et al, 2002; KONIARIS et al, 2003; MICHALOPOULOS, 2007).

2.5.1 Fatores que influenciam e métodos que avaliam a regeneração hepática

Hipofisectomia, tireoidectomia, paratireoidectomia e injeções de hidrocortisona retardam o pico máximo de síntese de DNA por 16 a 20 horas, mas não o suprimem. Efeito semelhante é produzido por raio X, actinomicina, ciclohexamida e colchicina, se administrados aos animais logo após a cirurgia (ALISON; 1986; TARLÁ et al, 2006).

Lima et al (1986), verificaram a importância da inervação parassimpática do fígado na manutenção da capacidade regenerativa deste órgão por provável efeito vagal. Lindroos et al (1991), estudaram o efeito do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) em ratos hepatectomizados e em ratos tratados com tetracloreto de carbono e constataram que o HGF estava envolvido com a estimulação da regeneração hepática nestes animais, sendo um potente estimulador da síntese de DNA dos hepatócitos em ratos adultos.

Mullhaupt et al (1994), evidenciaram através de modelo envolvendo cultura celular, que a proliferação dos hepatócitos é regulada predominante mas não exclusivamente por mecanismos autócrinos, a partir de liberação de fatores de crescimento. Os hepatócitos já “iniciados” seriam capazes de produzir seus próprios fatores de crescimento, caracterizando a regulação autócrina, além de responder a fatores de crescimento produzidos por outras células hepáticas, constituindo a regulação parácrina. Haveria também a participação de células de outros órgãos, promovendo a regulação endócrina, desde que houvesse receptores adequados na membrana plasmática dos hepatócito para essas substâncias.

O sinusóide hepático apresenta um endotélio fenestrado que expõe os hepatócitos diretamente a uma série de hormônios, fatores de crescimento e nutrientes, que possuem ação hepatotrófica. Nesse sentido, vários autores sugerem que nenhuma substância isoladamente seria suficiente para regular todo o processo regenerativo, sendo que fatores negativos e positivos podem estimular ou inibir a proliferação de hepatócitos, havendo uma relação de equilíbrio entre eles. Podem ser sintetizados no fígado, nas células parenquimatosas e não parenquimatosas, além de tecidos como as glândulas de Brunner localizadas no duodeno e glândulas salivares (RAMALHO et al, 1993).

A busca por agentes que acelerem a regeneração hepática tem importância na medida em que diminui o tempo de insuficiência hepática e desta forma permite ressecções mais ampliadas. Substâncias estão estabelecidas como mitogênicas completas: o Fator de

Crescimento Epidérmico (EGF), o Fator Transformador de Crescimento – alfa (α TGF), a Substância Estimuladora Hepática (SSH), o Fator de Crescimento de fibroblasto ácido (α FGF), Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF) e o Hormônio do Crescimento (GH) (ASAKAWA et al, 1989). Outras como co-mitogênicas como: a norepinefrina, a vasopressina, as angiotensinas, a insulina e o glucágon, as prostaglandinas e as fibronectinas (ANDREI et al, 1981).

Substâncias exógenas têm sido utilizadas a fim de conhecer como elas atuam sobre o processo de regeneração hepática (BIONDO-SIMÕES et al, 2000; MELO J. et al, 2010). A exemplo da histamina, que segundo os mesmos autores, aumenta o número de figuras de mitose no início do processo, não interferindo na regeneração ao final de 7 dias.

GAMA FILHO et al (2010) ao avaliar os efeitos do tacrolimus sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial concluíram que a imunossupressão com tacrolimus possui efeito estimulatório no processo de regeneração hepática desencadeado pela hepatectomia de 70% em ratos Wistar adultos.

Nas últimas décadas, a utilização de plantas medicinais como opção de tratamento e cura tem aumentado em todas as classes sociais das mais diversas regiões do mundo. Sabe-se que 80% da população do planeta já fizeram uso de algum tipo de erva, sendo 30% por indicação médica (CASTRO H. et al, 2002).

Silva R. et al (2002) ao estudarem os efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata*, popularmente conhecida com “sambacaitá” ou “canudinho”, sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos, concluíram que a administração durante 4 dias do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas da *Hyptis pectinata*, na concentração de 100 mg/kg de animal, exerce significativo efeito estimulante sobre a regeneração do fígado após hepatectomia parcial de 67% em ratos.

A regeneração hepática é um evento que envolve varias células e uma complexa interação entre citocinas e fatores do crescimento. Pesquisas experimentais em modelos animais vêm progressivamente contribuindo para a elucidação desse processo regenerativo (TARLÁ et al, 2006; BIONDO-SIMÕES et al, 2009).

Para estudar a regeneração hepática adequadamente é necessário um método objetivo e confiável para qualificá-la. São descritos para avaliação da regeneração hepática: determinação da massa hepática (peso do fígado), contagem de mitoses, estudos da síntese de DNA (incorporação de timidina e bromodeoxiuridina – BrdU) e métodos imunohistoquímicos para detecção de moléculas endógenas como a “proliferating cell

nuclear antigen”(PCNA), DNA polimerase alfa, Ki-67, anti-PAA, anti-ribonucleotídeo redutase, entre outros (ASSY; MINUK, 1997).

Atualmente a imunohistoquímica é a técnica mais utilizada e se baseia no uso de anticorpos que se ligam em moléculas endógenas nos tecidos. Estes anticorpos são marcados e mensurados numericamente ou percentualmente (TODERKE, 2009).

A PCNA (proliferating cell nuclear antigen) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta. Em células eucariontes é essencial na replicação do DNA. A sua expressão é dependente do ciclo celular, sendo primeiramente detectada na fase G1 e tem sua máxima expressão na fase S (BRAVO et al, 1987; BEM-IZHAK et al, 2002; BIONDO-SIMÕES et al, 2007). Técnicas de imunohistoquímica são usadas para demonstrar PCNA em hepatócitos e a forte presença do PCNA no núcleo representa a fase G1-S ou G2 do ciclo celular (ASSY; MINUK, 1997).

A síntese de DNA origina uma carga genética duplicada e uma tetraploidia temporária nas células em análise, processo o qual pode ser mensurado pela imunohistoquímica utilizando o antígeno de proliferação nuclear da célula (PCNA). O PCNA é um método comumente utilizado para avaliação de síntese de DNA e replicação celular (ASSY; MINUK, 1997), apresentando um pico de PCNA em 24 horas após a ressecção hepática (WOLF; MICHALOPOULOS, 1992).

Diante do exposto, objetiva-se avaliar através do PCNA os efeitos dos extratos aquosos da *Hyptis fruticosa* e *Baccharis trimera* sobre a proliferação do fígado após hepatectomia parcial em ratos.

2.6 - Material e método

2.6.1 Material

2.6.1.1 Coleta das plantas e preparo dos extratos brutos aquosos

As folhas de *Hyptis fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Lamiaceae foram coletadas no povoado Feijão (10 ° 56'S, 37 05'W °), no estado de Sergipe, Brasil. A espécie foi identificada e autenticada pelo Dr. Adauto Souza Ribeiro. A exsicata da planta (ASE número 01137) foi

depositada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brasil. Já as folhas de *Baccharis trimera* foram adquiridas secas no Mercado Tales Ferraz, identificadas pelo Prof. Dr. Lauro Xavier, biólogo e pesquisador do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes. Utilizou-se o mesmo processo para obtenção do extrato aquoso em ambas as plantas. As folhas foram secas em estufa com renovação e circulação de ar (modelo MA-037) a 37 ° C até a desidratação completa. Em seguida, foram pesadas, trituradas em moinho elétrico até que um pó de fina granulação foi obtido. Os extratos foram obtidos a partir destes pós (100 g) por adição de água destilada (3:10, p/v) sob agitação constante por 4 horas a 35 °C, seguida de filtração (pH 6,0). O filtrado foi liofilizado (extrato aquoso) e armazenados a 5 °C. No tempo de uso, os extratos foram ressuspensos em água destilada na concentração desejada.

2.6.1.2 Animais

Os estudos foram realizados em 36 ratos Wistar albinos pesando entre 300 e 450g, sendo 16 animais utilizados na pesquisa com o extrato da *H. fruticosa* e 20 no estudo com o extrato da *B. trimera*. Os animais foram mantidos em biotério, com ciclo de claro-escuro natural, temperatura e umidade próprios do ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum*. Foram divididos aleatoriamente em dois grupos para cada pesquisa: grupo controle, onde se administrou água por via oral uma vez ao dia em volume semelhante aos do grupo teste, durante os 4 dias, e Grupo teste, cujos ratos receberam extrato aquoso da planta durante 4 dias usando a dose de 100 mg / kg / dia, constituindo o estudo do efeito agudo da substância. As administrações foram feitas sempre no mesmo horário mediante sonda plástica maleável orogástrica (gavagem). No quinto dia, todos os animais foram submetidos a hepatectomia de aproximadamente 70% do fígado e no sexto dia, realizou-se a ressecção do fígado em proliferação.

2.6.2 Métodos

2.6.2.1 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre no mesmo horário, para evitar influência das variações do ciclo circadiano. O anestésico utilizado foi o éter etílico devido ao

fato de não possuir potencial hepatotóxico, como gases anestésicos halogenados, e não induzir o metabolismo de drogas ao nível do sistema microsomal hepático, como os barbitúricos. Após a tricotomia da parede abdominal foi realizada anti-sepsia com polivilpirrolidona iodo.

O acesso à cavidade peritoneal foi feito a partir de laparotomia mediana de cerca de 4 cm do apêndice xifóide em direção caudal. Foram realizadas a hepatectomia parcial, ressecando-se os lobos lateral esquerdo e mediano e fazendo ligadura de seus pedículos com fio de algodão 3-0. Essa ressecção equivale a aproximadamente 70% do volume do fígado. A parede abdominal foi fechada com suturas contínuas de mononáilon 4-0, deixando o peritônio e a aponeurose num plano profundo e a pele, num plano superficial. Após 24 horas foi realizada nova laparotomia, mediante a mesma técnica anestésica, com o intuito de retirar o fígado remanescente e posteriormente os animais foram sacrificados.

2.6.2.2 Análise da regeneração hepática

A Regeneração hepática foi avaliada por imunohistoquímica “proliferating cell nuclear antigen” (PCNA), usando anticorpo monoclonal anti-PCNA primária (PC-10; DAKO A / S, Glostrup, Dinamarca) em tecidos do fígado fixado em formalina e incluído em parafina. Os espécimes foram cortados em 4 mm, montados em lâminas de poli-L-lisina-revestido de vidro, desparafinizados, reidratados em uma série crescente de álcool, colocado em tampão fosfato (PBS), e tratados com peróxido de hidrogênio 2% em metanol por 15 min para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Este foi seguido por incubação com PC-10 anticorpo monoclonal primário, diluído em PBS 1:40 para 120 min a 25 °C no estudo da *H. fruticosa* e na diluição de 1:80 no estudo da *B. trimera*. Os cortes foram então incubados por 35 min com uma imunoglobulina anti-rato biotinilado de cavalo. O produto da reação foi detectado com um complexo avidina-biotina-peroxidase e diaminobenzidina foi utilizada como substrato cromógeno. Controles positivos e negativos foram usados para avaliar e controlar o processo de coloração. Após a marcação imunohistoquímica foi realizada uma análise quantitativa da expressão das proteínas PCNA, na qual foi contado o número de células imunomarcadas em 1.000 selecionadas aleatoriamente em secção histológica. Assim, para cada caso foram confeccionadas 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm; em cada lâmina foram fotomicrografados 10 campos histológicos (ampliação de 400x) selecionados por

casualização sistemática. Desta forma, os campos foram selecionados da esquerda para direita e de cima para baixo; para cada campo selecionado seguiu-se dois campos desprezados, até que fosse atingido o total de 10 campos. As imagens fotomicrografadas foram digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000®. Foram considerados PCNA positivas, os hepatócitos que apresentavam imunorreatividade restrita ao núcleo, representada por coloração de cor acastanhada e/ou amarelada, independente da intensidade da coloração. Para contagens de células positivas, foi utilizado software UTHSCSA ImageTool®, versão 3.0. Por fim foi obtido um índice de positividade (IP) para cada proteína investigada através da fórmula abaixo descrita:

$$IP = \frac{\text{Número de células positivas}}{1.000 \text{ células aleatoriamente}} \times 100$$

1.000 células aleatoriamente

2.6.2.3 Análise estatística dos dados

Todos os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas por Mann-Whitney. Os valores de probabilidade inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

2.6.3 Aspectos éticos

Estas pesquisas estiveram de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o estudo do extrato aquoso da *H. fruticosa* foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Universidade Federal de Sergipe – UFS, com o número de protocolo 36/2005 (Anexo I) e a pesquisa com o extrato aquoso da *B. trimera* foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Tiradentes com o cadastro 17062005.

2.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.Ethnopharmacology*, v. 90, p. 229-232, 2004.

ADAM R. et al. Hepatic resection for noncolorectal nonendocrine liver metastases: analysis of 1452 patients and development of a prognostic model. *Ann Surg*, v. 244, n.4, p. 524-535, out. 2006.

AGRA M.F.; FRANÇA P.F.; BARBOSA-FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* V.17, p. 114-40, 2007.

AGRA M.F.; SILVA K.N.; BASÍLIO I.J.L.D.; FRANÇA P.F.; BARBOSA-FILHO J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* v. 18, p. 472-508, 2008.

AGUIAR, L. R. F.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, C. A. P. M.; NASCIMENTO, M. M.; WIEDERKER, J. C.; PACHNICKI, J. P. A; STIENVEN-FILHO, E. Regeneração do fígado de ratos após oclusão parcial da drenagem venosa hepática. *ABSD, arq. bras. cir. dig*, v. 22, n. 2, p. 89-95, 2009.

ALISON, A. R. Regulation of hepatic growth. *Physiol. Rev.*, v. 66, p. 499-541, 1986. In: RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO E SILVA Jr, O. Regeneração Hepática: algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.*, v.8, n. 4, p. 177-189, 1993.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Curitiba, v. 45, n. 3, p. 343-353, set, 2002.

ALONSO, J.; DESMARCHELIER, C. *Plantas medicinale sautóctonas de la Argentina – bases científicas para sua plicación em atención primaria de la salud*. Buenos Aires: *Fitociencia*, 2006. 663p.

ANDRADE, A. M. et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 20, n. 6, p. 962-968, dez, 2010.

ANDREI, P.G., HITFIELD, J.F., ARMATO, U. Stimulation of DNA synthesis and mitosis of hepatocytes in primary cultures of neonatal rat liver by arachidonic acid and prostaglandins. *Exp Cell Res* 1981;134:265-72. In: BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; PANTE, M.; GARCIA, R.F.; MACEDO, V.L.; MORAIS, T.H.C.; BOEL, P. Hormônio de crescimento na regeneração hepática em ratos. *Rev.Col. Bras. Cir.*, v. 27, n. 2, p.116-117, 2000.

ASAKAWA, K., HIZUKA, N., TAKANO, K. et al. Human growth hormone stimulates liver regeneration in rats. *J. Endocrinal Invest.*, v. 12, p. 343-347, 1989. In: BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Hormônio de crescimento na regeneração hepática em ratos. *Rev.Col. Bras. Cir.*, v. 27, n. 2, p.116-117, 2000.

ASSY, N., MINUK, G.Y. Liver Regeneration: Methods for Monitoring and their Applications. *J. Hepatol.*, v. 26, n. 4, p. 945-952, 1997. In: JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.

AULER, N.M.F. Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharistriamera(Less)* DC. (*carqueja*) no Sul do Brasil. Santa Maria, 2004. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Agronomia) -Universidade Federal de Santa Maria.

AZEVEDO, N.R.; CAMPOS, H.D.; PORTES, T.A.; SERAPHIN, J.C.; DE PAULA, JR; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. *Biochem Syst Ecol*, v. 30, p. 205-216, 2002.

BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. Contribuição efetiva ou potencial do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) para o aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade. Campinas: [s.n.], 1995. In: SILVA, R. L. et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cir. Bra.*, v.17, n. 3, 2002.

BEN-IZHAK, O.; BAR-CHANA, M.; SUSSMAN, L.; DOBINER, V.; SANDBANK, J.; CAGNANO, M.; COHEN, H.; SABO, E. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology*, v. 41, p. 519-525, 2002.

BHANDARKAR M.R., KHAN A. ANTIHEPATOTOXIC effect of *Nymphaeas tellata willd.*, against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *J.Ethnopharmacology*, v.91, p. 61-64, 2004.

BIANCHI, N. R.; SILVA, M. O.; SPIASSI, L.; BERGONCI, J. I., MACHADO, C. A. Ensaio de toxicidade excessiva e *screening* fitoquímico de algumas espécies do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae). *Rev. Bras. Farm.*, v.74, n.3, p.79-80, 1993.

BIAVATTI M.; MARENSI V.; LEITE S.N.; REIS A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn.* v.17, p. 640-53, 2007.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; BONATO, F. T.; MENACHO, A. M.; DRECHMER, M.; CAVALCANTI, T. C. S.; FELIZOLA, S. J. A. Cicatrização da parede abdominal após hepatectomia parcial. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 38, n. 2, p. 127-132, 2011.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ERDMANN, T. R.; IOSHI, O. S.; MATIAS, J. E. F.; CALIXTO, H. L. G.; SHEBELSKI, D. J. The influence of strogen on liver regeneration. An experimental study in rats. *Acta Cir. Bra*, v. 24, n. 1, 2009.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MATIAS, J. E. F.; MARTONE, D.; BARBOSA, R. F.; OGAWA, G. H. Influencia da glutamina na regeneração hepática. *Rev. Med.*, v. 86, n. 4, p. 219-223, 2007.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Hormônio de crescimento na regeneração hepática em ratos. *Rev.Col. Bras. Cir.*, v. 27, n. 2, p.116-117, 2000.

BONA, C.M. Estaquia, colagem e sombreamento de carqueja. Parana, PR, 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

BORDIGNON SAL. *Hyptis tetracephala* (Labiatae), nova espécie do sul do Brasil. *Napaea* 8: v.1, n.3, 1992.

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A.; BRAVO, H. M. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature*, v. 326, p. 515-517, abr.,1987.

BUDEL, J.M., DUARTE, M.R. Análise morfoanotômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45,n.1,2009.

CAMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C. S.; DANTAS, M. C.; AIRES, A. V. B.; RIBEIRO, J. R. F. L.; MARCHIORO, M.; NOBRE, M. Z. A.; ANTONIOLLI, A. R. O extrato etanólico da *Lippia microphilla* previne convulsões e causa analgesia em roedores. In: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002, Cuiabá, MT. *Resumos...* Cuiabá, MT, 2002.

CÂNDIDO, E.A.F. *Caracterização parcial dos efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas da Hyptis fruticosa no sistema nervoso central de camundongos*. São Cristóvão, SE, 2006. 75 p. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe, UFS.

CARREIRA, R.C. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. São Paulo, SP, 2007. Tese (Doutorado -Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente).

CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; MARTINS, E. R.; DIAS, J. E. Plantas Medicinais. Viçosa: Editora UFV, 2000. In: SILVA, R. L. et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cir. Bras.*, v.17, n. 3, 2002.

CASTRO, H.G., FERREIRA, F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais carqueja (*Baccharis genistelloides*). Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2000. 102p.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some Thoughts on the future of athnofarmacology. J. Ethnopharmacol., v. 100, p. 5-14, 2005. In: RUIZ, A. L. T. G. et al. Farmacologia e toxicologia de *Peumus Boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, n. 2, abr./jun. 2008.

CORREA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

COSTA, J. S.; SILVEIRA, M. F.; GAZALLE, F. K.; OLIVEIRA, S. S.; HALLAL, P. C.; ENEZES, A. M.; D. P.; OLINTO, M. T.; MACEDO, S. Heavy alcohol consumption and associated factors: a population-based study. *Rev. Saúde Pública*, v. 38, n. 2, p.248-291, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S. L. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999.

COURT, F. G.; HOLDEN-WEMYSS, S. A.; DENNISON, A. R.; MADDERN, G. J. The mystery of liver regeneration. *British Journal of Surgery*, v. 89, p. 1089-1095, 2002.

CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. *Phytother Res.*, v. 17, p. 320-324, abr, 2003.

DANTAS, M. C.; AIRES, A. V. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Atividade sobre o sistema nervoso central do extrato aquosos bruto da lippia *microphilla*. In: XVI REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2001, Caxambu, MG. *Resumos...* Caxambu, MG, 2001. 206 p.

DANTAS, T. V. P.; RIBEIRO, A. S. Caracterização da vegetação do Parque Nacional Serra de Itabaiana, Sergipe-Brasil. *Biotemas*, v. 23, n. 4, p. 9-18, 2010.

DE ARAÚJO M. C. M.; CAVALCANTI, M. S. B.; MELLO, J. F.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, O.; DELLE MONACHE, F.; MACIEL, G. M.; LACERDA, A. L. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XLV. Primeiras observações sobre dois novos quinonóides isolados de *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. (Labiatae). *Rev. Inst. Antibiot.*, v. 14, p. 101, 1974.

DE OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M. D. R.; KATO, L.; DA SILVA, C. C.; FERREIRA, H. D.; SOUZA, L. K. H. Chemical composition and antifungal activity of the essencial oil of *Hyptis, ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v 15, p. 756-759, 2004.

DELAMARCHE, P; DUFOUR, M; MULTON, F. *Anatomia, Fisiologia e Biomecânica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 99 - 100.

DRESCH, A.P.; MONTANHA, J.A.; MATZENBACHER, N.I.; MENTZ, L.A. Controle de qualidade de espécies do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae) por CCD a partir de extratos rápidos. *Infarma*, v.18, p.37-40.2006.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988-2003. 1320p.

FAUSTO, N. Liver regeneration. *J Hepatol.*, v. 32, n.19, p. 1477-1487, 2002

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Liver Regeneration 2: Role of Growth Factors and Cytokines *in* Hepatic Regeneration. *FASEB J.*, v. 9, n. 15, p. 1527-1536. In: JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v.46, n. 3, p. 242-254, 2000.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. *Lab Invest*, v. 60, n. 1, p.4-13, 1989. In: PETROIANU, A.; ESQUERDO, C. R. M.; BARBOSA, A. J. A.; ALBERTI, L. R. Regeneração hepática induzida por ressecção do fígado, em rato. *Rev. Col. Bras. Cis.*, v. 31, n. 1, p. 10-14, jan./fev. 2004.

FAUSTO, N.; RIEHLE, K. J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, Tokyo, v. 12, p. 181-189, 2005.

FERREIRA, C. T.; RABERVEL, T. Hepatites virais: aspecto da epidemiologia e da prevenção. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 4, dez. 2004.

FERREIRA, S. H. *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FOGLIO, M. A; QUEIROGA, C. L; SOUSA, I. M. O; RODRIGUES, R. A. F. (2006) *Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar*. MultiCiencia: construindo a historia dos produtos naturais. http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf. Acessado em : setembro de 2010.

FRANCO, C. R. F.; ALVES, P. B.; ANDRADE, D. M.; DE JESUS, H. C. R.; SILVA, E. J. S.; SANTOS, E. A. B.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 21, n. 1, 2011.

FREITAS, D. Fígado e Vias Biliares. In: Freitas, Diniz de (editor). *Gastrenterologia-Semiologia Clínica e Laboratorial*, 2005. cap. XXXVI, p. 537-566.

GAMA FILHO, O.; TODERKE, E. L.; BARETTA, G. A. P.; SAKAMOTO, D. G.; AGULHAM, M. A.; TAMBARA, E. M.; MATIAS, J. E. F. Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 37, n. 3, 2010.

GENE, R. M.; CARTANÁ, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CANIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Medica*, v. 62, p. 232-235, 1996.

GENE, R. M.; MARIN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Medica*, v. 58, n. 6, p. 565-566, 1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 859 – 861.

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relation in Brazil. In: *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns* (Vanzolini PE & Heyer WR eds.). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-121.

HATA, S.; NAMAIE, M.; NISHINA, H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Journal compilation 2007 Japanese Society of Developmental Biologist*, v. 49, p. 163-170, 2007.

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*, v. 12, p.186, 1931.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v.46, n. 3, p. 242-254, 2000.

KARRAN, S.; EAGLES, C.; BUCHER, L. R. et al. Regeneration. In: Wright A (ed) - Liver and biliary disease. Philadelphia. Saunders, 1979, p. 197-227. In: PETROIANU, A.; ESQUERDO, C. R. M.; BARBOSA, A. J. A.; ALBERTI, L. R. Regeneração hepática induzida por ressecção do fígado, em rato. *Rev. Col. Bras. Cis.*, v.31, n. 1, p. 10-14, jan./fev. 2004.

KHAN, A. Z.; MUDAN, S. S. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. *ANZ Journal surgery*, v. 77, p. 9-14, 2007.

KONIARIS, L. G.; MCKILLOP, I.; SCWARTZ, S. I.; ZIMMERS, T. A. Liver regeneration. *Journal of the American College Surgeons*, v.197, n. 4, p. 634-648, out. 2003.

KUHNT, M.; PROBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica*, v. 61, p. 227- 232, 1995.

KUTCHI, H.C. The gastrointestinal secretion. In: BERNE, R.M.; LEVY, M. N. *Physiology*. 4^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 617-647.

LIMA, S. O.; CENEVIVA, R.; ZUCOLOTO, S.; MARTINELLI, A. L. C. Rat liver regeneration after 70% partial hepatectomy plus vagotomy with and without preservation on the hepatic branches of the anterior vagus nerve. *Dig. Dis. Sci.*, v. 31: 398S, 1986.

LINDROOS, P. M.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. Hepatic growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*, v. 13, p. 743-750, 1991. In: BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; PANTE, M.; GARCIA, R. F.; MACEDO, V. L.; MORAIS, T. H. C.; BOEL, P. Hormônio de crescimento na regeneração hepática em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 27, n. 2, p.116-117, 2000.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LOSQUI, Y.R.; ROZETE, F.S.S.; ALMEIDA, M.B.; BITTENCOURT, A.H.C.; PEREIRA S.P.F. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., (Asteraceae) sobre cultura de células in vitro. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.*, v.19, n.4, out/Dez, 2009.

MADRAHIMOV, N.; DIRSCH, O.; BROELSCH, C.; DAHMEN, U. Marginal hepatectomy in the rat from anatomy to surgery. *Ann Surg.*, v. 244, n. 1, p.89-98, jul. 2006.

MARLETTI, F.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; DE ARAÚJO, M. C. M.; CAVALCANTI, M. S. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; DE LIMA, O. G. Diterpenoid quinones of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). *Gazz Chim Ital.*, v. 106, p. 119-126, 1976.

MARTINS, P. N. A.; THERUVATH, T. P.; NEUHAUS, P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int.*, Oxford, p. 3-9, 2007.

MELO, G. B.; SILVA, R. L.; FAKHOURI, R.; MELO, V. A.; LIMA, S. O. Efeito do omeprazol e do pantoprazol sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. *Acta Cir. Bra.*, v. 18, n. 6, 2003.

MELO, J. U. S.; SANTOS, J. M. V.; KIMURA, O. S.; CAMPOS-JUNIOR, M. M.; MELO, R. B.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos dos ácidos graxos sobre a regeneração hepática em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 37, n. 5, p. 351-357, 2010.

MENEZES, I. A. C.; MARQUES, M. S.; SANTOS, T. C.; DIAS, K. S.; SILVA, A. B. L.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. in mice. *Fitoterapia*, v. 78, p. 192-195, 2007.

MICHALOPOULOS, G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *Faseb J.*, v. 4, p. 176-187, 1990. In: RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S. SILVA JR, O. C. Regeneração Hepática: algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.*, v.8, n. 4, p. 177-189,1993.

MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M.C. Liver Regeneration. *Science*, v. 276, p. 60-66, 1997. In: JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 46, n. 3, p. 242-54, 2000.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. *Journal of cellular Physiology*, v. 213, p. 286-300, 2007.

MOREIRA, Í. J. A. et al. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. *Rev. bras. farmacogn.*, v. 20, n. 5, nov. 2010.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. *Medicinal plants of Brazil*. Michigan: Reference Publications, 2000. 501p.

MULLHAUPT, B.; FEREN, A.; FODORE, JONES, A. Liver Expression of Epidermal Growth Factor RNA. Rapid Increases in Immediate- early Phase of Liver Regeneration. *J Biol Chem*; v. 269, n. 31, p. 19667-19670, 1994. In: JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 46, n. 3, p. 242-54, 2000.

NAGASUE, N.; YUKAYA, H.; OGAWA, Y.; KOHNO, H.; NAKAMURA, T. Human liver regeneration after major hepatic resection. *Ann Surg.*, v. 206, n. 1, p. 30-39, jul.1987.

OLIVEIRA, A. F. et al. The effect of laser on remanescant liver tissue after 90% hepatectomy in rats. *Acta Cir. Bras.*, vol. 21 (supl.1), 2006.

OLIVEIRA, E.J., GONTIJO, S.V., MALUF, W.R. Cultive carqueja em sua horta. Boletim técnico de hortaliças N° 0271 edição. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Agricultura. 1999. Disponível em <<http://www2.ufla.br>>. Acesso em: 20 de agosto de 2010.

OLIVEIRA, K.B. *Determinação do ácido Rosmarínico em Salvia Officinalis L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influencia na melanogênese*. 2010. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Geneva: Organización Mundial de la Salud; 2002. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1336. Acessado em: fevereiro de 2011.

PASA, M. C.; BASTOS, E. A. S. A etnobiologia no fragmento florestal Recanto do Sol, Campo Verde, MT. In: Santos, Jeater W. M. C. (Org). Produção do espaço e transformações socioambientais das paisagens do Mato Grosso. Edufmt. p: 71 – 94. 2010.

PASA, M. C. O saber local e a medicina popular: A etnobotânica em Cuiabá. Mato Grosso. Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Hum.*, Belém, v. 6, n. 1, p. 179-196. 2011.

PAUL, E.L. Análise experimental da ação hepatoprotetora e anti-inflamatória de *Baccharis trimera* (Less.) D.C. Asteraceae. Porto Alegre. 2005. 117 f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PERON, A.P.; FELIPES, J.; MATTGE, G.I.; CANTAGALLI, L.B.; MARIUCCI, R.G.; VICENTINI, V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. *Rev. Bras. Biocien.*, v. 6, p.127-130, 2008.

PIO-CORRÊA, M. *Dicionário de Plantas Úteis e Tóxicas Cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1931, 777p.

POCOCK, G.; RICHARDS, C. D. *Fisiologia humana: a base da medicina*. 2. ed. rev. ampl. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 427p.

RAMALHO, F. S.; RAMALHO L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO e SILVA Jr, O. Regeneração Hepática: algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.*, v.8, n. 4, p. 177-189, 1993.

RAMALHO, F. S. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. *Acta Cir. Bras.*, v.15 (supl. 2), 2000.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol.*, v. 35, p. 275-283, 1992.

ROZGA, J. Hepatocyte proliferation in health and liver failure. *Med SciMonit.*, v. 8, n. 2, p. 32-38, 2002.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. *Fitoterapia*, v. 78, p. 186-191, 2007.

SANTOS, H. S.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; COSTA, S. M. O.; UCHÔA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R. H. Application to strture Elucidation of Prenylated Naphthquione Dmrs from *Lippia microphyla*. *Ann. Magn. Reson.*, v.1, n. 1, p. 54-61, 2002.

SCHINONI, M. I. Fisiologia hepatica. *Gaz. Méd. Bahia*; v. 76 (supl 1), S5-S9, 2006.

SEPTÍMIO, L. R. *A fitoterapia baseada em ervas medicinais do Cerrado*. Brasília: SIPE, Ministério da Cultura, 1994.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Biores Tech.*, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Evaluation of the analgesic effect and acute toxicity of the aqueous extract of *Hyptis fruticosa* (Salmz. ex Benth.). *Rev. Bras. J. Pharmacogn.*, v. 16, p. 475-479, 2006.

SILVA, R. L.; MELO G.B.; ANTONIOLLI A.R.; LIMA S.O.; MELO V.A.; RAMALHO F.S.; RAMALHO L.N.Z.; ZUCOLOTO S.; CASTRO E SILVA JR O. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cir. Bras*, v. 17, S. 3, 2002.

SIMÕES-PIRES, C.A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L.A.; MATZENBACHER, N.I.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.*, v.253, n.1, p.23-32, 2005.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. *Tratado de Enfermagem Médico-cirurgica*. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SOICKE, H., LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis Trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica*, v. 53, p. 37-39, 1987.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA, J. G.; SOUZA, A. H.; FERNANDES, O. D. L.; SILVA, M. D. R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem I Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 963-965, 2003.

SOUZA, M. D.; FERNANDES, R. P.; PASA, M. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá-MT. *Revista Biodiversidade*, v. 9, n. 1, p. 91-100, 2010.

TARLA, M. R.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; SILVA, T. C. e.; BRANDAO, D. F.; FERREIRA, J.; SILVA, O. C. e.; ZUCOLOTO, S. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir. Bras.*, v. 21, n. 1, p. 58-62, 2006.

TODERKE, E. L. *Efeito do Sirulimus na regeneração hepática induzida por hepatectomia no rato*. Curitiba, 2009, 80p. Dissertação (mestrado em Clínica Cirúrgica), Universidade Federal do Paraná.

TOLENTINO, E. C.; FERREZ, O.; OLIVEIRA, G. R.; ZUCOLOTO, S.; SILVA JR, O. C. Oxigenoterapia hiperbárica e regeneração hepática. *Acta Cir. Bras.*, v.18 (supl.5), 2003.

VERDI, L.G., BRIGHENT, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VON MARTIUS, C. F. P. The New York Botanical Garden. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=628849>. Acessado em: Maio de 2011.

WOLF, H. K.; MICHALOUPoulos, G. K. Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study proliferating cell nuclear antigen expression. *Hepatology*, v. 15, p. 707-713, 1992.

YOSHIDA, S.; YUNOKI, T.; AOYAGI, K.; OHTA, J.; ISHIBASH, N. Effect of Glutamine Supplement and Hepatectomy on DNA and Protein Synthesis in the Remnant Liver. *J Surg Res*; v. 59, p.475- 481,1995. In: JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G.

Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v.46, n. 3, p. 242-54, 2000.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápico e fitofármacos no Brasil. *Quim Nova*, v. 24, n.1, p. 147-152, 2001.

3. CAPITULO 2: Proliferative effect of aqueous extract of *Hyptis fruticosa* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats

Efeito proliferativo do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effect of aqueous extract of *Hyptis fruticosa* on hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats. **Methods:** Sixteen rats were divided in two groups: GC (Control Group) and HF (Whose rats received aqueous extract of *Hyptis fruticosa* during 4 days using the dose of 100 mg/kg/day). On the consecutive day of this treatment, the animals of both groups underwent hepatectomy of about 67% of liver. Twenty four hours later, they were sacrificed, and the remaining mass of liver was removed and prepared to be studied through the PCNA immunohistochemical technique. **Results:** The liver regeneration index of HF group was 53.56 ± 18.91 %, while in C group was 21.12 ± 8.29 % ($p= 0,0003$). **Conclusion:** These results show that the administration of aqueous extract of *Hyptis fruticosa* using the dose of 100mg/kg/day increased the hepatocyte proliferation in the group HF.

Keywords: Medicinal plants. Partial hepatectomy. PCNA. Liver regeneration. *Hyptis fruticosa*. Experimental surgery.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. **Métodos:** Dezesesseis ratos foram divididos em dois grupos: GC (grupo controle) e HF (ratos que receberam o extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* durante quatro dias na dose de 100 mg / kg / dia). No dia consecutivo deste tratamento, os animais de ambos os grupos foram submetidos a hepatectomia de aproximadamente 67% do fígado. Vinte e quatro horas depois, eles foram sacrificados, e que a massa restante do fígado foi retirado e preparado para ser estudado através da técnica de imuno-histoquímica PCNA. **Resultados:** O índice de regeneração hepática do grupo HF foi $53,56 \pm 18,91\%$, enquanto no grupo C foi de $21,12 \pm 8,29\%$ ($p = 0,0003$). **Conclusão:** Estes resultados mostram que a administração do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* na dose de 100mg/kg/dia aumentou a proliferação de hepatócitos no grupo HF.

Descritores: Plantas medicinais. Hepatectomia parcial. PCNA. Regeneração hepática. *Hyptis fruticosa*. Cirurgia experimental

3.1 INTRODUCTION

Hyptis fruticosa Salzm ex Benth is a plant from the Lamiaceaea family¹ and is popularly known in Brazil as “Alecrim do Campo” or “Alecrim de Tabuleiro”. This specie is about 0,5-1,5 m high and its leaves are aromatic, rhomboid and simple, and its flowers are clustered into axillary inflorescences, hermaphrodite and pentamer. It is popularly used to treat pain. Besides, it has been shown antinociceptive effect in mice². Two quinoids were isolated, from this plant, with antimicrobial and antineoplastic effect against Gram-positive microorganisms and mouse Erlich carcinoma studies, respectively³.

Studies using different species from the same gender were performed. It has been shown that the *Hyptis suaveolens* has positive effect on healing wounds⁴. The *Hyptis ovalifolia* has presented antimicrobial effect⁵. Also, the *Hyptis pectinata* has enhanced liver regeneration^{6,7,8}. However no article about the effect of *Hyptis fruticosa* on liver regeneration was found.

Considering that there are no studies defining the effects of this plant on liver, this research aimed at assessing the effects of *Hyptis fruticosa* leaves aqueous extract on liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats.

3.2 MATERIALS AND METHODS

A. Plant Material and Preparation of the Aqueous Extract

Hyptis fruticosa (Salzm. ex Benth.) Lamiaceae aerial parts were collected in September 2010, at “Feijão village” (10°56′S, 37°05′W), state of Sergipe, Brazil. The species was identified and authenticated by Dr. Adauto Souza Ribeiro. A voucher specimen of the plant (number ASE 01137) was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brazil. Its leaves were dried in an oven with air renewal and circulation (model MA-037) at 37°C until complete dehydration. Dried *Hyptis fruticosa* leaves were triturated in a blender until a finely granulated powder was obtained. The extract was obtained from this powder (100 g) by adding distilled water (3:10, w/v) under constant shaking for 4 hr at 35°C, followed by filtration (pH 6.0). The filtrate was lyophilized (aqueous

extract) and stored at 5°C. At the time of use, the extract was resuspended in distilled water at the desired concentrations.

B. Animals

The study was carried out on 16 male Wistar albino rats (300 to 450g). They were fed with a standard pellet diet and water *ad libitum* and kept at biotherium under natural light-dark cycle and environment temperature and humidity. All rats received humane care and the study protocol complied with the institution guidelines. All animals were randomly assigned to two groups, which consisted of eight rats each: CG, Control Group (n=8), whose rats received water daily for 4 days and HF, whose rats received aqueous extract of *Hyptis fruticosa* (HF group) during 4 days using the dose of 100 mg/kg/day. This dose showed no acute toxicity². On the consecutive day of this treatment, the animals of both groups underwent hepatectomy of about 67% of liver.

C. Surgical Procedure

The operations were always performed at the same time in order to avoid the influence of the changes in circadian cycle. All operations were performed under ether anesthesia. In order to improve anesthesia performance and prevent problems such as air pollution, unstable anesthesia level and anesthetic wastefulness, an ether vapourizator for little rodents was used^{9,10}. The median and left lateral lobes of the liver (corresponding to 67% of the organ) were excised¹¹. After surgery, the rats were on a normal diet for the whole experimental period. Twenty four hours later, they underwent a new operation to remove the remaining liver. Then they were sacrificed.

D. Liver Regeneration Analysis

Liver regeneration was evaluated by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using monoclonal primary anti-PCNA antibody (PC-10; DAKO A/S, Glostrup, Denmark) on formalin-fixed and paraffin-embedded liver tissues. Sections were cut at 4 µm, mounted on poly- L-lysine-coated glass slides, deparaffinized, rehydrated in an increasing alcohol series, placed in phosphate-buffered saline (PBS), and treated with 2% hydrogen peroxide in methanol for 15 min to block endogenous peroxidase activity. This

was followed by incubation with PC-10 monoclonal primary antibody, diluted 1:40 in PBS for 120 min at 25°C. The sections were then incubated for 35 min with a biotinylated horse anti-mouse immunoglobulin. The reaction product was detected with an avidin–biotin–peroxidase complex and diaminobenzidine was used as a chromogen substrate. Positive and negative controls were used to assess and control the staining procedure. Sections were examined blindly at high power (400×), and 20 fields were chosen at random. Nuclear labeling indexes for PCNA (positive nuclei/total number of counted nuclei) were determined by evaluation of at least 1000 hepatocyte nuclei, as previously described^{12,13}. The specimens were processed by a pathologist who did not know which group he belonged to the animal.

E. Statistical Analysis of Data

All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical comparisons among the groups were performed by Mann-Whitney test. Probability values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

F. Ethic

This research was approved by the Ethic Committee in Researches using Animals from Universidade Federal de Sergipe – UFS, with the protocol number 36/2005.

3.3 RESULTS

All data presented below were assessed 24 hr after 70% partial hepatectomy. The plant extract had been administered daily during 4 days, using the dose of 100 mg/kg of *Hyptis fruticosa* leaves aqueous extract, as previously explained. As presented in **Table 1**, the individual results of liver regeneration index by each rat of both groups was assessed by the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using monoclonal primary anti-PCNA antibody. **Figure 1**, shows the liver regeneration index in group HF was 53,56 % $\pm$ 18,91, significantly increased compared to control group that presented index of 21,12 % $\pm$ 8,29 ($p = 0,0003$).

Table. 1 Data presented as means and standard deviation (SD). Results of individual liver regeneration index. Liver regeneration was assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 24 hr after partial hepatectomy.

Control Group		HF Group	
Rat 1	11,72	Rat 1	46,69
Rat 2	18,51	Rat 2	41,50
Rat 3	20,41	Rat 3	35,31
Rat 4	23,39	Rat 4	43,01
Rat 5	25,37	Rat 5	83,05
Rat 6	16,15	Rat 6	54,90
Rat 7	14,96	Rat 7	41,39
Rat 8	38,45	Rat 8	82,68
Mean	21,12 ± 8,29	Mean	53,56 ± 18,91

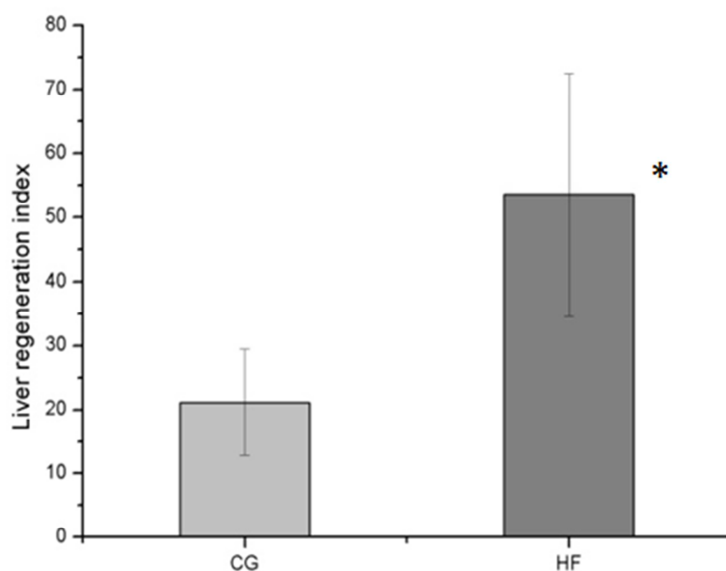


Figure 1 - Data presented as means and standard deviation of mean of liver regeneration index. The aqueous extract of *Hyptis fruticosa* (oral administration during 4 days before surgery) caused a significant increase at this parameter. Liver regeneration was assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 24 hr after partial hepatectomy. Statistical comparisons among the groups were performed by Mann-Whitney test *(p= 0,0003).

3.4 DISCUSSION

There are several studies intending to comprehend the hepatic regeneration mechanism. It is known that some substances affect this process of regeneration. One study showed that the immunosuppressant tacrolimus has stimulatory effect on the process of liver regeneration after partial hepatectomy in rats¹⁴. An important number of growth factors can stimulate hepatocyte DNA synthesis, on primary culture, as HGF (*hepatocyte growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor- α*) and EGF (*epidermal growth factor*). Some hormones participate on the liver regeneration process. The Norepinefrin acts on adrenergic α -1 receptors and amplifies the mitogenic signals of EGF and HGF¹⁵. The estradiol hexahydrobenzoate also promotes liver regeneration in rats submitted to a 70% hepatectomy¹⁶. The insulin together with glucagon stimulates the hepatocyte regeneration either *in vitro*¹⁷ or *in vivo*^{18,19}. The α 2b interferon inhibits the hepatocyte proliferation when administered after 2 or 12h of the hepatectomy²⁰.

Also, anatomical factors can interfere. For instance, the hepatic branch of left vagus is important for the maintenance of the regenerative ability of liver, and the hepatic vagotomy promotes a delay in DNA synthesis^{21,22}. Partial portal vein arterialization (PPVA) is a method of iatrogenic promotion of liver regeneration in the setting of acute liver failure treatment²³. The partial occlusion of hepatic venous drainage in rats subjected to partial hepatectomy prolongs the proliferation of liver cells when compared to animals with veins of normal caliber²⁴. These data shows that liver regeneration is a complex phenomenon affected by different factors.

In our study the aqueous extract of *Hyptis fruticosa* augmented the liver regeneration in about 2,5 times compared with the control group. Former studies presented similar results using the extract of another plant, the *Hyptis pectinata*^{6,7,8,25}. As these plants belong to the same genus, it is possible that both plants share factors that can stimulate the liver regeneration, although the mechanism of this effect is yet unknown. As the *Hyptis fruticosa* is a phytotherapeutic, it may contain different substances which perhaps produce different effects. For instance, studies show that it has either antimicrobial effect against Gram-positive microorganisms and antineoplastic against mouse Erlich carcinoma²⁶. Another study showed that *Hyptis fruticosa* has anti-inflammatory and antioxidant²⁷.

A study presented an antinociceptive effect of this plant². This effect is similar to the effect presented by the *Hyptis pectinata* in others studies²⁸. As the antinociceptive effect of

Hyptis fructicosa was reversed by naloxone, it also has been suggested that this may involve the activation of opioid receptors². Another study shows that the liver of rats with cholestasis express the preproenkephalin mRNA, which codes for the endogenous opioid peptide Met-enkephalin. Furthermore, Met-enkephalin immunoreactivity is detected in hepatocytes and in proliferating bile ductules in the cholestatic rat liver. This suggests that the opioids may have some effect on cholestatic liver and participate on liver regeneration²⁹. Thus, it is plausible that the *Hyptis fructicosa* effects on liver may be related with the activation of opioid receptors.

In contrast, the diterpenoid Horminone, a substance found in *Hyptis fructicosa* plants²⁶, was suggested to be toxic to the liver in rats³⁰. Other substances found in this plant are the taxodione and hyptol²⁶, however no publication about the effects of these substances on liver cells was found.

As there are few publications about the *Hyptis fructicosa* and the mechanism of liver regeneration may be influenced by different factors, new studies are necessary in order to isolate the substances presents and elucidate the mechanism which this plant enhance the liver regeneration.

3.5 CONCLUSION

The present study shows the aqueous extract of *Hyptis fructicosa* leaves at dose of 100mg/kg/day can stimulate the hepatic proliferation in rats.

3.6 REFERENCES

1. Almeida CFCBR, Albuquerque UP. Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. 2002; 45 (3): 343-53.
2. Silva ABL, Dias KS, Marques MS, Menezes IAC, Santos TC, Mello ICM, Lisboa ACCD, Cavalcanti SCH, Marçal RM, Antonioli AR. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Rev bras Farmacogn*. 2006 Dec; 16 (4): 475-9.
3. Araújo MD, Cavalcanti MD, Mélo JF, D'Albuquerque IL, Lima OG, Monache FD, Maciel GM. Antimicrobial substances of superior plants. 45. Primary observations of 2 new quinoids isolated from *Hyptis fruticosa* Salzm ex Benth(Labiatae). *Rev Inst Antibiot*. 1974; 14 (1-2):101-4.
4. [Shirwaikar A, Shenoy R, Udupa AL, Shetty S](#). Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian J Exp Biol*. 2003; 41 (3):238-41.
5. Souza LKH, Oliveira CMA de, Ferri PH. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98 (7):963-5.
6. Lima SO, Silva RL, Melo GB, Antonioli AR. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cir Bras*. 2002; 17 (3):101-5.
7. Lima SO, Melo GB, Silva RL, Antonioli AR. Efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial de 70%: Resultados Preliminares. *Acta Cir Bras*. 2001; 16 (1):13-15.
8. Melo GB, Melo VA, Lima SO, Antonioli AR. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. *Dig Dis and Sci*. 2005; 50 (5):949-54.
9. Souza F, Paes AMA, Alves HFP, Siroti FJ, Mathias PCF. Vaporizador de éter para cirurgia experimental em ratos. *Acta Cir Bras*. 1997; 12 (4):270-2.
10. Brito MVH, Brito NMB, Almeida AJ, Santos MRLC. Vaporizador artesanal de éter para cirurgia experimental em pequeno roedores. *Acta Cir Bras*. 1998; 13 (1):03-07.
11. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931; 12:186-202.
12. Ramalho FS, Ramalho LN, Castro-e-Silva O Jr, Zucoloto S, Corrêa FM. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepato gastroenterology*. 2002; 49(47):1347-51.
13. Castro-e-Silva O Jr, Zucoloto S, Menegazzo LA, Granato RG, Marcassa LG, Bagnato VS. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med*. 2001; 29(1):73-77.
14. Gama Filho O, Toderke EL, Baretta GAP, Sakamoto DG, Agulham MA, Tambara EM, Tambara EM, Matias JEF. Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia ampla em ratos. *Rev Col Bras Cir*. 2010 June; 37(3): 218-25.
15. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276:60-6.
16. Biondo-Simões MLP, Erdmann TR, Ioshii SO, Matias JEF, Calixto HLG, Schebelski DJ. The influence of estrogen on liver regeneration: an experimental study in rats. *Acta Cir Bras*. 2009 Feb; 24 (1): 3-6.
17. Richeman RA, Claus TH, Pilkis SJ, Friedman DL. Hormonal stimulating of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1976; 73:3589.
18. Bucher NLR, Swaffield MN. Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc Natl Acad Sci*. 1975; 72:1157-60.

19. Hwang TL, Chen MF, Chen TJ. Augmentation of liver regeneration with glucagon after partial hepatectomy in rats. *J Formos Med Assoc.* 1993; 92:725-8.
20. Theocharis SE, Margeli AP, Skaltsas SD, Skopelitou AS, Mykoniatis MG, Kittas CN. Effect of interferon-a 2b administration on rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Dig Dis Sci.* 1997; 42 (9):1981-6.
21. Lima SO, Ceneviva R, Martinelli ALC, Kajiwará JK, Zucoloto S, Castro-e-Silva O Jr. Role of the hepatic branch of the left vagus nerve in DNA synthesis by hepatocytes of rats subjected to partial hepatectomy. *Res in Surg.* 1993; 5 (3):181-3.
22. Lima SO, Ceneviva R, Martinelli ALC, Zucoloto S. Truncal vagotomy influences on hepatocytes DNA synthesis following partial hepatectomy. *Dis Dis Sci.* 1986; 31: 397.
23. Nardo B, Caraceni P, Montalti R, Puviani L, Bertelli R, Beltempo P, Pacilè V, Rossi C, Gaiani S, Grigioni W, Bernardi M, Martinelli G, Cavallari A. Portal vein arterialization: a new surgical option against acute liver failure? *Transplant Proc.* 2005; 37:2544-6.
24. Aguiar LRF de, Nassif PAN, Ribas CAPM, Nascimento MM do, Wiederker JC, Pachnicki JPA, Stieven-Filho E. Regeneração do fígado de ratos após oclusão parcial da drenagem venosa hepática. *ABCD arq bras cir dig.* 2009; 22 (2): 89-95.
25. Melo GB, Silva RL, Melo VA, Antonioli AR, Michellone PRT, Zucoloto S . Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras.* 2006; 21 suppl 1: S33-6.
26. Falcão DQ, Menezes FS. The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. *Rev Bras Farm.* 2003; 84 (3): 69-74.
27. Andrade AM, Oliveira JPR, Santos ALLM, Franco CRP, Antonioli AR, Estevam CS, Thomazzi SM. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. *Rev bras farmacogn.* 2010 Dec; 20 (6): 962-8.
28. Bispo MD, Mourao RH, Franzotti EM, Bomfi MKB, Arrigoni-Blank MF, Moreno MP, Marchioro M, Antonioli AR. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76: 81-6.
29. Nicoll J, Axiotis CA, Bergasa NV. The delta opioid receptor 1 is expressed by proliferating bile ductules in rats with cholestasis: Implications for the study of liver regeneration and malignant transformation of biliary epithelium. *Medical Hypotheses.* 2005; 65 (6):1099-105.
30. Ferreira R, Candeias F, Simões F, Nascimento J, Morais, JC. Effects of horminone on liver mixed function mono-oxygenases and glutathione enzyme activities of Wistar rat. *J Ethnopharmacol.* 1997; 58(1):21-30.

4. CAPITULO 3 - Efeito do extrato aquoso das folhas de *Baccharis trimera* sobre a proliferação dos hepatócitos após hepatectomia parcial em ratos

Effect of aqueous extract of the leaves of *Baccharis trimera* on the proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in rats

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas da *Baccharis trimera* sobre a capacidade proliferativa do fígado após a hepatectomia parcial (HP) em ratos.

Métodos: 20 ratos da raça Wistar pesando entre 300 a 450 gramas foram divididos em dois grupos: controle (HP) e teste (HP100- ratos que receberam o extrato aquoso da *Baccharis trimera* durante quatro dias na dose de 100 mg/Kg/dia). No quinto dia, os animais de ambos os grupos foram submetidos à ressecção de aproximadamente 70% do fígado. Vinte e quatro horas depois, eles foram sacrificados e o fígado remanescente foi retirado e preparado para ser estudado através da técnica de imuno-histoquímica PCNA. A análise dos dados para comparação entre os dois grupos foi realizada por intermédio do teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados: em todos os animais estudados foi verificado imunomarcção nuclear positiva mais abundante nos hepatócitos localizados nas regiões interlobulares do fígado. A análise quantitativa das células PCNA-positivas revelou Índices de Positividade médios significativamente maiores ($p=0,02$) no grupo HP100 ($77,1\pm13,6$) quando comparados ao grupo HP ($45,8\pm12,9$).

Conclusão: a administração do extrato aquoso das folhas de *Baccharis trimera*, na concentração de 100 mg por quilo de animal, exerce significativo efeito positivo sobre a regeneração hepática em ratos.

Palavras chaves: Plantas medicinais. Hepatectomia. PCNA. Regeneração hepática. *Baccharis trimera*.

SUMMARY

Objective: To evaluate the effect of aqueous extract of the leaves of *Baccharis trimera* on the proliferative capacity of the liver after partial hepatectomy (PH) in rats.

Methods: 20 Wistar rats weighing between 300 and 450 grams were divided into two groups: control (HP) and test (HP100-rats that received the aqueous extract of *Baccharis trimera* for four days at a dose of 100 mg / kg / day). On the fifth day, animals from both groups underwent resection of approximately 70% of the liver. Twenty-four hours later they were sacrificed and the remnant liver was removed and prepared for study using the technique of immunohistochemistry PCNA. Data analysis for comparison between the two groups was made through the non-parametric statistical test Mann-Whitney test.

Results: In all animals studied was found positive immunohistochemical nuclear staining more abundant in hepatocytes located in the interlobular regions of the liver. Quantitative analysis of PCNA-positive cells revealed positivity rate significantly higher mean ($p = 0.02$) in HP100 group (77.1 ± 13.6) compared to the HP group (45.8 ± 12.9).

Conclusion: Administration of aqueous extract of the leaves of *Baccharis trimera*, at a concentration of 100 mg per kilogram of animal, has a significant positive effect on liver regeneration in rats.

Keywords: Medicinal plants. Hepatectomy. PCNA. Liver regeneration. *Baccharis trimera*.

4.1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão que quando perde parte de seu parênquima, por injúria química, viral, perda traumática acidental ou por hepatectomia parcial (HP), tem capacidade de proliferação. Ele consegue restaurar a massa hepática perdida através de uma hiperplasia global do parênquima restante¹. Muitas substâncias têm sido experimentadas em animais parcialmente hepatectomizados para avaliar as suas atuações no processo regenerativo² e os produtos a base de plantas *in natura* aparecem como um importante segmento nesta busca³.

Apesar de o Brasil possuir uma flora extremamente rica e uma tradição no uso de plantas medicinais, na maioria das vezes, esta é fundamentada somente no conhecimento popular, sem nenhuma comprovação pré-clínica ou clínica⁴. Entre as várias plantas utilizadas como fitoterápicos tem-se a *Baccharis trimera*, popularmente conhecida como carqueja, encontrada por toda a América do Sul. O primeiro registro escrito no Brasil do uso da carqueja é de 1931, empregada na forma de infusão de folhas e ramos para o tratamento da esterilidade feminina e da impotência masculina, atribuindo-lhe ainda propriedades tônicas, febrífugas e estomáticas^{5,6,7,8}. Na última década, o seu uso medicinal aumentou, principalmente para a solução de problemas hepáticos, disfunções digestivas, diabetes, obesidade e reumatismo^{9,10}. Em função do grande número de afecções hepáticas, do uso popular da carqueja e da inexistência de trabalhos científicos do efeito desta planta na regeneração hepática objetivou-se avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas da *Baccharis trimera* sobre a capacidade proliferativa do fígado após a hepatectomia parcial em ratos.

4.2 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa esteve de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e obteve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Tiradentes com o cadastro 17062005.

As folhas de *Baccharis trimera* foram adquiridas secas no Mercado Tales Ferraz, identificadas pelo Prof. Dr. Lauro Xavier, biólogo e pesquisador do Instituto de Tecnologia e

Pesquisa da Universidade Tiradentes. Estas foram pesadas, trituradas em moinho elétrico até que um pó de fina granulação foi obtido. Fez-se o extrato a partir do pó, acrescentando-se água destilada (3:10, p/v) sob agitação constante por 4 horas a 35°C, em seguida, filtrado (pH=6,0), liofilizado e armazenado a 5°C. No momento do uso, o extrato foi dissolvido em água destilada na concentração desejada.

Nos quatro dias antecedentes ao procedimento cirúrgico, os 20 ratos pesando de 300 a 450 gramas utilizados no estudo foram mantidos em biotério, com ciclo de claro-escuro natural, temperatura e umidade próprios do ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum*. Nesse período, o grupo de estudo correspondente a 10 ratos (HP100) recebeu 100 mg/kg de extrato aquoso de *Baccharis trimera* e os 10 animais do grupo controle (HP), água em quantidade semelhante, sem o extrato da planta. As administrações foram feitas por gavagem sempre no mesmo horário, em uma dose ao dia.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre no mesmo horário, para evitar influência das variações do ciclo circadiano. O anestésico utilizado foi o éter etílico devido ao fato de não possuir potencial hepatotóxico, como gases anestésicos halogenados, e não induzir o metabolismo de drogas ao nível do sistema microssomial hepático, como os barbitúricos. Após a tricotomia da parede abdominal foi realizada anti-sepsia com polivilpirrolidona iodo.

O acesso à cavidade peritoneal foi feito a partir de laparotomia mediana de cerca de 4 cm do apêndice xifóide em direção caudal. Nos dois grupos realizou-se a ressecção dos lobos lateral esquerdo e mediano do fígado ligando-se seus pedículos com fio de algodão 3-0. Esta ressecção equivale a hepatectomia de aproximadamente 70%. A parede abdominal foi fechada em dois planos com suturas contínuas de mononáilon 4-0, o peritônio e a aponeurose num plano profundo e a pele, num plano superficial. Após 24 horas foi realizada nova laparotomia mediante a mesma técnica anestésica, com o intuito de retirar o fígado remanescente, e os animais foram sacrificados.

Foram utilizadas lamina silanizadas para evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Obteve-se cortes histológicos de 4 mm de espessura a partir de amostras teciduais fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina. Os espécimes foram processados através da técnica imunohistoquímica pelo método da Estreptoavidina-Biotina, utilizando anticorpos monoclonais anti-PCNA na diluição de 1:80 (clone PC-10; DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Os cortes foram submetidos à recuperação

antigênica através de tratamento por microondas (700W), realizando-se 3 ciclos de 5 minutos cada em ácido cítrico 10mM (pH 6.0). Após a incubação com os anticorpos primários e secundários, assim como com o complexo Estreptoavidina-Biotina (kit SABC, DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca), procedeu-se a revelação dos cortes utilizando-se solução cromógena de diaminobenzidina a 0,03% e contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

Após a marcação imunohistoquímica foi realizada uma análise quantitativa da expressão das proteínas PCNA, na qual foi contado o número de células imunomarcadas em 1.000 selecionadas aleatoriamente em secção histológica. Assim, para cada caso foram confeccionadas 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm; em cada lâmina foram fotomicrografados 10 campos histológicos (ampliação de 400x) selecionados por casualização sistemática. Desta forma, os campos foram selecionados da esquerda para direita e de cima para baixo; para cada campo selecionado seguiu-se dois campos desprezados, até atingir o total de 10 campos. As imagens fotomicrografadas foram digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000®. Foram considerados PCNA positivas, os hepatócitos que apresentavam imunorreatividade restrita ao núcleo, representada por coloração de cor acastanhada e/ou amarelada, independente da intensidade da coloração. Para contagens de células positivas, foi utilizado software UTHSCSA ImageTool®, versão 3.0. Por fim foi obtido um índice de positividade (IP) para cada proteína investigada através da fórmula abaixo descrita:

$$IP = \frac{\text{Número de células positivas}}{1.000 \text{ células aleatoriamente}} \times 100$$

1.000 células aleatoriamente

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o *software* de análise estatística SPSS 6.0, por intermédio do teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os dois grupos.

4.3 RESULTADOS

Em todos os animais estudados verificou-se imunopositividade do PCNA sendo a marcação escassa na região circunjacente a veia centrolobular hepática e mais abundante nas regiões interlobulares (figura 1). A análise quantitativa das células PCNA-positivas

revelou IPs médios significativamente maiores ($p=0,02$) no grupo HP100 ($77,1\pm13,6$) quando comparados ao grupo HP ($45,8\pm12,9$)(figura 2).

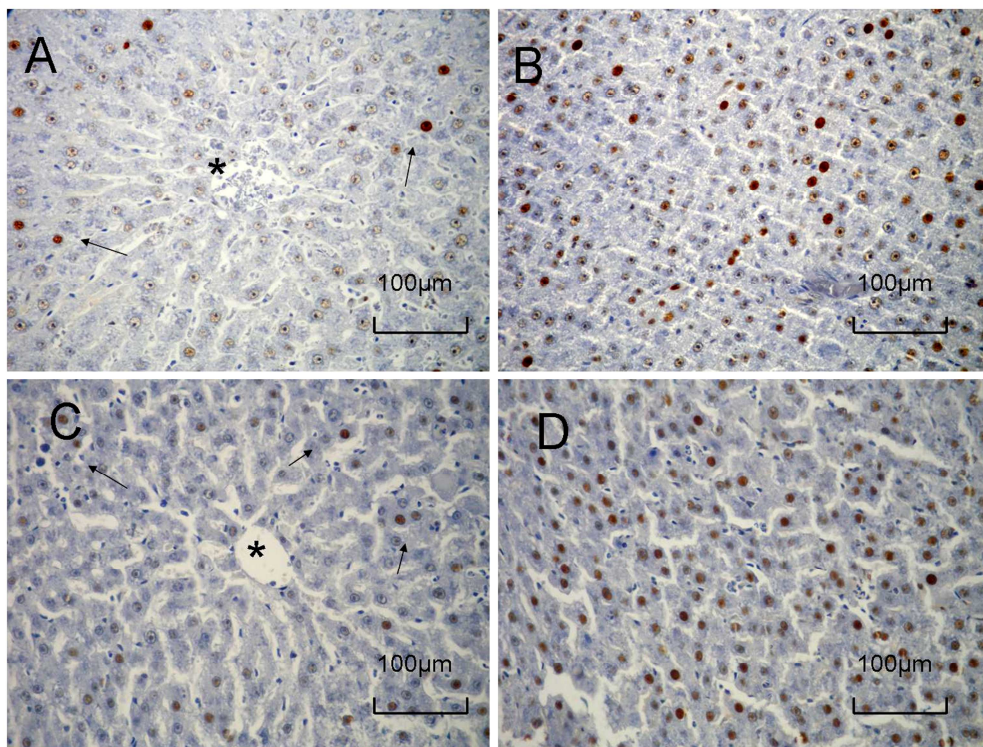


Figura 1. Regiões centrolobular e interlobular dos grupos controle (A e B) e teste (C e D), exibindo imunomarcção nuclear positiva para PCNA. Notar que os hepatócitos imunomarcados (setas) são escassos na região imediatamente circunjacente a veia centrolobular (*) e abundantes nas regiões interlobulares em ambos os grupos (SABC, 200x).

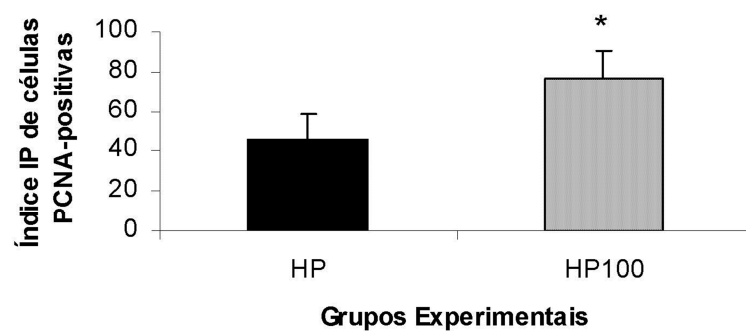


Figura 2. Índice médio de positividade (IP) de células PCNA-positivas nos grupos experimentais. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$).

4.4 DISCUSSÃO

A população brasileira já se habituou à utilização de espécies vegetais amargas quando tem problemas hepáticos ou relacionados com digestão e a carqueja é uma das espécies mais utilizadas nesta ocasião¹¹. O fígado metaboliza as substâncias absorvidas pelo tubo digestivo expondo-se aos seus componentes, por isso muitas plantas usadas empiricamente no tratamento de desordens hepáticas têm merecido comprovação científica. Estas podem não produzir efeito, causar benefício ou, em contra partida, ser tóxica a este órgão¹².

Estudos fitoquímicos da carqueja revelaram a presença de terpenos, carquejol, derivados clerodane, saponinas e glicosídeos além de flavonóides^{13,14}. Vários efeitos biológicos dessas substâncias têm sido estudados e se atribui aos flavonóides muitos desses efeitos, a exemplo de atividades anti-inflamatória, antialérgica, anticarcinogênica¹⁵, além de antioxidante, hepatoprotetora¹⁶ e relaxante da musculatura lisa¹⁴. A ocorrência natural nesta planta desses compostos constituiu o interesse para a avaliação do efeito do extrato da *Baccharis trimera* na proliferação hepática.

A restauração da massa hepática após hepatectomia parcial em humanos parece ocorrer em duas a três semanas, e se completa após três meses^{17, 18}. Devido às limitações no uso de fígado humano para o estudo da regeneração, a maioria das informações sobre este processo tem sido proveniente de modelos *in vivo* com pequenos animais (ratos e camundongos) ou utilizando células hepáticas em cultura (*in vitro*)¹⁹. O processo proliferativo hepático em ratos assemelha-se ao da proliferação do fígado humano, o que justifica seu amplo uso em várias áreas da pesquisa biomédica (endócrina, celular, genética e molecular)²⁰. Optou-se na presente pesquisa por ratos devido ao baixo custo tanto de aquisição como de manutenção e por apresentarem elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico. Escolheu-se animais jovens visto que a idade pode comprometer a resposta regenerativa pós-hepatectomia parcial²¹ e do gênero masculino visando atenuar a reconhecida influência dos estrógenos na regeneração hepática²². Para avaliar a atividade proliferativa do hepatócito foi utilizado o PCNA por ser uma proteína nuclear que está associada com o ciclo celular, ser essencial para a síntese de DNA e sua coloração funcionar como um marcador das células que estão em reprodução²³.

A presença de células imunopositivas em maior quantidade próximo ao espaço porta verificado nos dois grupos estudados corrobora ao fato de cerca de 80% da síntese de DNA ocorrer na proximidade desse espaço, indicando que os hepatócitos localizados nas regiões interlobulares replicam o DNA mais precocemente que aqueles próximos à veia

centrolobular²⁴. É provável que este achado esteja relacionado ao fato de os fatores envolvidos na proliferação hepática chegarem primeiro nas regiões interlobulares por serem carreados principalmente pela veia porta.

A análise quantitativa das células PCNA-positivas revelou IPs médios significativamente maiores ($p=0,02$) no grupo que fez uso da carqueja, o que demonstra o efeito estimulante da *Baccharis trimera* na regeneração do fígado de ratos. Achados semelhantes foram verificados com a utilização de outros extratos de plantas como a *Hyptis pectinata*²⁵ e *Sida cordifolia*³. Esse efeito positivo na proliferação dos hepatócitos pode estar relacionado com a propriedade antioxidante dos flavonóides, pois estes regulam as atividades de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares e atuam sobre a expressão gênica²⁶. Vários antioxidantes clássicos têm se mostrado protetor dos hepatócitos contra a peroxidação lipídica e inflamação, evitando assim a ocorrência de necrose hepática²⁷. Além disso, pode estar relacionado à atividade vasorelaxante do extrato da *B. trimera*¹⁴, pois com o relaxamento da musculatura lisa pode ocorrer um aumento no fluxo sanguíneo para o fígado e com isso um maior aporte de substâncias que participam do processo proliferativo do hepatócito.

Pesquisas sobre a regeneração hepática e de fatores que podem acelerar esse processo tem uma importante relevância para a área da saúde¹. Este estudo pioneiro, portanto merece ser complementado com o intuito de identificar os princípios ativos presentes na *Baccharis trimera* e os mecanismos que participam no estímulo da proliferação do hepatócito.

Conclui-se que a administração do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Baccharis trimera*, na concentração de 100mg por quilo de animal, exerce significativo efeito positivo na proliferação do fígado de ratos.

4.5 REFERÊNCIAS

1. Biondo-Simões MLP, Matias F, Martone D, Barbosa RF, Ogawa GH. Influência da glutamina na regeneração hepática. *Rev Med.* 2007; 86(4): 219-23.
2. Pahlavan PS, Feldmann RE Jr, Zavos C, Kountouras J. Prometheus`challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *J Surg Res.* 2006; 134(2):238-51.
3. Silva ABL, Dias KS, Marques MS, Menezes IAC, Santos TC, Mello ICM, Lisboa ACCD, Cavalcanti SCH, Marçal RM, Antoniolli AR. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Rev bras Farmacogn.* 2006 Dec; 16 (4): 475-9.
4. YUNES RA, PEDROSA RC, CECHINEL FILHO V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápico e fitofarmacos no Brasil. *Quim Nova.* 2001; 24(1): 147-52.
5. LORENZI H, MATOS FJA. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum; 2002.
6. Biavatti M, Marensi V, Leite SN, Reis A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17: 640-53.
7. Agra MF, França PF, Barbosa-filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17: 114-40.
8. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2008; 18: 472-508.
9. Auler NMF. *Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de Baccharis trimera (Less) DC. (carqueja) no Sul do Brasil.* Santa Maria. Tese [Doutorado] - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria; 2004.
10. Carreira RC. *Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.* São Paulo. Tese[Doutorado] - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente; 2007.
11. Borella JC, Fontoura A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2002; 12: 63-7.
12. Ross MH, Rowrell LJ. *Histologia - Texto e Atlas* - Ed. Médica Panamericana 1993.
13. Soicke H, Leng-Peschlow A. Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Medica.* 1987: 37-9.
14. Torres LMB, Gamberini MT, Roque NF, et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry.* 2000; 55: 617-19.
15. Rodrigues CRF, Dias JH, Melo RN, Richter MF, Picada JN, Ferraz ABF. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 2009; 125 (1), 97-101.
16. Paul EL, Lunardelli A, Caberlon E, Oliveira CB, Santos RCV, Biolchi V, Bastos CMA, Moreira KB, Nunes FB, Grace G, JR de Oliveira. Antiinflammatory and

- Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and Lymphoproliferation In Vitro. *Inflammation*. 2009; 32 (6): 425-429.
17. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. *Ann of Surgery*.1987; 206(1): 30-39.
 18. Khan AZ, Mudan SS. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. *ANZ Journal surgery*.2007; 77: 9-14.
 19. Koniaris LG, Mckillop I, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *Journal of the American college surgeons*. 2003; 197,(4): 634-48.
 20. Rosal MA, Gonçalves WJ, Alves MTS, Baracat EC, Lima GR. Análise histopatológica e imuno-histoquímica (Antígeno nuclear de proliferação celular) de pacientes com carcinoma cervical incisivos antes e após cirurgia. *Rev Assoc Med Bras*. 2002; 48(1): 32-5.
 21. Bucher NRL, Patel U, Cohen S. Hormonal factors concerned with liver regeneration. In: Porter R, Whelan J. *Hepatotropic factors – CIBA Foundation Symposium*. Amsterdam: Elsevier; 1978.
 22. Francavilla A, Barone M, Todo S, Zeng QH, Porter KA, Starzl TE. Augmentation of rat liver regeneration by FK506 compared with cyclosporin. *Lancet*. 1989; 2(8674):1248-9.
 23. Seeram NP, Heber D. 2006. Impact os berry pytochemicals on human health: effects beyond antioxidation. In *Lidid Oxidation and Antioxidants: chemistry, Methodologies and Health Effects*; ACS Symposium Series 956; Ho, CT., Shahidi, FS. Eds. Oxford University Press: New York, 2006; Chapter 21.
 24. Pocock G, Richards CD. **Fisiologia humana: a base da medicina**. 2. Ed. rev. Ampl. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 427p.
 25. Silva R L, Melo GB, Antonioli AR, Lima SO, Melo VA, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Castro e Silva Jr O. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.17, S. 3, 2002
 26. Ramalho FS. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. *Rev Acta Cir Bra*. 2000; 15 supl (2).
 27. Ito CS, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, *et al*. Atividade Fungitóxica do Extrato Bruto de *Baccharis trimera*. 2002 Mar [4 telas disponíveis] Disponível em:<http://Www.Cca.Uem.Br>

5. CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS – A inserção da Pesquisa na Temática Saúde e Ambiente e na Ótica Interdisciplinar:

O trabalho com o tema **EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Hyptis fruticosa* E *Baccharis trimera* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DO FÍGADO APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL EM RATOS** foi desenvolvido na perspectiva de duas linhas de pesquisa do programa de mestrado saúde e ambiente da Universidade Tiradentes: Linha 2 – Enfermidades e Agravos à Saúde de Impacto Regional, na área de atuação - Avaliação experimental de plantas medicinais regionais; e na Linha 3 – Produtos Naturais e Saúde, na área de atuação – aplicação de produtos naturais em saúde.

No Mundo, crescem as pesquisas científicas na área de produtos naturais. A população costuma fazer uso de muitas espécies de plantas de forma empírica sem nenhum respaldo científico quanto a eficácia e a segurança, o que justifica estudos nesta área. É importante que se conheça as plantas da região que são utilizadas como medicinais, em Sergipe a *Hyptis fruticosa*, popularmente conhecida como “alecrim do campo” e a *Baccharis trimera*, conhecida como carqueja, são utilizadas empiricamente para doenças do trato gastrointestinal. Paralelamente, um número grande da população é acometida por doenças do fígado, como: hepatite, cirrose, neoplasias e traumas. Várias destas pessoas necessitarão de uma hepatectomia parcial como forma de tratamento, desta forma, qualquer alternativa que busque diminuir o tempo de pós-operatório é importante. Estudos tem sido realizados na tentativa de compreender melhor o mecanismo de regeneração do fígado e de novas substancias que acelerem esse processo.

A natureza interdisciplinar desta pesquisa está bem expressa na clara inter-relação entre profissionais de diversas áreas do saber envolvidos na sua execução, dentre eles: cirurgião geral, hepatologistas, enfermeiros e acadêmicos de medicina e enfermagem – na realização dos procedimentos cirúrgicos e cuidados dos animais; biólogos e acadêmicos de biologia – na seleção de peso e preparo do extrato da planta; Patologista – na análise morfológica das lâminas.

Outrossim, além da relevância da pesquisa e da contribuição para a construção do conhecimento interdisciplinar sobre os produtos naturais e seu impacto regional, espera-se a sua publicação no meio científico em revista indexada nacionalmente, desde de que, o trabalho sobre o efeito do extrato aquoso da *H. fruticosa* foi enviado para Acta Cirurgica

Brasileira e o estudo do efeito do extrato aquoso da B. trimera esta em fase final de formatação para envio à Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.

ANEXO

I – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito do extrato aquoso da Hyptis fruticosa sobre a proliferação dos hepatócitos após hepatectomia parcial", sob coordenação da Profa. Dra. Sônia Oliveira Lima, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 18/07/2005.

São Cristóvão, 18 de julho de 2005

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Flavia", is written over a horizontal line.

Profª. Drª. Flavia Teixeira Silva
Presidentê do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

