

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**O EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Peumus
boldus* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DOS
HEPATÓCITOS E FUNÇÃO DO FÍGADO EM RATOS
SUBMETIDOS A HEPATECTOMIA ALARGADA**

MARIA BERNADETE GALRÃO DE ALMEIDA FIGUEIREDO

Aracaju
Março-2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**O EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Peumus boldus* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DOS
HEPATÓCITOS E FUNÇÃO DO FÍGADO EM RATOS
SUBMETIDOS A HEPATECTOMIA ALARGADA**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de
Mestre em Saúde e Ambiente.

Linha de Pesquisa: Biodiversidade e Saúde

MARIA BERNADETE GALRÃO DE ALMEIDA FIGUEIREDO

Orientadoras:

Professora Doutora Sonia Oliveira Lima
Professora Doutora Juliana Cordeiro Cardoso

Aracaju
Março-2016

**O EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Peumus boldus*
SOBRE A PROLIFERAÇÃO DOS HEPATÓCITOS E FUNÇÃO
DO FÍGADO EM RATOS SUBMETIDOS A HEPATECTOMIA
ALARGADA**

MARIA BERNADETE GALRÃO DE ALMEIDA FIGUEIREDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE.

LINHA DE PESQUISA: BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Aprovada em: ____/____/____.

Sonia Oliveira Lima, D.Sc. (Orientadora)

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc. (Orientadora)

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque, D.Sc. (Examinador)

Richard Halti Cabral, D. Sc. (Examinador Externo)

Valdinaldo Aragão de Melo, D. Sc. (Examinador Suplente)

*Dedico esse trabalho às mulheres da
minha vida: minha mãe, eterno modelo
de mestra e educadora; e minha filha,
força que me impulsiona a novas
aventuras.*

AGRADECIMENTOS

Devo sinceros agradecimentos àqueles que, de alguma forma, me ajudaram com o trabalho que hoje, concluo.

Começo agradecendo a minha mãe, mulher de fé e ética inabaláveis, que me ensinou que idade não é barreira para a magia do aprender.

Agradeço, também, a Gilson e a Aninha pela paciência e carinho, em meus tantos momentos de impaciência e ausência.

Como dizia o *poetinha* Vinícius de Moraes, “...a vida é a arte do encontro...”. E eu sou agradecida à vida por ter me proporcionado o (re)encontro com minha professora e orientadora Dra. Sonia Oliveira Lima que, após longas conversas de orientação e incentivo, se tornou amiga querida. Obrigada, *Soninha*, por ter me dado a chance de retomar minha profissão na melhor das situações: compartilhando os ensinamentos como professora.

Agradeço, ainda, a Dra. Juliana Cordeiro Cardoso pelo apoio quando procurada, sempre me facilitando respostas. E a vc, Dr. Ricardo Luiz, que demonstrou, para comigo, todo carinho e “expertise” do mestre que é. Em nome de vocês agradeço aos outros professores do curso, aos funcionários do administrativo e do biotério.

Agradecimento especial à amiga Nadja, que me trouxe para a Universidade Tiradentes, instituição que aprendi a admirar e me orgulho dela participar. A Everton e a Teca, sempre dispostos quando solicitados a me guiar nos conhecimentos da informática. E aos “meninos e meninas” da turma do Mestrado 2014, que serão inesquecíveis por onde passarem.

E como esquecer de agradecer a vocês, Mel, Pereira, Cris, Gina, Thais e Tanit, amigas-irmãs, que me apoiaram e me alentaram nos momentos de cansaço e desespero. Desculpem nomeá-las sem sobrenomes ou títulos. Mas tento, dessa forma, quebrar o protocolo dessa dissertação, mostrando todo meu carinho e amor por vocês.

Enfim, agradeço a minha Mãe do Céu, na confiança de que, com Ela, nada me faltará.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Anatomia funcional do fígado.....	17
2.2 Afecções do fígado.....	23
2.3 Proliferação do parênquima hepático	24
2.4 Avaliação da proliferação.....	31
2.5 Fatores que estimulam a proliferação.....	36
2.6 Plantas medicinais.....	40
2.7 <i>Peumus boldus</i>	43
3 OBJETIVOS	51
3.1 Geral	
3.2 Específicos	
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Obtenção do extrato do extrato aquoso do <i>Peumus boldus</i>	52
4.2 Animais e delineamento experimentais.....	52
4.3 Procedimento cirúrgico e estado clínico dos animais	54
4.4 Avaliação macroscópica e peso do fígado	55
4.5 Interpretação dos resultados da imunohistoquímica.....	55
4.6 Análise histológica do fígado....	56
4.7 Método de análise sorológica da função hepática.....	57
4.8 Análise estatística.....	57
4.9 Aspecto ético da pesquisa.....	57
5 RESULTADOS.....	58
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÃO.....	70

8 PERSPECTIVAS FUTURAS	70
9 REFERÊNCIAS.....	71
10 ARTIGO SUBMETIDO	97
11 ANEXOS	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos animais em oito grupos de acordo com o delineamento experimental

Tabela 2: Peso o corpo dos animais submetidos a hepatectomias de 70% e tratados com água destilada e 100 mg/Kg de EAPB

Tabela 3 : Peso de fígado dos animais submetidos a hepatectomias de 70% e tratados com água destilada e 100 mg/Kg de EAPB

Tabela 4. Escores médios de intensidade das alterações histopatológicas hepáticas nos dois grupos estudados

Tabela 5: Análise bioquímica dos parâmetros sorológicos dos animais submetidos a hepatectomias de 70% e tratados com água destilada e 100 mg/Kg do EAPB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Segmentação hepática de acordo com Couinaud (1954)

Figura 2. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 400x): lóbulo hepático (Hp: hepatócitos; Si:sinusoides)

Figura 3. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 100x): lóbulo hepático delineado (forma hexagonal); a seta mostra a veia centro-lobular; os espaços-porta estão nos vértices dos poliedros marcados com linhas tracejadas veia centro-lobular

Figura 4. Colangiografia intra-operatória: 1) ducto hepático direito; 2) ducto hepático esquerdo; 3) ducto hepático comum; 4) ducto cístico; 5) colédoco

Figura 5. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 100x), zonas do ácino hepático: 1- zona periportal, 2- zona mediolobular, 3- zona centro-lobular

Figura 6. a) esboço original da descrição anatômica e vascular do fígado de rato, feita por Madrahimov (2006); **b)** peça anatômica: 1- porção direita do lobo mediano; 2- porção esquerda do lobo mediano; 3- porção superior do lobo direito; 4- lobo lateral esquerdo; 5- porção inferior do lobo direito; 6-lobo caudado inferior; 7-lobo lateral esquerdo

Figura 7. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 100x): acumulação intracitoplasmática de lípidos, que ocupa praticamente todo o citoplasma de cada hepatócito

Figura 8. Estrutura química da boldina (S) -2,9 dihiroxi-1, 10-dimetoxi-aporfina: (C₁₉H₂₁NO₄)

Figura 9. Estrutura química da catequina (C₁₅H₁₄O₆) e da quercetina (C₁₅H₁₀O₇)

Figura 10. Estrutura química do escaridol (C₁₀H₁₆O₂)

Figura 11. Etapas do processo de preparação do extrato aquoso de *Peumus boldus*

Figura 12: a) apresentação macroscópica do fígado no primeiro momento cirúrgico: parênquima liso, friável e de cor marrom avermelhada escura, típico do órgão com grande aporte sanguíneo; **b)** apresentação macroscópica do fígado remanescente, durante o segundo momento cirúrgico: o parênquima apresenta-se marcheteado e amarelado, devido à infiltração gordurosa após o trauma cirúrgico

Figura 13. Análise de sobrevivência dos animais submetidos a hepatectomia de 70 e 80%

Figura 14. Secções histológicas coradas em hematoxilina/eosina (H/E) mostrando as principais alterações histopatológicas do parênquima e estroma hepáticos observadas nos grupos estudados. **(A)** Vacuolização não lipídica compatível com degeneração hidrópica em animal do grupo tratado com EAPB e **(B)** vacuolização lipídica consistente com esteatose macrovesicular em amostra de animal tratado apenas com água destilada. **(C)** Corpo apoptótico e **(D)** área de necrose (ne) circundada por parênquima viável (pv) em amostras hepáticas de animal tratado apenas com EAPB e água destilada, respectivamente. **(E)** Reação inflamatória focal intraparenquimatosa (seta) e **(F)** inflamação portal difusa (inf) associada a áreas hemorrágicas focais (hf) em amostras hepáticas de animal tratado com água destilada

Figura 15: índice proliferativo das amostras dos fígados remanescentes após 24 h de hepatectomia alargada (70%) nos grupos experimentais (teste de t de Student).

Figura 16: **a)** marcação para o antígeno Ki67 em secção histológica de tecido hepático de rato hepatectomizado a 70% e tratado com água destilada; **b)** marcação forte e difusa para o antígeno Ki67 em secção histológica de tecido hepático de rato hepatectomizado a 70% e tratado com o EAPB

Figura 17: Secções histológicas mostrando o resultado da imunohistoquímica de fígados de rato 24 horas após hepatectomia parcial a 80%; **a)** grupo HP100/80 **b)** grupo HP80/200 (as setas mostram hepatócitos marcados pelo Ki-67)

LISTA DE ABREVIATURA

- ALT** – Alanine aminotransferase (alanino amino transferase)
- ANOVA** – Analise of varience (Análise de Variância Simples)
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AST** – Aspartate aminotransferase (aspartato amino transferase)
- BD**- Bilirrubina direta
- BI** – Bilirrubina indireta
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DNA** – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
- DP** – Desvio Padrão
- EAPD**- Extrato aquoso de *Peumus boldus*
- FA** – Fosfatase alcalina
- FIEAM**- Federação da Indústria do Estado do Amazonas
- Gama-GT ou GGT**–Gama glutamil transpetidase
- HGF** – Hepatocyte growth factor (fator de crescimento do hepatócito)
- HP** – Hepatectomia
- HPB** – Hepatectomia associada ao uso do extrato aquoso do boldo (*Peumus boldus*)
- IMC** – Índice de hepatócitos marcados
- ITP** – Instituto de Tecnologia e Pesquisa
- NAFLD** – Non-alcoholic fatty liver disease
- NASH** – Non-alcoholic steato-hepatitis
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- ONU** - Organização das Nações Unidas
- PNPIC** - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
- PNPMF**- Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
- RENISUS** – Relação Nacional das Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
- SUS** - Sistema Único de Saúde
- TGO** – Transaminase glutamo-oxaloacética
- TGP** – Transaminase glutamopirúvica
- TZT** – Estreptozotocina

RESUMO

O tecido hepático sofre agressões diárias que podem levar ao aparecimento de lesões que necessitam de tratamento cirúrgico, com ressecções alargadas do fígado, órgão considerado centro metabólico do corpo. No presente trabalho, 45 ratos da raça Wistar, pesando entre 250 a 350 gramas, foram divididos em seis grupos: Sham, HP70, HP80, HP70/100, HP80/100 e HP80/200. Os animais do grupo Sham foram submetidos, durante a primeira laparotomia, à manipulação do fígado e os animais dos grupos HP70 e HP80 foram submetidos a hepatectomias parciais de 70 e 80%. Os animais dos grupos HP70/100, HP80/100 e HP80/200 foram tratados, com 100mg/Kg e 200mg/Kg do EAPB (extrato aquoso de *Peumus boldus*), uma vez ao dia, por via oral, nos 4 dias antecedentes ao primeiro procedimento cirúrgico. Os ratos dos grupos Sham e HP foram tratados, durante os quatro dias que antecederam a primeira cirurgia, com água destilada por via oral, uma vez ao dia, em volume semelhante ao dos grupos teste HP. Após 24 horas foi realizada segunda laparotomia para a retirada dos fígados dos ratos do grupo Sham e dos fígados remanescentes dos ratos dos grupos HP para o estudo da proliferação de hepatócitos, através da técnica de imunohistoquímica Ki67. Nesse mesmo tempo cirúrgico foi feita a coleta de 2 mL de sangue da veia cava inferior, de todos os animais para avaliação sorológica do colesterol, glicemia, triglicérides, aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase, fosfatase alcalina, como também da bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta. Verificou-se ainda o percentual de sobrevivência ao primeiro ato cirúrgico e agilidade do animal. A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva, em que as variáveis categóricas foram apresentadas em frequências absolutas e relativas e as variáveis numéricas foram apresentadas através de medidas de tendência central e variabilidade. As características dos grupos foram comparadas pelo Qui-Quadrado (X^2) e no caso das variáveis categóricas e pelo teste T de Student para amostras independentes, no caso das variáveis numéricas. Os dados não gaussianos foram analisados usando o teste de Mann-Whitney. O critério de significância estatística estabelecido foi o $p < 0,05$. Como resultados observou-se a mortalidade de todos os animais hepatectomizados a 80% e tratados com água destilada, enquanto que houve sobrevivência de cinquenta por cento dos os ratos submetidos a hepatectomia de 80% e tratados com 100 e 200mg/kg do EAPB. O fígado desses ratos apresentaram marcação positiva de Ki67, indicando proliferação hepática. Os resultados laboratoriais não demonstraram diferença significativa nos valores sorológicos entre os grupos teste e controle dos animais hepatectomizados a 70%. Observou-se, na análise imunohistoquímica, positividade significativamente maior na marcação do Ki67 dos hepatócitos dos grupos de ratos submetidos a hepatectomia de 70% e que receberam tratamento de 100mg/Kg do EAPB, em relação àqueles hepatectomizados e tratados com água destilada. Conclui-se que a administração aguda de EAPB exerce significativo efeito positivo sobre a regeneração hepática em

ratos hepatectomizados a 70%, mantendo a função hepática inalterada. A administração do EAPB a 100 e 200 mg/Kg reduziu a mortalidade dos animais submetidos a hepatectomia alargada de 80%, com resposta positiva ao estímulo de proliferação dos hepatócitos.

Palavras chaves: Fitoterapia. Plantas medicinais. Hepatectomia. Afecções do fígado. Proliferação de hepatócitos.

SUMMARY

Liver tissue undergoes daily aggressions that can lead to the appearance of lesions that require surgical treatment with extended liver resection. In this study, 45 Wistar rats (*Novvergicus albinus*), weighing between 250-350 grams, were divided in six groups: Sham, HP70, HP80, HP70 / 100, HP80 /100 and HP80/ 200. The animals of the sham group, during the first laparotomy, were submitted to a liver manipulation and HP70 and HP80 groups were underwent to partial hepatectomies of 70 and 80%. The animals of groups HP 70/100, HP 80/100 and HP 80/200 were treated with 100mg /Kg and 200mg / Kg of AEPB (aqueous extract of *Peumus boldus*), once a day, orally in 4 days prior to the first surgical procedure. The rats of Sham and HP groups were treated during the four days preceding the first surgery, with distilled water orally once a day, in similar volume to the HP test groups. After 24 hours the second laparotomy was performed for removal of the livers of the Sham group rats and the remaining livers from HP groups, to study the proliferation of hepatocytes by immunohistochemistry Ki67. In that same surgical time, 2mL of blood were collected from the inferior cava vena of the animals for serological assessment: cholesterol, glucose, triglycerides, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, as well as in total, direct and indirect bilirubin. It was also found the percentage of survival of the first surgery and animal agility. All data were first subjected to analysis of gaussian distribution. Statistically significant differences between mean values presenting Gaussian distribution were analyzed using paired and unpaired T Student's test. Non-gaussian data were analyzed using Mann-Whitney's test. Differences between means were considered significant when $p < 0.005$. The results observed mortality for all animals underwent hepatectomy of 80% and treated with distilled water, whereas there was 50% survival of rats subjected to hepatectomia of 80% and treated with 100 and 200 mg/Kg of the PBAE. The liver of these rats presented positive staining of Ki67, indicating liver proliferation. Laboratory results showed no significant difference in serum values between the test and control groups of animals 70% hepatectomized. The immunohistochemical analysis showed significantly more positive in the markup of Ki-67 labeling of the hepatocytes from groups of rats subjected to 70% hepatectomy and received treatment of 100 mg/kg the PBAE than

those treated with distilled water. It is concluded that AEPB acute administration exerts a significant positive effect on liver regeneration in rats underwent hepatectomized 70%, while maintaining unchanged hepatic function. The administration of AEPB 100 and 200 mg / kg reduced the mortality of animals subjected to 80% extended hepatectomies, with positive response to hepatocyte proliferation stimulus.

Keywords: Phytotherapy. Medicinal plants. Hepatectomy. Liver diseases. Hepatocytes proliferation.

1 INTRODUÇÃO

O fígado, maior órgão glandular do corpo e centro do metabolismo, é responsável por funções básicas e indispensáveis ao funcionamento do organismo. Por isso, a sua integridade é fundamental e, qualquer agressão a esse órgão, é motivo de preocupação (BELLATO *et al.*, 2015). Hábitos de vida como o excesso de álcool, o uso abusivo de medicamentos, alimentação com alto teor de gordura e vida sexual não segura, agredem continuamente o fígado e podem causar doenças graves. As doenças do fígado estão entre as de tratamento mais difícil porque são silenciosas, de início assintomático e quase sempre cronificam, evoluindo para necessidade de tratamento cirúrgico, que resulta na retirada de extensas áreas do parênquima hepático (LOPES-JÚNIOR, BELEBECHA e JACOB, 2014).

As ressecções clássicas (hepatectomias direita, esquerda e ampliada) são a melhor solução para muitas dessas doenças porém, apesar dos avanços técnicos e elevada experiência de centros especializados, as taxas de morbidade e mortalidade pós-operatória, associadas a complicações pós-hepatectomia, ainda são relativamente altas (JIN *et al.*, 2013). Portanto, dependendo da gravidade da lesão hepática o tempo de restauração de fígado pode ser muito longo, o que pode provocar insuficiência das funções hepáticas durante período prolongado (VAN DEN BROEK *et al.*, 2008).

O parênquima hepático de um adulto é quiescente e apenas um pequeno percentual das suas células é submetido à divisão celular em qualquer tempo. Mas esse órgão apresenta capacidade proliferativa intensa quando agredido por agentes como vírus, álcool, drogas ou ressecções. A proliferação hepática é um processo de hiperplasia compensatória, a qual é dirigida mais por necessidades funcionais do que anatômicas (AGUIAR *et al.*, 2011). Os hepatócitos que não sofreram processo de destruição irão proliferar e recuperar a massa tecidual do fígado (TODERKE *et al.*, 2014).

A humanidade utiliza, empiricamente, produtos naturais, especialmente plantas de sabor amargo, com intuito de beneficiar e restaurar a função do fígado (HAQ, 2004; QUIRINO, 2015). Produtos à base dessas plantas estão sendo pesquisados, como alternativas importantes, na busca de melhorar

o processo de regeneração hepática (KESKIN *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

No Brasil, cerca de 63% da população fazem uso de medicamentos disponíveis no mercado; os demais procuram produtos de origem natural, como único recurso terapêutico. Dentre as plantas medicinais encontradas nos mercados e feiras livres, as mais utilizadas são aquelas que têm propriedades digestivas, sendo o boldo (*Peumus boldus*) a espécie mais usada (ARAÚJO, 2014).

O boldo-do-Chile é encontrado em farmacopeias oficiais do Brasil, Chile, Alemanha, Espanha, Portugal e Suíça como referência no tratamento de afecções do fígado. Utiliza-se o boldo em casos de hepatites, cólica e congestão hepáticas, litíase biliar e distúrbios intestinais, além de reumatismo, astenia, má digestão, dispepsia, inapetência entre outros, graças às propriedades dos alcaloides e flavonoides encontrados nas suas cascas e folhas (SPEISKY e CASSELS, 1994; BRANDÃO *et al.*, 2006; AGRA *et al.*, 2007; KLIMACZEWSKI *et al.*, 2014; SOTO *et al.*, 2014; VILLIGER *et al.*, 2015).

A ideia que “natural, não faz mal”, é uma realidade preocupante entre os usuários de plantas medicinais (MENGUE *et al.*, 2001). Por essa razão, pesquisas são importantes na avaliação do efeito dessas plantas usadas, sem restrições e de forma indiscriminada, pela população (RATES, 2001; CORDELL e COLVARD, 2005; MOTTA *et al.*, 2013). O objetivo desse estudo é avaliar o efeito do extrato do *Peumus boldus* no processo de proliferação e função dos hepatócitos, após hepatectomias alargadas em ratos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Anatomia funcional do fígado*

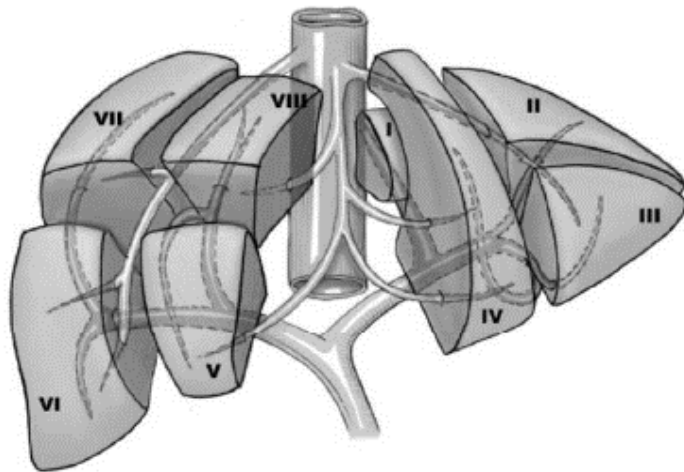
O fígado, maior glândula do corpo humano, com um peso médio em torno de 1,4kg (TORTORA e GRABOWSKI, 2008), possui estruturas anatômicas e histológicas complexas (SOARES FILHO; CARVALHO; GUSMAN SILVA, 2012). Está localizado na região superior da cavidade abdominal (hipocôndrio direito e epigástrico), logo abaixo do diafragma, no limite do rebordo costal. É rodeado por uma camada de tecido conjuntivo rico em colágeno e fibras elásticas, conhecida como cápsula hepática (ou de Glisson).

Anatomicamente fígado pode ser visto sob dois aspectos: não funcional ou morfológico, que descreve o órgão conforme visualização ao se abrir a cavidade abdominal; e o funcional ou cirúrgico, que divide o fígado em partes funcionalmente independentes, a partir do suprimento sanguíneo.

A anatomia não funcional ou morfológica divide o fígado em faces, lobos e aparelho excretor. A face diafragmática, anterossuperior ou convexa, é recoberta pelo peritônio visceral (ou cápsula de Glisson), exceto posteriormente, “a face nua do fígado”. Subdivide-se em lobo direito (o maior) e esquerdo, separados pelo ligamento falciforme. A face visceral, pósterio-inferior ou côncava, mostra uma superfície irregular, com depressões ou impressões em decorrência ao contato com outros órgãos da cavidade abdominal (impressões cólica, duodenal, renal, suprarrenal, gástrica e esofágica). Subdivide-se em lobos direito, esquerdo, quadrado e caudado recobertos, também, pelo peritônio exceto a “porta do fígado”, localizada entre o lobo caudado e o quadrado. Por aí penetram a artéria hepática, a veia porta, o ducto hepático comum, nervos e vasos linfáticos. O aparelho excretor é formado pelos ductos hepáticos e a vesícula biliar (FREITAS, 2005; POCOCK e RICHARDS, 2006).

A divisão funcional ou cirúrgica divide o fígado em lobos direito e esquerdo, funcionalmente independentes. Coinaud, em 1958, com objetivo de facilitar as ressecções cirúrgicas, subdividiu os lobos em oito segmentos, baseados no suprimento vascular dos ramos da veia porta e artéria hepática,

distribuição dos ductos biliares, drenagem das veias hepáticas e drenagem linfática. (COUINAUD, 1957; STRASBERG, 2013) (Figura 1).



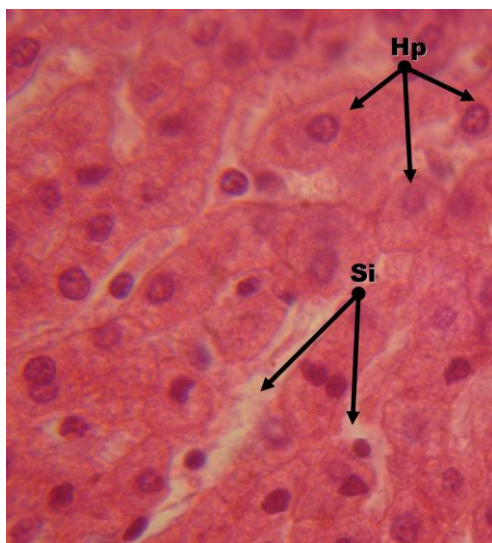
Fonte: MARTINS (2008)

Figura 1. Segmentação hepática de acordo com Couinaud (1958)

A inervação do trato biliar é feita pelas fibras simpáticas, que se originam na coluna vertebral, entre a 7ª e a 10ª vértebras torácicas (T7 e T10) e de fibras parassimpáticas dos nervos vago anterior e posterior. Essas fibras passam através do plexo/gânglio celíaco, rede de neurônios localizada no abdômen, abaixo do estômago. As fibras pós-ganglionares formam o plexo hepático, maior derivado do plexo celíaco, que acompanham a artéria hepática e a veia porta até o fígado. Essas fibras inervam a cápsula hepática e, dentro do parênquima hepático, acompanham os vasos e ductos biliares da tríade portal ou espaço porta. A principal função da inervação hepática é promover vasoconstrição para facilitar o fluxo vascular (TRIVIÑO, 2005).

O fígado é irrigado pela veia porta e artéria hepática. É um órgão encharcado de sangue, passando por ele 70 a 80% de todo volume sanguíneo do corpo, a maior parte venoso, num fluxo de 1500 a 1800 ml por minuto. A artéria hepática e a veia porta penetram no fígado através do hilo hepático e ramificam-se, repetidamente, formando uma rede de capilares sanguíneos, os sinusoides, que entram em contato com cada uma das células hepáticas, principalmente com os hepatócitos.

Os sinusoides se estendem até as veias centro-lobulares, que se confluem para formar as veias supra-hepáticas que desembocam na veia cava inferior (Figura 2). Essa arquitetura do parênquima hepático permite que todo sangue, provindo do pâncreas, baço, estômago e intestinos entre em contato íntimo com os hepatócitos, onde a maioria das substâncias ingeridas será metabolizada (PRATT, 2008; STRANG, 2010).



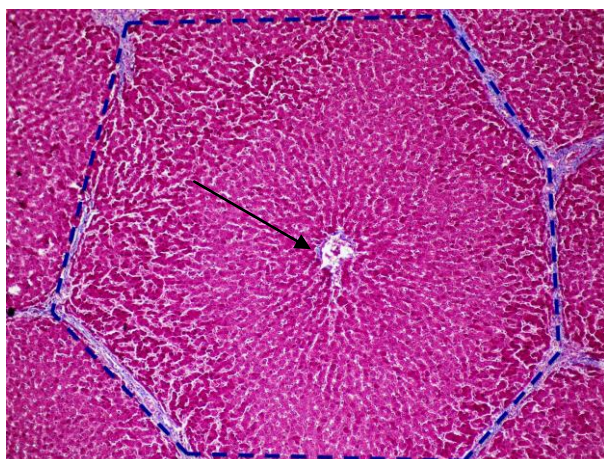
Fonte: MARTÍN, 2012

Figura 2. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 400x): lóbulo hepático (Hp: hepatócitos; Si:sinusoides)

Na luz dos sinusoides são encontrados macrófagos conhecidos como célula de Kupfer, que metabolizam as hemácias velhas e destroem microrganismos que penetram pelo sistema porta, e as células Natural Killer, linfócitos T, que também fazem parte do sistema imune e apresentam capacidade citotóxica de destruir células tumorais e hepatócitos infectados. Um terceiro tipo de célula, conhecido como “célula gorda” ou de Ito, é ainda encontrado na parede dos sinusoides, cujas principais funções são o armazenamento de vitamina A e a participação no processo de fibrinogênese (GARTNER e HIATT, 2007).

Os hepatócitos, células encontradas em maior quantidade no fígado, se agrupam em placas que formam unidades morfológicas denominadas lóbulos hepáticos. Nos lóbulos, os hepatócitos se dispõem em massas poliédricas ou hexagonais, unidas umas às outras em quase toda sua extensão, salvo em algumas regiões em que os lóbulos ficam separados por tecido conjuntivo rico

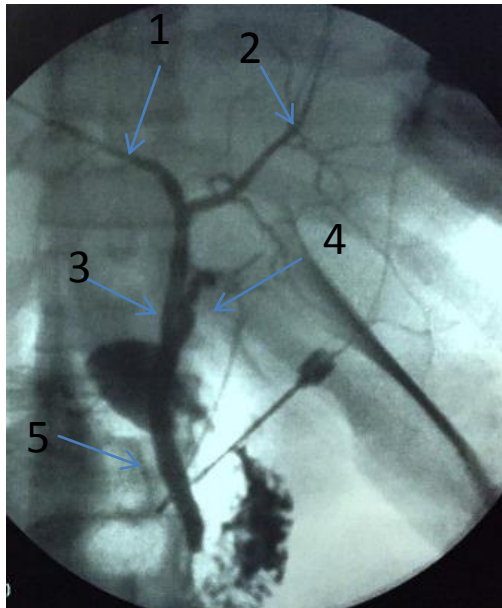
em ductos biliares, vasos linfáticos, ramificações da artéria hepática e da veia porta e nervos. Estas regiões estão nos cantos das massas poliédricas de hepatócitos e recebem o nome de espaços-porta ou tríade portal. O lóbulo hepático descrito é a classificação clássica da estrutura hepática utilizando exclusivamente critérios anátomo-morfológicos (FREITAS, 2005; POCKOCK e RICHARDS, 2006) (Figura 3).



Fonte: MARTÍN, 2012

Figura 3. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 100x): lóbulo hepático delineado (forma hexagonal); a seta mostra a veia centro-lobular; os espaços-porta estão nos vértices dos poliedros marcados com linhas tracejadas

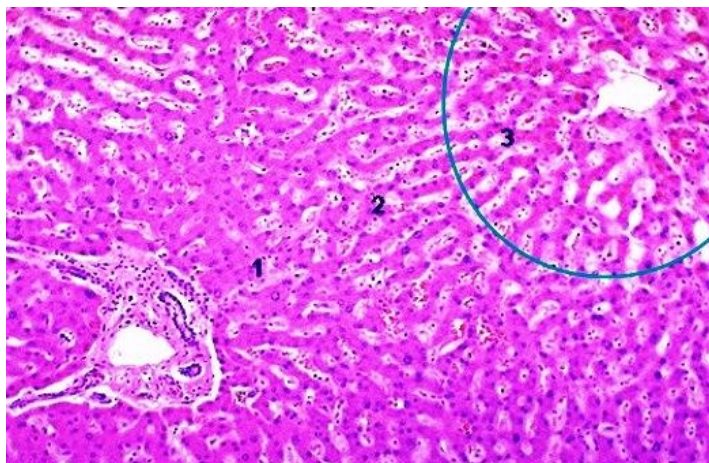
Do ponto de vista anátomo-funcional, o fígado é organizado em ácinos ou lóbulos metabólicos, levando em consideração o fluxo de sangue e o fluxo de bile. O ácino portal é definido como a porção de tecido hepático, limitada pelo território de outros ácinos, em torno de um sistema vascular aferente, que traz o sangue através de ramos terminais da veia porta e artéria hepática. Nos ácinos se inicia o fluxo da bile, secretada pelos hepatócitos e que segue até o duodeno pelos canalículos biliares. Esses canalículos se unem e constituem os ductos biliares que formam o ducto hepático comum que, ao receber o ducto cístico, oriundo da vesícula biliar, passa a ser conhecido como ducto colédoco (FREITAS, 2005; POCKOCK e RICHARDS) (Figura 4).



Fonte: LIMA S.O., 2015 (acervo pessoal)

Figura 4. 1) ducto hepático direito; 2) ducto hepático esquerdo; 3) ducto hepático comum; 4) ducto cístico; 5) colédoco

Os hepatócitos, nos ácinos, estão arrumados em zonas concêntricas, em torno dos vasos aferentes terminais. Os hepatócitos da zona periportal, ou zona 1, estão mais próximos do espaço porta, por isso, mais irrigados e oxigenados, o que faz com que sejam mais resistentes, sendo os últimos a sofrerem necrose e os primeiros a mostrarem sinais de proliferação. Os hepatócitos da zona mediolobular, ou zona 2, apresentam um padrão misto entre os da zona 1 e 3. Os hepatócitos da zona centrolobular, ou zona 3, se encontram adjacentes às veias terminais (pericentraais), sendo menos irrigados e, portanto, com menores concentrações de nutrientes e oxigênio, o que os tornam mais susceptíveis à lesão e com menor capacidade regenerativa (FREITAS, 2005; POCOCK e RICHARDS, 2006) (Figura 5). O ácino, como unidade fisiológica hepática, explica os padrões morfológicos de muitas doenças que não conseguem ser explicados pelo padrão lobular (PANQUEVA, 2013).



Fonte: MARTÍN, 2012

Figura 5. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 100x), zonas do ácino hepático: 1- zona periportal, 2- zona mediolobular, 3- zona centrolobular

Dentre suas diversas funções bioquímicas, o fígado é essencial ao metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, e à degradação e excreção de hormônios (esteroides sexuais e tireoidianos). É um órgão fundamental no processo digestório, funcionando como glândula exócrina, secretando os sais biliares e, como endócrina, liberando o colesterol endógeno no sangue. O fígado armazena vitaminas (A, D e B12), ferro e glicose, esta última provinda do bolo alimentar, fazendo dos hepatócitos um “reservatório” que envia glicose para a circulação quando outra parte do corpo, como músculos ou cérebro, necessita de energia. Desempenha papel central nos mecanismos hemostáticos, produzindo parte dos fatores de coagulação e mantendo o sangue em estado líquido dentro dos vasos, impedindo trombozes. No fígado acontece a síntese da bilirrubina, substância amarelada produzida a partir da destruição de hemácias velhas do sangue. É um órgão de função imunológica, graças às células de Kupffer e aos macrófagos hepáticos encontrados no seu parênquima, que funcionam como uma barreira inicial de defesa contra antígenos advindos da digestão. E tem, ainda, a capacidade de converter medicamentos e toxinas em formas inativas para que o organismo possa excretá-los (SCHINONI, 2008; GUYTON, 2011).

2.2 Afecções do fígado

Algumas doenças do fígado estão entre as mais graves e de tratamento mais difícil, podendo ocasionar perda na qualidade de vida e consequências que podem ser fatais. Dentre as principais doenças primárias a hepatite viral, classificada como A, B, C, delta, E, F e G, é um grave problema pois estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas, um terço da população mundial, esteja infectada. Desse grupo de pessoas infectadas, uma grande parte apresenta a fase crônica da doença, quando pode ocorrer o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, que é a segunda causa de morte por câncer no mundo, em torno de um milhão de pessoas por ano (ROBBINS e CONTRAN, 2008; JEMAL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011).

Dentre as doenças mais comuns, encontram-se as causadas pelo uso excessivo de álcool (RHEM *et al.*, 2013). No Brasil, 9% da população são dependentes do álcool e, de dez pessoas alcoólatras, nove desenvolverão esteatose hepática, quatro evoluirão para hepatite crônica, enquanto duas terão cirrose (TAUFICK *et al.*, 2014). Outro grave problema são as afecções hepáticas gordurosas não alcoólicas decorrentes, principalmente, do excesso de ingestão de alimentos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que, nos próximos anos, três milhões de pessoas irão desenvolver a forma grave dessa doença, a cirrose. Essa forma grave da doença tende a evoluir para o aparecimento de hepatocarcinomas, levando a falência hepática grave. Subsequentemente encontram-se as doenças hepáticas auto-imunes e as doenças genéticas, que também podem levar à cirrose e posterior insuficiência aguda do órgão (CADWELL *et al.*, 2004; AMARAPURKAR *et al.*, 2007; HERNADEZ e FRIEDMAN, 2011).

Essas doenças podem necessitar de tratamentos cirúrgicos, muitas vezes radicais, como hepatectomias totais, para os casos em que haja necessidade de transplante, ou hepatectomias alargadas (LOPES Jr, BELEBECHA e JACOB, 2014; MARTIN *et al.*, 2012). As hepatectomias são também necessárias na maioria dos traumas hepáticos, pelo fato do fígado está mais susceptível às lesões traumáticas devido ao seu tamanho e posição anatômica, sendo o órgão mais lesionado no trauma contuso e o segundo no

trauma abdominal penetrante (LONDON *et al.*, 2008; LMA *et al.*, 2012; TINKOFF *et al.*, 2008; STASSEN *et al.*, 2012; ZAGO *et al.*, 2012).

Em 1888, Langenbuch realizou, com sucesso, a primeira ressecção de fígado, porém, essas ressecções apresentavam mortalidade tão elevada que não justificava sua realização. Com a noção da anatomia segmentar e funcional do fígado baseada na distribuição dos pedículos vasculares por Couinaud em 1957 o surgimento de exames diagnósticos e o conhecimento da fisiologia da proliferação, as hepatectomias tornaram-se procedimentos mais seguros (FELEKOURAS *et al.*, 2010; FARGES *et al.*, 2012).

2.3 Proliferação do parênquima hepático

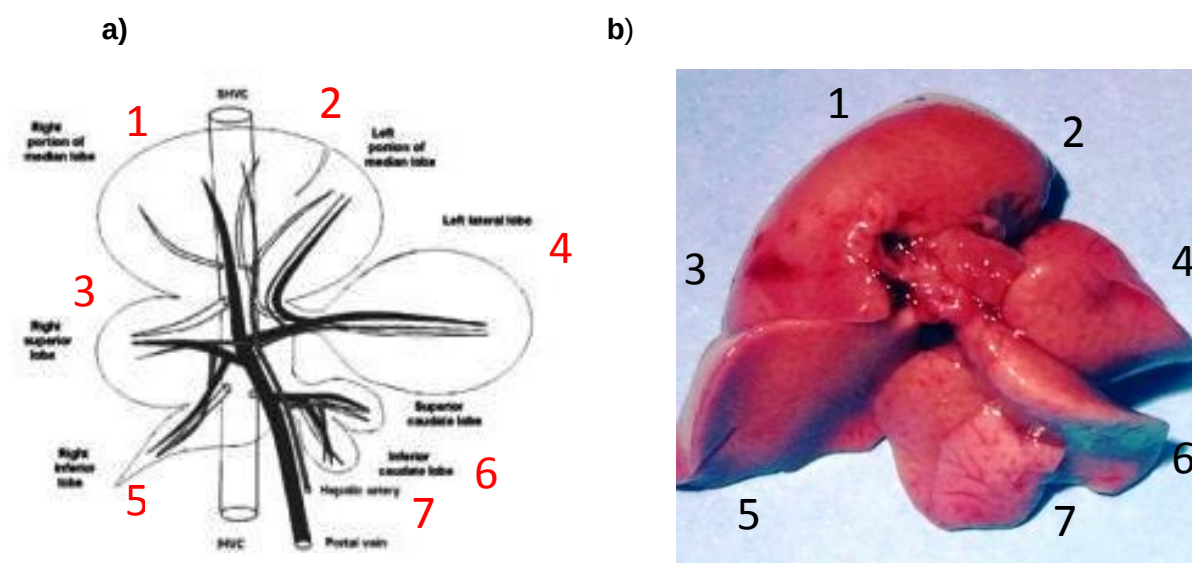
A proliferação do fígado nos remete à história do semideus imortal Prometeus, da mitologia grega que, condenado por roubar dos deuses o fogo sagrado do conhecimento e dá-lo à humanidade, foi acorrentado a um rochedo inacessível, junto ao mar. Durante o dia, um grande abutre, enviado por Júpiter (Zeus), devorava seu fígado que, durante a noite, para atormentá-lo indefinidamente, se refazia. Apesar do puro simbolismo dessa tragédia escrita por Ésquilo (450 e 425 a.C.) (HUCH, 2015), Prometeus tinha um fígado igual ao de todos os mortais que, sob condições normais, apresenta uma reduzida produção celular. Em resposta a um estímulo, a uma agressão, os hepatócitos do parênquima remanescente podem proliferar rapidamente, por meio de hiperplasia, de modo a reparar suas porções perdidas e restabelecer as necessidades funcionais (AGUIAR, 2011).

A ausência de proliferação aumenta, consideravelmente, a morbidade e a mortalidade, como em casos de falência hepática fulminante, quando ocorre destruição de grande parte dos hepatócitos e a sobrevivência não é possível (RAMALHO, 1993; FAUSTO, 1995; TANG, 1997; AGUIAR *et al.*, 2011). A eficiência da restauração compensatória do fígado está diretamente relacionada à quantidade de perda tecidual (HIGGINS e ANDERSON, 1931; COURT *et al.*, 2002; BIONDO e SIMÕES, 2007; MORTENSEN, 2011; KELE, 2012).

Esse fato foi observado em ratos submetidos à ressecção de uma porção inferior a 30% da massa hepática e a proliferação celular não ocorreu. E

numa ressecção superior a 80%, a proliferação foi bem menor que a observada entre 68 a 70% (MORTENSEN, 2011; KELE, 2012; DONG *et al.*, 2015).

O fígado do rato é dividido em quatro lobos principais: lobo caudado, lobo lateral direito, lobo mediano e lobo lateral esquerdo que representam, respectivamente, 7%, 20%, 40% e 30% do peso total do fígado. Os 3% restantes correspondem ao tecido hepático que circunda a veia cava (MADRAHIMOV *et al.*, 2006) (Figuras 6a e 6b).



Fonte: MADRAHIMOV, 2006

Fonte: LIMA S.O., 2015 (acervo pessoal)

Figura 6. **a)** esboço original da descrição anatômica e vascular do fígado de rato, feita por Madrahimov (2006); **b)** peça anatômica: 1- porção direita do lobo mediano; 2- porção esquerda do lobo mediano; 3- porção superior do lobo direito; 4- lobo lateral esquerdo; 5- porção inferior do lobo direito; 6-lobo caudal inferior; 7-lobo caudal lateral

Acreditava-se que 70% de hepatectomia seria o estímulo máximo para se conseguir a proliferação dos hepatócitos em ratos. Ressecções de 90% do fígado em ratos eram consideradas, nas cirurgias experimentais, modelo de falência hepática fulminante, por apresentarem alta taxa de mortalidade (GAUB e IVERSEN, 1984; EMOND *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 2000; HAMAZAKI *et al.*, 2002). Porém, hepatectomias estendidas começaram a ser utilizadas para determinar a massa hepática mínima compatível com a sobrevivência dos animais. Os modelos de ressecção hepática usadas atualmente, baseiam-se na

remoção combinada dos lobos do fígado e são classificados de acordo com a massa hepática ressecada: hepatectomias de 30%, 50%, 70%, 85% e 90%.

A partir de 1997, Kubota *et al.* apresentam um modelo não letal com o qual realizaram hepatectomias de 90% em ratos, com uma taxa de sobrevivência de 100%, durante uma semana. De acordo com a descrição de Kubota *et al.*, no rato, os lobos mediano e lateral direito, ao contrário do lobo lateral esquerdo, são anexados a veia cava inferior, e, portanto, ligaduras nas bases destes lobos obliteram o lúmen da veia cava inferior. Se a ligadura é feita a uma pequena distância da base, a constrição não ocorrerá, mas o perigo de hemorragia do parênquima hepático aumenta e se torna difícil conseguir ressecção precisa. Para evitar este problema, se utiliza uma incisão maior para que o fígado seja tracionado para fora da cavidade, após desanexá-lo dos tecidos circundantes. Em seguida, as artérias hepáticas e os ramos da veia porta são isolados e ligados separadamente, no hilo hepático, antes dos lobos serem retirados. Com esse método, os lobos podem ser precisamente ressecados sem constrição da veia cava inferior ou sangramento importante. Após esta etapa são feitas suturas no parênquima hepático. Esta nova técnica de hepatectomia em ratos, com a qual se evita a constrição da veia cava inferior, revelou que 5% a 10% do fígado total é o volume mínimo exigido para o fígado remanescente, uma quantidade menor do que o relatado anteriormente.

Para a realização desses novos procedimentos cirúrgicos tornou-se necessário o conhecimento exato da anatomia vascular. Em 1996, Eguchi *et al.* descrevem a anatomia vascular básica no fígado de rato, mas apenas os vasos dos lobos principais foram demonstrados. Nem a vascularização do lobo mediano, nem a da região circunscrita à veia cava foram descritas. Kogure *et al.*, em 1999, apresentaram uma descrição mais detalhada da anatomia vascular do fígado do rato. Porém, os desenhos esquemáticos de Kogure *et al.* informam apenas sobre as principais veias lobares, mas não elucidam a topografia dos vasos. No entanto, o conhecimento topográfico da localização dos vasos dos lobos é essencial para minimizar o trauma cirúrgico do fígado remanescente.

Madrahimo *et al.* (2006), objetivando ampliar ainda mais as ressecções para doação de massa hepática em transplantes, investigaram a redução máxima de parênquima hepático compatível com a sobrevivência. Foram feitas

ressecções alargadas com base numa técnica orientada de visualização tri-dimensional do suprimento vascular e drenagem do fígado, quando são definidas as suturas dos vasos hepáticos, após fixação dos pedículos dos lobos em torno da veia cava. Inicialmente, obtiveram durante uma semana, taxa de sobrevivência de 100% dos ratos submetidos a hepatectomia de 90%, com a retirada do lobo lateral esquerdo, mediano e direito. Estenderam a ressecção a 95%, com a remoção suplementar do lobo caudado superior. Esse procedimento levou a uma taxa de sobrevivência de 66% dos ratos hepatectomizados, durante uma semana. Realizaram, então, hepatectomias mais alargadas de 97%, com a ressecção do lobo caudado inferior, o que resultou na letalidade de 100%, no prazo de 4 dias. Concluíram, então, que 95% é a redução máxima de massa do parênquima hepático compatível com a sobrevivência.

Ao contrário da Kubota *et al.*, Madrahimo não ligou a veia porta e artéria hepática antes da ressecção dos lobos, não submetendo os cotos do fígado remanescente à perda de aporte venoso e nem de suprimento de sangue arterial. Isto é especialmente importante para a ressecção do lobo superior direito, porque as partes basais deste lobo se estendem até a parte que circunda a veia cava, que não deve sofrer perda de suprimento vascular. A preservação do suprimento vascular da região próxima a veia cava, levou a uma taxa de sobrevivência de 50% dos ratos com um fígado remanescente em torno de 5% a 6%, e ainda houve restauração de peso. Da mesma forma, o tempo de sobrevida de ratos com fígado remanescente em torno de 2% a 3%, foi duplicada em comparação aos resultados de hepatectomia total feitos até então.

No entanto, é sabido que a redução da massa hepática prejudica a regeneração e um fígado remanescente deve apresentar uma massa parenquimatosa de 1,5% a 2% em relação ao peso do corpo. Dependendo da técnica cirúrgica, a hepatectomia alargada a 90% pode resultar em morte mas, também, em sobrevivência (MADRAHIMO *et al.*, 2006).

Dong *et al.* (2015), com objetivo de investigar os mecanismos que levam à insuficiência hepática após hepatectomias alargadas, fizeram ressecções de 85 a 90% em ratos que, no pós-operatório, tinham acesso livre a água com ou sem glicose. Nas hepatectomias de 85% foram retirados os lobos lateral esquerdo, mediano, caudado e o inferior direito, deixando apenas o lobo

superior direito. Nas hepatectomias de 90% foram ressecados os lobos lateral esquerdo, mediano e os superior e inferior direitos, deixando apenas o caudado como parênquima remanescente. A taxa de sobrevivência e a função hepática foram avaliadas. Para avaliação da lesão parenquimatosa hepática foram analisadas a macroscopia hepática, a bioquímica do sangue, a apoptótica e as alterações necróticas; enquanto que a resposta proliferativa foi avaliada pelo ganho de peso do fígado remanescente, marcadores de proliferação do hepatócito e moléculas relacionadas com a regeneração. Como resultados eles obtiveram uma taxa 5% de sobrevivência, extremamente baixa, devido à inibição da capacidade proliferativa do tecido hepático remanescente nos ratos com ressecção de 90%.

No modelo de ressecção de 85 a 90% descrito por Gaub e Iverson em 1984, semelhante ao sugerida por Higgins e Anderson em 1931, os lobos medianos e os laterais direito e esquerdo de ratos machos da raça Lewis são removidos, deixando os dois lobos caudados e tecido hepático em torno da veia cava. Apesar de 90% de massa hepática ressecada, a mortalidade foi de apenas 14%, enquanto que as medições de fígado úmido e a análise do índice mitótico sugeriram um expressivo estímulo regenerativo com proliferação celular rápida. No pós-operatório, os ratos tinham livre acesso à água potável contendo glicose que, após ingerida é armazenada sob forma de glicogênio no fígado, órgão responsável pela manutenção da glicemia. O nível elevado de glicose no sangue estimula a secreção de insulina que, juntamente com o EGF, o TGF, a Substância Estimuladora Hepática, o Fator de Crescimento de Fibroblasto Ácido, o HGF, o VEGF, as citocinas (interleucinas) e substâncias como o glucagon, as prostaglandinas, as fibronectinas, a vasopressina, as angiotensinas e a norepinefrina são fatores ligados ao crescimento hepático. Apesar de não ter potencial mitogênico primário, a insulina intensifica o estímulo regenerativo e, por isso, é considerada um dos principais fatores hepatotróficos (Knopp *et al*, 1997).

O fígado, após a hepatectomia, recebe uma sobrecarga metabólica importante, pois necessita desempenhar suas funções com menor quantidade de células: ele necessita iniciar um processo agudo e acentuado de proliferação celular e, ao mesmo tempo, deve manter funções metabólicas indispensáveis ao

organismo (LIMA, 1989; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2006), como homeostase, síntese das proteínas plasmáticas e dos fatores de coagulação, secreção da bile, biodegradação de componentes tóxicos e tantas outras (JESUS, WALTZBERG e CAMPOS, 2000; MORTENSEN *et al.*, 2011).

Em resposta a um estímulo, a uma agressão, os hepatócitos do parênquima remanescente sofrem hiperplasia, aumento do número de células e hipertrofia, aumento do volume celular ou do conteúdo proteico na fase pré-replicativa (AGUIAR *et al.*, 2011). Apesar de todas as células hepáticas participarem do processo, grande parte dos estudos focaliza os hepatócitos, célula de natureza epitelial, altamente estável e com baixo nível mitótico, o que faz com que raramente ocorra divisão celular. Alguns dados mostram que somente um hepatócito em vinte mil pode se dividir, em algum momento, durante a vida adulta de um ser humano ou de um animal. Essa divisão acontece no máximo uma ou duas vezes em cada célula, em contraponto à taxa de reprodução das outras células de um ser humano adulto (MICHALOPOULOS, 1997 e 2014; MIYAOKA, 2013). Calcula-se que 300 milhões de células são produzidas por minuto, 430 trilhões por dia, principalmente em tecidos epiteliais e conjuntivos que revestem e sustentam nosso corpo (YANGER, ZONG, MAGGS, 2013).

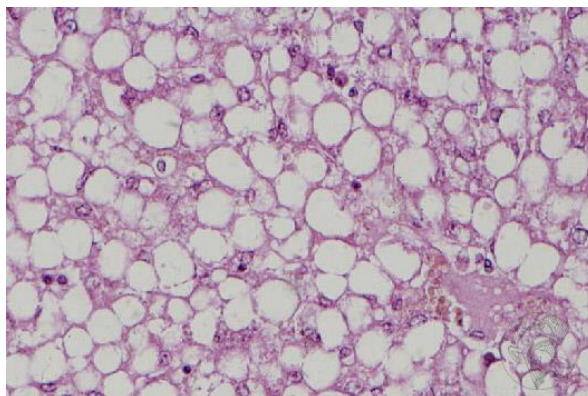
Os hepatócitos entram em divisão celular mediante estímulos de natureza física, química, tóxica ou infecciosa (DIEHL; RAI, 1996; FLADMARK; GJERTSEN *et al.*, 1997). A perda de parênquima hepático desencadeará um processo regenerativo acelerado e altamente organizado, até o fígado atingir seu peso original, porém sem adquirir sua forma anterior. O termo “regeneração”, apesar de largamente utilizado, é questionável e considerado “biologicamente incorreto”, visto que o que ocorre é um aumento dos segmentos hepáticos remanescentes, porém a estrutura anatômica original não é restituída, não se regenera (RAMALHO *et al.*, 1993; MICHALOPOULOS, 2007; AGUIAR, 2011).

Nos experimentos em ratos foram identificadas três fases distintas no processo proliferativo dos hepatócitos: o período de pré-replicação (ou pré-replicativo) ou fase de iniciação da proliferação, que acontece de 12 a 16 horas após a hepatectomia, quando os hepatócitos saem de seu “estado de repouso” iniciando a síntese de DNA. Observa-se que existe um sincronismo, uma

simultaneidade no pico de replicação do DNA dos hepatócitos, até então em estado de quiescência, o que fortalece o conceito de que, em condições normais, essas células raramente se dividem (OVERTURE; AL DHALIMY *et al.*, 1999; TARLÁ *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2011).

A segunda fase é o período replicativo ou fase da proliferação das células hepáticas. Nessa fase acontece uma onda de mitoses que inicia 22 a 24 horas após a hepatectomia e cada célula produz dois novos hepatócitos, até atingir a quantidade adequada para a restituição da função. O pico dessa etapa se dá de 24 a 26 horas após a agressão cirúrgica e a síntese nas células endoteliais, ductais, de Ito e de Kupffer se inicia 24 horas após o início da síntese de DNA dos hepatócitos. Na terceira e última etapa ou fase de inibição, acontece o encerramento das divisões celulares e foi atingido o número de células necessário para o restabelecimento da função e massa hepáticas (FAUSTO, LAIRD, WEBBER, 1995; FAUSTO, 2002; PAES-BARBOSA *et al.*, 2010; AGUIAR *et al.*, 2011).

O processo proliferativo ocorre nas primeiras 24 horas, predominantemente na região periportal e continua na região pericentral durante 36 a 48 horas. Os hepatócitos migram em direção à veia centro-lobular, de forma que as células mais jovens se localizem na parte mais periférica dos lóbulos e as mais velhas, na região central. Após a proliferação de hepatócitos diminuir, inicia-se a proliferação vascular. Nos primeiros três dias se observa, na histologia do fígado dos ratos, grupos de hepatócitos com pouca vascularização. A hipóxia nos aglomerados de hepatócitos em proliferação estimula a angiogênese, o surgimento de novos vasos sanguíneos. A estrutura hepática lobular típica se restaura em torno de sete dias, porém os lobos se apresentam aumentados de volume em decorrência à infiltração gordurosa, superior a de um fígado normal, em que cerca de 5% da sua massa consiste em lipídios. (JESUS *et al.*, 2000; PAES-BARBOSA *et al.*, 2010; PANQUEVA 2013) (Figura 6).



Fonte: PANQUEVA, 2013

Figura 7. Secção histológica de tecido hepático (coloração em HE, 100x): acumulação intracitoplasmática de lípidos, que ocupa praticamente todo o citoplasma de cada hepatócito

Jesus (2000) observou que as células de Kupfer e as células ductais têm o pico mitótico 48 horas após a hepatectomia, enquanto que células endoteliais 96 horas. Em ratos o processo regenerativo se completa entre sete e catorze dias e, em humanos, a restauração completa da massa hepática só é verificada três a seis meses após a hepatectomia (RAMALHO; RAMALHO *et al.*, 1993; TARLÁ *et al.*, 2006; KHAN; MUDAN, 2007; KELE *et al.*, 2012).

2.4 Avaliação da proliferação

O processo de regeneração hepática, depois de desencadeado, pode ser avaliado por diversos métodos, tais como a massa do fígado, o número de mitoses, os componentes do ácido desoxirribonucleico (DNA), o índice de síntese de antígenos nucleares avaliados por imunohistoquímica e a expressão de genes. E, ainda, por testes sorológicos a partir das variações dos níveis de proteínas séricas, determinações enzimáticas de marcadores de proliferação e citometria de fluxo 2. Para avaliar a eficiência de possíveis coadjuvantes que estimulem o crescimento e restauração funcional da massa hepática, pode-se utilizar o modelo “*in vivo*” ou “*in vitro*” (MACHADO, 2002).

Os modelos “*in vitro*” são realizados com células fora de seu meio biológico normal, ou seja, fora do sistema vivo, no laboratório, num meio de cultura artificial. A principal vantagem da análise “*in vitro*” é a realização dos ensaios sem a utilização de animais, o que é questionado no âmbito ético e científico. As Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), através de

análise criteriosa dos protocolos de pesquisa, têm papel importante na orientação do trato de animais (ABREU, 2008; PRESGRAVE, 2009). A não utilização de animais ainda pode reduzir os custos, pois não há necessidade da infraestrutura de um biotério. A outra vantagem é que os trabalhos "*in vitro*" caracterizam mais facilmente alguns processos de metabolismo, já que cobaias, nos estudos "*in vivo*", estão sujeitos às interferências externas e podem sofrer a influência de ruídos, ciclo da luz, umidade ou mudança de temperatura, que provocam alterações metabólicas, o que pode alterar o resultado do trabalho e chegar a conclusões errôneas. Um ponto crítico é a dificuldade de treinamento de pessoal para o uso dos equipamentos e para as condições assépticas exigidas para a realização do ensaio. Mas é bom salientar que, justamente a falta do organismo vivo pode ser uma das limitações desse modelo (EMANI, 2006).

O experimento "*in vivo*" estuda os efeitos de um biomaterial num tecido ou dentro de um organismo vivo, sendo, por isso, um método ainda bastante utilizado na investigação de biocompatibilidade de novos produtos. Apesar da desvantagem da utilização de animais, o uso de células em cultura viva nos dá a chance de acompanhar, com maior dinâmica, alterações de morfologia, proliferação ou morte celular, em função da presença de alguns produtos (ABREU, 2008).

O modelo experimental "*in vivo*" mais empregado para documentar a atividade proliferativa hepática é baseado nos experimentos de Higgins e Anderson (1931). Eles constataram que a melhor maneira de desencadear o estímulo para a observação da proliferação seria através de uma hepatectomia parcial, isto é, a ressecção cirúrgica dos lobos lateral esquerdo e mediano do fígado de ratos, o que equivale a 70% do volume total do órgão. Os lobos residuais, que correspondem aos 30%, eram preservados e cresciam até que o volume do fígado equivalesse ao de antes. Neste modelo, o início da proliferação ocorre em torno de 12 a 16 horas, sendo o primeiro pico de síntese de DNA após 24 horas do estímulo regenerativo, seguido de outro, menos intenso, até 36 a 48 horas. Quando o órgão voltava ao seu tamanho/volume original, o que ocorria num período de sete a vinte e um dias, o crescimento parava. Estudos mais recentes apontam um tempo menor, entre sete e dez dias

(RAMALHO; RAMALHO *et al.*,1993; MAGALHÃES *et al.*, 2014). O evento em que os hepatócitos proliferam pode ser demonstrado pelas análises macroscópica e microscópica do fígado e, a função hepática, pela análise bioquímica do sangue.

- Análise macroscópica do fígado

A descrição e interpretação macroscópicas do fígado hepatectomizado são feitas a partir de dois aspectos básicos: a cor e a massa. A massa pode ser aferida a partir do peso úmido ou seco do fígado remanescente. A coloração marrom-avermelhada escura, presente em órgãos que apresentam coeficiente sangue-tecido alto, torna-se amarelada e indica inflamação e acúmulo de gordura no parênquima hepático agredido.

- Análise microscópica do fígado (análise histológica)

O estudo microscópico da regeneração hepática é feito a partir da verificação da cinética de proliferação dos hepatócitos. A observação da proliferação dos hepatócitos é feita através expressão de genes e a síntese de antígenos nucleares, nos ensaios de imunohistoquímica, técnica de alta sensibilidade e custo moderado.

O Ki67, antígeno associado à proliferação celular, é uma proteína nuclear não histônica que participa da estrutura dos cromossomos e está presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (G1, S, G2 e mitose), exceto em células quiescentes ou em repouso (G0). A observação da proliferação dos hepatócitos é feita utilizando anticorpos para marcar o antígeno Ki67, com a finalidade de quantificar figuras de mitose presentes numa amostra histológica. O anticorpo de detecção “antígeno específico” é marcado com uma substância fluorescente e a reação antígeno–anticorpo é observada em lâminas num microscópio ótico comum, avaliando-se a quantidade de hepatócitos que proliferaram (CAPELOZZI, 2009).

- Análise sorológica da função hepática

Os testes da função e bioquímica do fígado são categorizados em: **1)** Testes que detectam injúria no hepatócito: as enzimas do fígado estão dentro das células hepáticas ou em baixas concentrações no plasma; a elevação dessas enzimas no plasma reflete danos nos hepatócitos. Para detectar esses

danos, é feita uma análise bioquímica dos níveis séricos das enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST ou TGO), alanino amino transferase (ALT ou TGP), a fosfatase alcalina (FA) e a gama-glutanil transpetidase (gama-GT ou GGT); **2)** Testes de que avaliam a capacidade do fígado em metabolizar substâncias endógenas ou exógenas na circulação: para essa avaliação é medida a quantidade de bilirrubina; **3)** Testes que avaliam a capacidade de biossíntese do fígado: estes são feitos a partir da avaliação da albumina sérica (FERREIRA e RABERVEL, 2004; LAWRENCE e FRIEDMAN, 2014).

As enzimas são referências específicas de função hepática, no entanto elas podem refletir outros parâmetros como integridade da membrana celular, necrose epitelial hepatobiliar ou colestase. A análise das aminotransferases AST e ALT encontradas dentro das células do fígado e essenciais ao metabolismo dos aminoácidos, fornece indicadores tanto de lesão como de proliferação celular. Quando há danos por doença hepática ou trauma cirúrgico, essas enzimas são liberadas no sangue (CENTER, 2007). Alterações bioquímicas tais como elevação das enzimas, variações dos níveis de proteínas séricas e da glicose são verificadas durante toda a proliferação hepática (RAMALHO, 1993; ASSY, 1997; SCOTTÉ, 1997).

As ALT, enzimas necessárias à produção de energia dos tecidos, são exclusivamente citoplasmáticas no fígado, nos rins, no coração e nos músculos. Porém o aumento da atividade da ALT indica lesão com hepatócitos envolvidos, liberando essas enzimas na corrente sanguínea, a partir de alterações na integridade da membrana celular. As AST existem tanto na forma citoplasmática como no interior das mitocôndrias, e, por isso, é somente liberada na corrente sanguínea quando acontece um dano maior às células, e não somente um aumento da permeabilidade celular. São encontradas no fígado, músculos esqueléticos e hemácias (ZIMMERMAN, 1963; ELLIS *et al.*, 1978; RICHTER, 2005; KIM *et al.*, 2013).

Em virtude das aminotransferases não serem exclusivas do fígado, se torna necessária a dosagem de outras enzimas para confirmar se o aumento ou a diminuição no sangue vêm, realmente, de um processo de agressão ao fígado (MOTTA, 2009). A fosfatase alcalina é outra enzima encontrada em quase todos os tecidos do corpo como intestinos, ossos, rins, mas predominantemente, no

fígado e ossos. Porém, somente as isoenzimas produzida no fígado têm relevância nos achados hematológicos, porque as outras possuem meia-vida muito curta. Estão envolvidas com o transporte de lipídios no intestino e no processo de calcificação óssea e, no fígado, são encontradas nas membranas de revestimento dos canalículos biliares. Por isso a resposta hepática às agressões à árvore biliar, cujas ramificações dentro do fígado se juntam formando o ducto biliar comum e, fora do fígado, o colédoco, é sintetizar FA, o que explica sua elevação nas doenças do trato biliar. A origem hepática da FA é confirmada a partir da elevação simultânea da gama-GT (MOTTA, 2009; FRIEDMAN, 2015).

As gama-glutanil transpetidases são responsáveis por metabolizar várias substâncias químicas no organismo, desde as que ingerimos até as que se formam dentro do corpo. Apesar da sua atividade enzimática ser maior nos rins, essas enzimas também estão presentes no intestino, próstata, pâncreas, cérebro, coração e nas células das vias biliares. No entanto, somente a enzima de origem hepática é encontrada no plasma, e se eleva no sangue quando ocorre destruição dos hepatócitos, nas doenças hepáticas colestáticas ou injúria traumática do fígado (CABRERA-ABREU e GREEN, 2002; MOTTA, 2009).

A bilirrubina é uma substância amarelada, proveniente do metabolismo dos eritrócitos velhos captados pelo fígado, baço e medula óssea, que são os órgãos responsáveis pela degradação dessas células quando atingem o ciclo de cento e vinte dias de vida. Esse processo resulta na formação da bilirrubina indireta (BI) ou não conjugada, pois ainda não está formada quimicamente para ser excretada. No plasma a bilirrubina indireta é associada à albumina, proteína plasmática encontrada em maior quantidade no sangue e é transportada para o fígado onde, dentro dos hepatócitos, sofre um processo de hidrofilição passando a ser bilirrubina direta (BD) ou conjugada. As bilirrubinas têm relação intrínseca com a função hepática porque é nos hepatócitos onde ocorre todo seu processo de síntese e metabolismo. O nível sérico elevado de bilirrubina mostra deficiência das células hepáticas em desintoxicar metabólitos e transportá-los até a bile. Porém sua concentração sérica é um indicador pouco sensível já que, para que ocorra uma hiperbilirrubinemia é necessário grande aumento na produção ou doença

hepatocelular prolongada, pois o fígado tem a capacidade de processar trinta vezes o valor normal (RICHTER, 2005; MOTTA, 2009; ERLINGER *et al.*, 2014).

A albumina, principal proteína do plasma sanguíneo, é sintetizada no fígado pelos hepatócitos. É responsável pela regulação da pressão osmótica que garante a distribuição adequada dos líquidos corporais entre os espaços intra e extra-vasculares. Além da osmolaridade, essas proteínas se ligam a compostos hidrofóbicos como os ácidos graxos livres, aminoácidos, hormônios, cálcio e bilirrubina, para que sejam transportados no sangue (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Segundo Richter (2005), para que ocorra uma diminuição plasmática da albumina, é necessário um dano hepático grave ou prolongado, pois sua vida média é 7 a 21 dias. A hipoalbuminemia muitas vezes não indica uma injúria hepatocelular, mas pode ocorrer por fatores diversos como suporte nutricional inadequado, síndrome de má absorção, perda por doença renal, dentre outras (ROTHSCHILD *et al.*, 1988; VELDHUYZEN *et al.*, 1992; MUTLU, 2006).

Quando a glicose não é imediatamente utilizada, ela é armazenada, na forma de glicogênio no fígado, que é responsável por manter a estabilidade da glicemia por meio de glicogenólise, conversão de glicogênio em glicose e da glicogênese, síntese de glicogênio (GUYTON, 2011). O intuito da análise da glicemia é avaliar se o nível sérico de glicose no plasma pode estar alterado em decorrência do funcionamento do fígado. Porém uma peculiaridade dos hepatócitos é a habilidade de manter ativas todas as funções indispensáveis à homeostase do organismo, simultaneamente à sua proliferação (RAMALHO, 2000).

2.5 Fatores que estimulam a proliferação

Após a hepatectomia parcial, as primeiras horas são importantes na recuperação do tecido hepático, que fica vulnerável a substâncias químicas, fatores neurais e hormonais podendo alterar, para melhor ou para pior, a resposta proliferativa (ANDREI *et al.*, 1981; ASAKAWA *et al.*, 1989; LINDROOS *et al.*, em 1991; LIMA *et al.*, 1993; MULLHAUPT *et al.* 1994; LIMA e OTHAKE, 1994; BIONDO-SIMÕES, 2000; JESUS *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, em 2002; SILVA *et al.*, 2002; CASTRO E SILVA 1996 e 2003; SILVA JR *et al.* 2003; LIMA e MELO, 2005; TORRES *et al.*, 2005; OLIVEIRA,

2006; SILVA, 2006; GAMA FILHO *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2014; MONTENEGRO *et al.* 2014). Encontrar fatores que acelerem a proliferação dos hepatócitos e diminuam o tempo de insuficiência hepática em pacientes hepatectomizados, permitirá ressecções mais ampliadas e melhores prognósticos (BAGNATO *et al.*, 2010).

Pesquisadores têm utilizado modelos *in vitro*, com células hepáticas em cultura, e *in vivo* com ratos e camundongos visto que, nesses animais, o processo de proliferação assemelha-se ao do fígado humano (TORDEKE *et al.*, 2014).

O transplante hepático é tratamento definitivo para quadros de insuficiência hepática porém, a escassez de dadores, os custos elevados e a necessidade de terapia de imunossupressão para toda a vida, constituem sérios obstáculos (FIEGEL, 2008). Por isso, a maioria dos trabalhos *in vitro* visa produzir tecido hepático artificial a partir de uma única fonte de célula, ou ativar fatores envolvidos no processo de proliferação, despontando como terapia inovadora e alternativa para substituir o transplante do órgão por inteiro (LIU *et al.*, 2004; YUJI, 2008; DUNCAN *et al.*, 2009; HIRSCHI, 2014; REHMAN *et al.*, 2014).

Liu *et al.*, em 2004, observaram que células derivadas dos canalículos biliares ou da árvore biliar de humanos, podem ser células “progenitoras” do fígado. Yuji *et al.*, em 2008, produziram organoides de parênquima hepático, usando de células embrionárias de suínos, método com potencial aplicação na área de transplantes. Em 2014, Hirschi *et al.*, demonstraram ser possível converter células somáticas diferenciadas em células-tronco multipotentes, com capacidade de gerar todos os tipos de células de tecidos adultos, inclusive tecido hepático.

As células do fígado são de linhagem epitelial e se originam de hepatoblastos durante as fases de desenvolvimento fetais. Após uma lesão aguda, essas células sofrem divisão celular para compensar a perda, no entanto, nos danos crônicos, isso não acontece. Em 2014, Rehman *et al.* mostraram que células-tronco hepáticas e extra-hepáticas da medula óssea e células-tronco mesenquimais, podem substituir as células hepáticas danificadas, suprimindo a capacidade proliferativa do fígado. Duncan *et al.*, em 2009, salientaram uma

característica marcante do fígado, que é a capacidade de manter um tamanho constante, apesar da lesão, e como as células tronco hepáticas mediam o equilíbrio da regeneração com o crescimento excessivo.

Lima *et al.*, 1993, observaram o quanto é importante a inervação parassimpática do fígado na capacidade proliferativa hepática. Em 1994, Lima *et al.* e Othake demonstraram que a proliferação do fígado de ratos, após hepatectomia parcial, era dificultada quando se realizava uma vagotomia do ramo hepático. Esses achados comprovam que fatores neurais têm participação na síntese dos hepatócitos, restaurando a massa hepática.

Machado *et al.*, em 2002, ressaltaram a importância das células de Kupfer e das células endoteliais na proliferação do parênquima hepático, visto que liberam substâncias como os fatores de crescimento e citocinas, que fazem com que os hepatócitos saiam da quiescência e iniciem o ciclo celular.

Lindroos *et al.*, em 1991, constataram que o Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF) estava envolvido, como um potente estimulador, na síntese DNA dos hepatócitos de ratos previamente hepatectomizados. Posteriormente, Mullhaupt *et al.* (1994) ressaltou que os hepatócitos seriam capazes de produzir seus próprios fatores de crescimento, o que ele denominou de regulação autócrina, além de responder a fatores de crescimento produzidos por outras células hepáticas, a regulação parácrina. Quando ocorre a participação de outras substâncias, produzidas por células de outros órgãos que encontram receptores adequados na membrana plasmática dos hepatócitos, é chamada de regulação endócrina (JESUS *et al.*, 2000).

Asakawa *et al.* (1989) e Machado *et al.* (2002) destacaram os agentes que aceleram a proliferação hepática após hepatectomia parcial, as chamadas substâncias mitogênicas: o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), o Fator Transformador do Crescimento (TGF), a Substância Estimuladora Hepática, o Fator de Crescimento de Fibroblasto Ácido, o Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF), Fator do Crescimento do Endotélio vascular (VEGF) e as citocinas (interleucinas). Mas substâncias como a insulina, o glucagon, as prostaglandinas, as fibronectinas, a vasopressina, as angiotensinas e a norepinefrina já tinham sido classificadas como estimulantes mitogênicas por Andrei *et al.*, em 1981.

Outras substâncias exógenas e endógenas têm sido pesquisadas para se saber suas atuações no processo de proliferação do fígado. Biondo-Simões (2000) afirma que a histamina, amina vasodilatadora envolvida nas respostas imunológicas, além de atuar como neurotransmissor e reguladora da fisiologia intestinal, aumenta o número de figuras de mitose no início do processo proliferativo. Em 2010, Gama Filho *et al.* concluíram que a imunossupressão com tacrolimus, um imunossupressor usado em pacientes com órgãos transplantados diminuindo o risco de rejeição, possui efeito estimulatório na proliferação hepática de ratos com hepatectomia alargada.

Através de parâmetros laboratoriais e estudo histológico, Magalhães *et al.* (2014) constataram que a suplementação de glutamina à dieta de ratos, submetidos a hepatectomia de aproximadamente 60%, é benéfica à proliferação de tecido hepático. Aminoácido mais abundante no nosso corpo, a glutamina é fonte de energia para o sistema imune e participa do crescimento muscular a partir da estimulação da síntese proteica (função anabólica). Montenegro *et al.* (2014), seguindo a mesma linha de pesquisa, destacaram o aumento do número de mitoses dos hepatócitos em ratos hepatectomizados que receberam suplemento de arginina, aminoácido básico, principal carreador de nitrogênio, importante na resposta imunológica e na cicatrização de feridas.

Yamaguchi *et al.* (1997), demonstraram em trabalho experimental, que a nutrição parenteral enriquecida com glucagon e insulina pode promover aumento do DNA hepático em ratos submetidos a hepatectomias, o que demonstra participação desses hormônios na proliferação de hepatócitos. O glucagon estimula a síntese de proteína hepática, sendo que glucagon e insulina atuam sinergicamente na regulação da regeneração hepática. Animais desnutridos possuem o tamanho do fígado remanescente significativamente reduzido, marcadores de proliferação (imunohistoquímica) mais baixo e alta taxa de mortalidade, em torno de 15 a 20%, quando comparados a animais de mesma faixa etária e bom estado nutricional (SKULLMAN *et al.*, 1994).

Estudos demonstram que o laser é um instrumento eficiente como bioestimulador, aumentando o metabolismo energético do fígado e, conseqüentemente, aumentando o índice mitótico dos hepatócitos. Trabalhos como os de Silva Jr *et al.* (2003), Castro e Silva (1996 e 2003), Lima e Melo

(2005) e Oliveira (2006) comprovam que aplicação de laser de baixa potência eleva de 50 a 55% a regeneração pós-hepatectomias.

Nas últimas décadas, as pesquisas estão voltadas para produtos naturais, amplamente utilizados pela população do mundo como opção de tratamento e cura de uma série de doenças. Lima *et al.* (2002), Melo (2005), Silva *et al.* (2002), demonstraram que a administração oral, durante quatro dias, do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata*, mais conhecida como “sambacaitá” ou “canudinho”, na concentração de 100 mg/kg/dia, pode estimular a proliferação hepática em ratos que tiveram 67% de seus fígados ressecados. Em 2006, Silva mostrou o efeito da *Sida cordifolia*, popularmente conhecida como “malva-branca” na regeneração hepática. Lima *et al.* (2012) também mostraram que os extratos de *Hyptis fruticosa* (alecrim-do-campo ou alecrim do vaqueiro) e o de *Baccharis trimera* (carqueja), na dose de 100 mg/kg/dia, estimulam a proliferação dos hepatócitos após hepatectomia alargada.

2.6 PLANTAS MEDICINAIS

No final dos anos 60, os movimentos de contracultura de tendência antitecnológica, nos Estados Unidos e na Europa, fortaleceram os conceitos ligados à ecologia. Nos anos 70 e 80, estes movimentos deram uma nova proposta de promoção da saúde, utilizando sistemas terapêuticos e práticas de medicação tendentes ao naturalismo, isto é, tendentes à força curativa da natureza e das terapêuticas dela provenientes (NASCIMENTO; BARROS *et al.*, 2013). A Medicina Tradicional, definida como um conjunto de conhecimentos, atividades e práticas baseado em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, passa a ser mais valorizada pela população e traz de volta antigos sistemas médicos, com terapêuticas populares e outras terapias alternativas (RODRIGUES, 2006; SANTOS E AMARAL, 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde, seguindo a tendência mundial, desenvolve diversas ações complementares que ajudam na promoção da saúde da população. Em maio de 2006, foi publicada a Portaria nº 971 aprovando a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Sistema Único de Saúde (SUS). Essa portaria oficializou o exercício de práticas complementares na rede de saúde pública estadual e municipal. As práticas

complementares mais comuns do SUS são o Reiki (tratamento holístico por imposição das mãos), Lian Gong (técnica chinesa de exercícios para prevenir e tratar dores no corpo), Fitoterapia (utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças), Acupuntura (ramo da medicina tradicional chinesa que consiste na aplicação de agulhas em partes definidas do corpo, para obter resultados terapêuticos) e a Homeopatia (já reconhecida como especialidade médica, dentro da medicina convencional, que utiliza remédios extraídos de substâncias animais, vegetais e minerais).

A fitoterapia é destaque dentre as atividades complementares, com práticas seculares que se baseiam em conhecimento popular das ervas medicinais. Esse é transmitido por gerações, na maior parte das vezes, oralmente, sem as necessárias investigações científicas de seus efeitos farmacológicos e toxicológicos, que validariam sua eficácia (CORDELL e COLVARD, 2005). É fato que os resultados terapêuticos da quase totalidade dos fitoterápicos estão fundamentados apenas no uso popular (FETROW e ÁVILA, 2000).

Segundo dados da OMS (Organização Mundial da Saúde), cerca de 80% da população mundial se utilizam de plantas medicinais, especialmente a dos países em desenvolvimento e a população de baixa renda é a maior consumidora (BARROS, 2006 e 2007; MACHADO *et al.*, 2014). Muitas vezes as ervas medicinais são a única fonte de recurso terapêutico, pois é mais fácil cultivá-las nos quintais de casa ou encontrá-las à venda em feiras populares, do que ter acesso a uma unidade de saúde pública (TORRES, ORTEGÓN e SANDOVAL, 2013). No Brasil, uma grande parte da população não tem acesso a medicamentos industrializados, fato que fortalece a necessidade de utilização de fitoterápicos no atendimento pelo Sistema único de Saúde (SUS) (SACRAMENTO, 2001; ARAÚJO, 2014).

O surgimento do conceito do “natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Esse aumento é preocupante em decorrência da qualidade dos produtos, autenticidade, pureza e composição química dos vegetais. No intuito de oferecer à população produtos de melhor qualidade, o Ministério da Saúde edita normas federais para disciplinar a comercialização dos fitoterápicos (DIAS *et al.*, 2013). Além disso,

para muitos dos usuários de fitoterápicos, o ser natural significa a ausência de produtos químicos, produtos esses que, para a população em geral, representa perigo pois podem causar algum dano ao organismo (MENGUE, et al., 2001).

A insuficiência de estudos científicos dos fitoterápicos é um problema a ser enfrentado. Resgatar o conhecimento popular e dar embasamento científico para a sua utilização, é uma das diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC). Esse programa fomenta pesquisas para a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) e da Relação Nacional de Fitoterápicos, visando catalogar e fiscalizar o cumprimento dos critérios de qualidade, eficácia e segurança das “ervas medicinais”. Estima-se que cerca de dez mil espécies, das cinquenta e cinco mil espécies brasileiras já catalogadas, podem ser consideradas medicinais (FILTER *et al.*, 2014).

Dentre as vantagens relatadas por usuários de fitoterápicos estão o fácil acesso, a ausência de efeitos colaterais e a eficácia. Por isso, grande parte dos médicos da rede pública de saúde prescreve fitoterápicos. Em 2004, um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde verificou que cento e dezesseis municípios, em vinte e dois estados, se utilizam da fitoterapia como prática terapêutica (SPAGNUOLO *et al.*, 2009).

Outra vantagem do uso de plantas medicinais está na contribuição para a manutenção de ecossistemas, preservando e valorizando a flora local. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) promove e estimula a inclusão familiar na cadeia de produção das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos (BARROS, 2006).

A flora brasileira é muito rica. Apresenta mais de cinquenta e seis mil espécies, o que representa 19% da flora mundial (BRASIL, 1998). Segundo a Federação da Indústria do Estado do Amazonas (FIEAM), a Floresta Amazônica é a maior reserva de plantas medicinais do mundo. Essas plantas fornecem fármacos que são difíceis de serem obtidos por síntese química, além de poderem ser modificados, tornando-se mais eficazes e menos tóxicos (TUROLA e NASCIMENTO, 2006).

Por esta razão, empresas farmacêuticas investem em pesquisas da nossa flora nativa, produzindo um mercado que movimenta bilhões de dólares,

anualmente (BARROS, 2006 e 2007; MACHADO; MOURA *et al.*, 2014). O grande incentivador das pesquisas de biodiversidade aplicadas à fitoterapia é o SUS, que é o maior comprador de remédios no Brasil (BENINI *et al.*, 2010).

Para ser considerado um fitoterápico o medicamento tem que ser obtido, exclusivamente, de matérias-primas ativas vegetais. Não é considerado fitoterápico o medicamento que inclua, em sua composição, substâncias ativas isoladas de qualquer outra origem. São medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais (SIMÕES *et al.*, 2002). Os medicamentos alopáticos podem ser associados aos fitoterápicos, porém há sempre o risco de potencializar o medicamento alopático (ARNOUS *et al.*, 2005).

Um produto seguro e eficaz não deve se basear apenas no uso popular, devendo ser validado, experimentalmente, para comprovação de sua ação farmacológica e de toxicidade para o consumo humano. A agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela normatização da produção e uso de medicamentos fitoterápicos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

É importante salientar que o controle de qualidade, coleta, classificação botânica, forma de processamento e armazenamento dos fitoterápicos no mercado nacional e mundial, ainda é muito precário. A presença de impurezas, adulteração e escassez de informações, podem levar o usuário a graves problemas (RODRIGUES *et al.*, 2011).

As plantas medicinais podem ser divididas em dois grupos: o grupo das plantas exóticas (trazidas pelos colonizadores e pelos imigrantes) e o grupo das plantas nativas (BENINI *et al.*, 2010). Entre as mais consumidas estão a erva-cidreira (*Melissa officinallis*), a hortelã (*Mentha pulegium*), o boldo (*Peumus boldus*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), a arruda (*Ruta graveoleus*) e a babosa (*Aloe vera*). A parte do vegetal mais utilizada na preparação do medicamento é a folha, por possuir maior disponibilidade durante todo o ano (SPAGNUOLO *et al.*, 2009);

2.7 *Peumus boldus*

O *Peumus boldus*, conhecido popularmente como boldo ou boldo-do-Chile, é uma planta exótica, de folhagem permanente, da família Monimiaceae, originária das regiões montanhosas e úmidas do Chile (entre latitudes 33° e 39°).

Também pode ser encontrada no Peru, Paraguai, Argentina, América do Norte, Europa e em todo território brasileiro, inclusive no estado de Sergipe (O'BRIEN, 2006; FERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Tem uma longa história de uso medicinal empírico e, como toda planta amarga, é utilizada pela população em forma de chá para afecções do sistema digestório, fígado e vias biliares e por sua propriedade anti-inflamatória (RUIZ *et al.*, 2008).

No extrato de *P. boldus* são encontrados mais de trinta componentes diferentes. Os benefícios terapêuticos desta planta estão associados aos alcaloides benzoquinolínicos como a boldina, isocordina, secoboldina e N-metillaurotetanina; aos flavonoides, com destaque para a catequina e a quercetina e aos óleos essenciais encontrados nas suas folhas e cascas (SCHEMEDA-HIRSCHMANN, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2006 FERNANDEZ *et al.*, 2009).

Em 1988, Pietta *et al.*, fizeram o doseamento de alcaloides, em extratos comerciais de *P. boldus* e observaram uma concentração mínima de boldina (Figura 8). Outros estudos constataram, pelo menos, dezessete alcaloides diferentes, pertencentes à classe dos benzoquinolínicos. A concentração de boldina representa 12 a 19% do conteúdo total desses alcaloides, o que equivale a 0,14% do peso seco das folhas (QUEZEDA *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 2006).

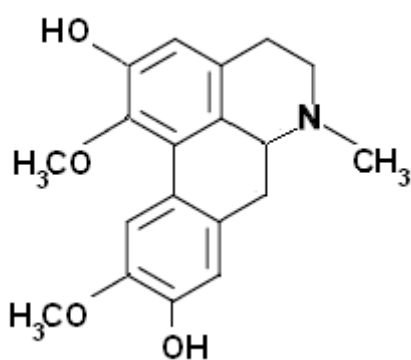


Figura 8: Estrutura química da boldina (S)-2,9 dihiroxi-1, 10-dimetoxi-aporfina

Pesquisas têm demonstrado que a boldina, principal alcaloide encontrado na folha do **boldo**, possui atividade antioxidante, antidiabética e anti-inflamatória (JANG, SONG *et al.*, 2000).

Segundo Quezeda *et al.* (2004) e Schemeda-Hirschmann *et al.* (2003), a ação antioxidante do extrato da folha de **boldo** vem das suas frações de flavonoides (44,1%) e de alcaloides (15,6%). A catequina e a quercetina (Figura 9) são responsáveis por 60,9% do total da atividade antioxidante e a boldina é responsável por 35,6%.

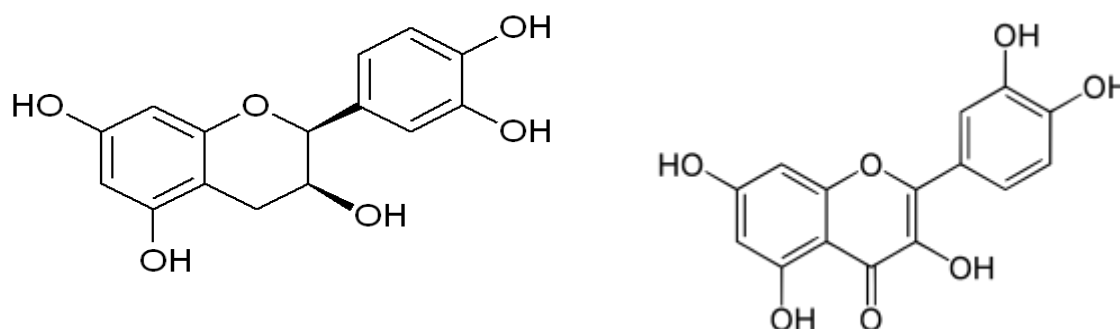


Figura 9: Fórmula química da catequina (C₁₅H₁₄O₆) e da quercetina (C₁₅H₁₀O₇)

A quercetina tem sido amplamente estudada em decorrência da sua potente ação antioxidante. Afabas'Ev, em 1989, já havia demonstrado que esse flavonoide inibia o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes: na iniciação pela interação com íons superóxido, na formação de radicais de hidroxila por quelar íons de ferro e na peroxidação lipídica por reagir com radicais peroxila de lipídeos.

Milstersteiner (2003) observou que uso prolongado de quercetina, em ratos cirróticos, aumentava a sobrevivência dos animais e Vidhya, em, 2009, demonstrou a ação protetora na injúria hepática induzida em ratos. Em 2001, Kang constatou que a quercetina inibia a proliferação e a síntese de colágeno da linhagem HSC-T6 de células fibroblásticas de rato e das células estreladas derivadas de rato. Essas células hepáticas têm um papel fundamental na fibrogênese, tanto em modelos experimentais como em seres humanos com doença hepática crônica. Martinez (2008) comprovou, ainda, a eficácia da quercetina no tratamento nas doenças cardiovasculares, nas funções renal e hepática e no câncer.

A expressiva propriedade antioxidante da boldina, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, é decorrente da sua capacidade em sequestrar radicais

hidroxila e peroxila. A ação antioxidante acontece a partir da neutralização dos radicais livres, que são substâncias reativas geradas pelo próprio metabolismo do organismo ou por fatores exógenos como poluentes, tabagismo ou radiação. As moléculas dos chamados radicais livres apresentam um número ímpar de elétrons na membrana externa ou última camada eletrônica. Isso os torna altamente reativos e instáveis, desestabilizando biomoléculas como carboidratos, ácido desoxirribonucleico e lipídios, retirando delas elétrons e modificando suas estruturas moleculares. Essa desestabilização predispõe o organismo ao envelhecimento precoce e ao aparecimento de doenças degenerativas relacionadas com o estresse oxidativo como câncer, artrite, aterosclerose, disfunção cerebral e doenças cardiovasculares (YOUN, 2002; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2006; FALÉ *et al.* 2012; LAU *et al.*, 2013 a-b).

Ríos *et al.* (1990) observaram que alguns alcaloides benzoquinolínicos inibiram a peroxidação lipídica induzida pelo Fe^{2+} /cisteína, nas membranas dos microsossomos de hepatócitos de ratos. Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é a incorporação de um oxigênio molecular (radical livre) aos ácidos graxos da membrana celular, alterando sua estrutura, o que leva a perda das trocas metabólicas e morte celular. Outros autores, utilizando o mesmo modelo experimental, descobriram que alguns desses alcaloides protegem a desoxirribose, pentose que é a matéria-prima do DNA, a partir do sequestro de radicais hidroxila (MARTINEZ *et al.*, 1992; UBEDA *et al.*, 1993). Cederbaum *et al.* (1992), Jang *et al.* (2000) e Youn *et al.* (2002) confirmaram o que a boldina é o alcaloide responsável pelo eficiente mecanismo antioxidante.

Kringstein e Cederbaum, em 1995, relataram que a boldina diminui a inativação do citocromo P450 e inibe a peroxidação de lipídios nos microsossomos hepáticos. Os citocromos P450 são hemoproteínas responsáveis pela biotransformação de várias moléculas exógenas ou endógenas, que, após inativadas, se tornam mais solúveis e de mais fácil excreção pelo organismo. Algumas dessas moléculas sofrem modificações químicas e tornam-se muito reativas, podendo causar danos teciduais.

Jang *et al.* (2000) investigaram o efeito protetor da boldina e quercetina em ratos diabéticos, após injúria oxidativa mitocondrial produzida por

estreptoizotocina, glicosídeo natural isolado do *Streptomyces achromogene*. Essa espécie de bactéria gram-positiva estimula a produção de radicais livres levando à destruição das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, induzindo a diabetes. A boldina interfere no estresse oxidativo, inativando radicais livres de oxigênio, atenuando o desenvolvimento do diabetes mellitus (Marles, Fransworth, 1995).

Os alcaloides boldina e secoboldina, em amostras de sangue de humanos e de coelhos *in vitro*, mostraram-se eficazes na inibição da agregação plaquetária, controlando a pressão sanguínea. Isso acontece devido a esses alcaloides não permitirem a formação do tromboxano A₂, uma prostaglandina vasoconstrictora produzida pelas plaquetas, cuja finalidade é ativar outras plaquetas, aumentando a agregação (BASILA e YUAN, 2005).

Jimenez *et al* (2000) descreveram que, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, a boldina, quando administrada por via oral, é rapidamente absorvida e fica concentrada, preferencialmente, no fígado. Esse fato facilitou alguns estudos que constataram a propriedade hepatoprotetora da boldina. Lanhers (1991), Fetrow e Ávila (2000) utilizaram o extrato hidoralcóico seco de boldo-do-Chile, em testes de hepatotoxicidade induzida por agentes químicos como o hidróperóxido e clorofórmio, em ratos, e constataram a diminuição de danos à membrana dos hepatócitos.

O efeito hepatoprotetor de extrato das folhas de boldo foi ainda avaliado em fígado de ratos, através da lipoperoxidação induzida por cisplatina, substância que pertence a um grupo de medicamentos chamados citostáticos, utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer. Nesse processo, devido à ação de radicais livres, ocorre a oxidação das cadeias de ácidos graxos, incluindo aqueles que compõem a membrana das células ou organelas, levando a transtornos nas funções exercidas pela membrana, tais como seletividade e transporte, e ao extravasamento do conteúdo de organelas, como as enzimas encontradas nos lisossomos. Os resultados sugeriram efeito protetor em relação ao dano hepático oxidativo causado pela cisplatina, sendo esta capacidade protetora associada aos antioxidantes naturais do extrato do boldo, a boldina e a catequina (FERNANDEZ, LAGO e RIVIERA, 2009).

Ochoa *et al.* (2008) evidenciaram o efeito hepatoprotetor do boldo na toxicidade hepática induzida por paracetamol. Como resultado se obteve uma redução significativa dos níveis das transaminases hepáticas nos grupos tratados com o extrato aquoso, assim como uma diminuição das lesões hepáticas observadas tanto a nível macroscópico como microscópico.

Santanam *et al.* (2004) observaram em experimento *in vivo* que, após a administração de 1mg/kg de boldina por dia, em camundongos, durante doze semanas, ocorreu redução acentuada da aterosclerose, infiltração e depósito de placas de gordura no revestimento interior das artérias; e, em experimento *in vitro*, houve expressiva inibição da oxidação das lipoproteínas LDL que transportam o colesterol do fígado às células do organismo.

A atividade anti-inflamatória atribuída à boldina acontece por ação de bloqueio dos receptores adrenérgicos e antagonistas dos canais de cálcio (BACKHOUSE *et al.*, 1994; BITTNER *et al.*, 2009). Lanhers (1991), Backhouse *et al* (1994) e O'Brien (2005) demonstraram que esta atividade está ligada à ação antioxidante da planta, já que moléculas que interferem na geração de espécies reativas de oxigênio possuem, também, atividade anti-inflamatória.

Duas ações sobre o sistema hepatobiliar ainda são atribuídas à boldina: o aumento da produção da bile pelo fígado (ação colerética) e a modificação da sua composição, que a torna mais fluida, facilitando o fluxo biliar para o duodeno e, por conseguinte, favorecendo a digestão das gorduras (ação colagoga) (SCHUZ *et al.*, 2001; MIZSPUTEN *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2008).

Bittner *et al.* (2009), estudaram a composição dos óleos essenciais do *P. boldus*, substâncias voláteis necessárias à sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos. Esse óleo é composto de ascaridol (34,8%), imoneno (16,1%), eucaliptol (11,9%) e outros terpenoides, sendo o ascaridol seu principal componente (Figura 10).

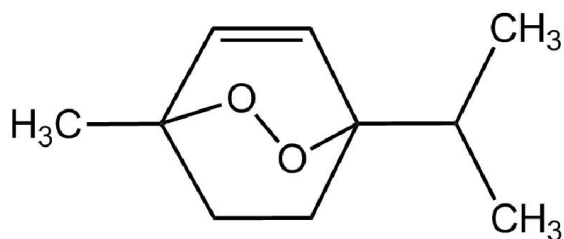


Figura 10: Fórmula química do escaridol (C₁₀H₁₆O₂)

Aos óleos essenciais são atribuídas propriedades medicinais importantes. É relaxante da musculatura lisa intestinal, promovendo um efeito sedativo em processos inflamatórios, particularmente àquelas relacionadas ao fígado, estômago e intestinos, causadas por efeitos de drogas, excesso de álcool, alimentos ou qualquer elemento tóxico ao corpo (LANHERS, 1991; SPEISKY, 1994).

Devido à sua natureza tóxica, este óleo é eficaz como agente antimicrobiano, inibindo a proliferação de bactérias (*Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus sp.* e *Bacillus subtilis*) (VILA *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2006; SANTOS, 2014). Oliveira *et al.* (2006) demonstraram que o óleo essencial do *Peumus boldus* inibiu o crescimento de 58% de cepas de fungos ensaiadas, o que comprova a efetiva capacidade como agente antifúngico contra diversas espécies de *Candida*.

Estudos toxicológicos (SOUZA MARI *et al.*, 2013) sugerem que o chá de boldo deve ser consumido com moderação e cuidado. Almeida *et al.* (2013) observaram que a utilização do extrato hidroalcoólico em ratas prenhes, causava efeitos teratogênicos e abortivos. Nesse mesmo trabalho eles administraram, durante noventa dias, por via oral, o extrato bruto do boldo em ratos machos, e observaram um aumento significativo de nos níveis séricos de colesterol e de transaminases, e redução da bilirrubina total, glicose e ureia nos primeiros trinta dias. Esses resultados mostram que o uso prolongado de boldo pode ser tóxico para o fígado (RUIZ *et al.*, 2008) e pode, ainda, inibir a agregação plaquetária, favorecendo o sangramento e dificultando a cicatrização de feridas. Schwanz *et al.* (2008), confirmaram a ação blastocistotóxica/antizigótica e casos de atividade abortiva e demonstraram, ainda, alterações histológicas no fígado dos ratos.

No chá de boldo foi observado, ainda, a presença de metais pesados, dentre eles ferro, manganês, cobre e níquel. Esses metais são expostos no

ambiente por diversas fontes poluidoras, absorvidos e acumulados nos tecidos da planta que os transfere para a cadeia alimentar, causando efeitos nocivos à saúde animal e humana (SCHWANZ *et al.*, 2008).

As propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, inibidora de ação plaquetária, antimicrobiana, estimulante da digestão e citoprotetora já foram relatadas na literatura científica. Propõe-se, com este trabalho, avaliar o efeito do extrato aquoso do *Peumus boldus* sobre a função e proliferação dos hepatócitos após hepatectomia parcial alargada, em ratos da raça Wistar (*Novergicus albinus*).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o efeito da administração oral do extrato aquoso de *Peumus boldus* sobre a função do fígado e proliferação dos hepatócitos, após hepatectomia parcial alargada, em ratos.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do extrato aquoso do *Peumus boldus* sobre os níveis das enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanino aminotransferase (ALT/TGP) e fosfatase alcalina (GGT) em ratos submetidos a hepatectomias alargadas.
- Avaliar o efeito do extrato aquoso do *Peumus boldus* sobre os níveis sorológicos de glicose, albumina e triglicérides em ratos submetidos a hepatectomias alargadas.
- Avaliar a arquitetura histológica e/ou morfológica celular hepática após hepatectomias alargadas em ratos com e sem a utilização do EAPB.
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de *Peumus boldus* sobre a proliferação dos hepatócitos do fígado de ratos submetidos a hepatectomias alargadas .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato aquoso de *Peumus boldus*

As folhas foram adquiridas na Farmácia Viva do Parque Dr. Augusto Franco (Parque da Sementeira), localizado na Av. Beira-Mar, s/n. Em seguida foram secas, pesadas e trituradas em moinho elétrico, até que um pó de fina granulação fosse obtido. O extrato foi feito a partir do pó, acrescentando-se água destilada (1:10, m/v) sob agitação constante por 4 horas a 35°C. Em seguida foi filtrado, liofilizado e armazenado a 5°C (Figura 11). No momento do uso, o extrato foi dissolvido em água destilada nas concentrações desejadas (100mg/2ml e 200mg/2ml).



Figura 11: Etapas do processo de preparação do extrato de *Peumus boldus*

4.2 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 45 ratos machos, da raça Wistar (*Novergicus albinus*), pesando entre 250 a 350 g, divididos em seis grupos (Tabela 1). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Tiradentes, em caixas de polipropileno e grades metálicas, com cama de maravalha, em ambiente refrigerado variando de 22 a 23° C e umidade relativa de 30 a 70%, conforme as exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (anexo1). Foram alimentados com ração Labina® (Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. A iluminação foi artificial, com alternância de doze horas do ciclo claro-escuro. Foram administrados 100 e 200mg/kg, via gavagem, durante os quatro dias que antecederam a primeira

laparotomia, constituindo o estudo do efeito agudo desse extrato. A gavagem foi feita com os cuidados devidos para reduzir, ao máximo, o estresse dos animais.

Tabela 1. Divisão dos animais em oito grupos de acordo com o delineamento experimental

GRUPOS	Tratamento (4 dias que antecedem à 1ª cirurgia)	1ª cirurgia	Número de ratos	2ª cirurgia	Número de ratos
Sham	água destilada	Manipulação digital	9	Coleta de Material	9
HP70	água destilada	Hepatectomia 70%	5	Coleta de Material	5
HP70/100	100mg/kg do EAPB	Hepatectomia 70%	9	Coleta de Material	8
HP80	água destilada	Hepatectomia 80%	6	Coleta de Material	0
HP80/100	100mg/kg do EAPB	Hepatectomia 80%	8	Coleta de Material	4
HP80/200	200mg/kg do EAPB	Hepatectomia 80%	8	Coleta de Material	4

-Grupo Sham : submetidos a laparotomia exploradora com manipulação do fígado.

-HP 70 e 80 : submetidos a hepatectomias de 70 e 80%, respectivamente. Nestes dois grupos, além da ração e água *ad libitum*, foi administrada água destilada por via oral, uma vez ao dia, em volume semelhante ao que os grupos teste receberam do extrato aquoso do **boldo**, durante os quatro dias que antecederam a 1ª cirurgia. Após 24 foi realizada nova laparotomia e, no momento da eutanásia, foi feita a extração do material biológico para pesquisa: 2 ml de sangue da veia cava inferior de todos os animais, o fígado dos ratos do grupo Sham e o fígado remanescente da hepatectomia do grupo HP70 e 80.

-Grupo HP70/100 e HP80/100: submetidos a hepatectomias de 70 e 80%, respectivamente, com administração oral de 100 mg/kg do EAPB nos quatro dias que antecederam a cirurgia (1ª laparotomia).

-Grupo HP80/200: submetidos a hepatectomia de 80%, com administração oral de 200 mg/kg do EAPB nos quatro dias que antecederam a cirurgia (1ª laparotomia).

Nestes dois grupos, após 24h, foram feitos os mesmos procedimentos: a 2ª laparotomia, a coleta de material para análise e a eutanásia dos animais.

4.3 Procedimento cirúrgico e estado clínico dos animais

As cirurgias foram realizadas sempre no mesmo horário, para evitar influência das variações do ciclo circadiano. Imediatamente, antes das cirurgias, todos ratos foram pesados para a avaliação do peso corporal nos sete grupos.

A anestesia foi feita por uma veterinária, através de injeção intraperitoneal de 50 mg/kg de cloridrato de cetamina (anestésico não barbitúrico) e 20 mg/kg de cloridrato de xilazina (sedativo, analgésico, relaxante muscular e anestésico). A escolha do anestésico utilizado se deu ao fato dessas drogas não possuírem potencial hepatotóxico, pois não são metabolizadas a nível de sistema microssomal hepático.

Os primeiros procedimentos cirúrgicos foram realizados após tricotomia da parede abdominal e antissepsia com clorexidina. O acesso à cavidade foi feito a partir de laparotomia mediana, de cerca de 4 cm, do apêndice xifoide em direção caudal. Após o inventário da cavidade, ratos que apresentaram afecções, a exemplo de tumores, foram excluídos. Nos grupos Sham foi realizada apenas a manipulação digital do fígado. Nos demais grupos foram realizadas hepatectomias alargadas a 70%, com as exéreses dos lobos médio e lateral esquerdo e a 80%, com as exéreses dos lobos médio, lateral esquerdo, caudal e tecido hepático em torno da veia cava. Fez-se a ligadura dos pedículos com fio de algodão 3-0, segundo a técnica padronizada por Higgins e Anderson (1931). Os lobos ressecados foram pesados. A parede abdominal foi fechada com sutura contínua usando mononylon 4-0; o peritônio e a aponeurose em plano profundo e a pele em plano superficial. Após a completa recuperação

pós-anestésica, os animais foram colocados em gaiolas apropriadas, onde foram oferecidas água e ração à vontade, até o próximo procedimento cirúrgico.

Momentos antes do segundo procedimento cirúrgico, os ratos foram pesados e avaliados pela veterinária responsável pelo ato anestésico. Na avaliação clínica foram utilizados os seguintes parâmetros, que variavam de 1 a 3: a agilidade e a sobrevivência do animal ao primeiro ato cirúrgico, onde **1** evidenciavam os animais que se encontravam em boas condições clínicas e ativos; **2** aqueles em boas condições físicas, porém com movimentos espontâneos reduzidos, que reagiam quando estimulados; e **3** os animais vivos, porém sem movimentos espontâneos.

Após a aferição do peso e a avaliação clínica, os ratos foram submetidos à nova laparotomia, mediante a mesma técnica anestésica, com intuito de coletar amostras de sangue através de punção da veia cava inferior e de retirar e pesar o fígado remanescente ou apenas manipulado.

4.4 Avaliação macroscópica e do peso do fígado

Os fígados retirados no segundo ato operatório foram analisados macroscopicamente quanto à coloração. Foi feita, ainda, a aferição da massa úmida do fígado remanescente dos grupos submetidos a hepatectomias de 70 e 80%.

4.5 Interpretação dos resultados da imunohistoquímica

Para o estudo da imunohistoquímica foram utilizadas lâminas silanizadas para evitar deslocamento dos cortes histológicos durante a coloração. Cortes histológicos de 3µm foram obtidos a partir de amostras teciduais fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina. As secções histológicas foram desparafinizadas em xilol e lavadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 90%, 80% e 70%). Para potencializar a reação, foi efetuada a recuperação antigênica por meio da imersão das secções em solução de citrato, aquecido por vinte minutos em micro-ondas. A marcação das proteínas Ki67 foi realizada com anticorpos monoclonais MIB-1 (Dako, Glostrup, Denmark) na diluição 1:50, ambos por trinta minutos. A revelação da reação foi feita com o uso da diaminobenzidina (DAB, Ventana

Medical Systems, Tucson, AZ, USA) e a contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Meyer, por quatro minutos cada procedimento.

Em cada lâmina, foram fotomicrografadas dez campos histológicos (ampliação de 400x) selecionados por casualização sistemática, de cima para baixo. As imagens fotomicrografadas foram digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000@.

As identificações das lâminas foram ocultadas ao examinador para a realização da análise cega quanto ao grupo experimental. Os campos histológicos foram selecionados da esquerda para a direita e de cima para baixo, até atingir 1000 hepatócitos em cada animal estudado. A seguir foi realizada uma análise quantitativa na qual foi avaliado o índice de hepatócitos marcados pela seguinte fórmula:

$$IHM = \frac{HM \times 100}{HNM}, \text{ onde}$$

IHM: índice de hepatócito marcado

HM: hepatócito marcado

HNM: hepatócito não marcado

4.6 Análise histológica do fígado

As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído tamponado (10%, pH 7,4) durante 48 h, descalcificadas em ácido nítrico a 5% durante 72 horas, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, e **diafinizadas** em xilol para inclusão em parafina. Subsequentemente, dez secções histológicas (5µm de espessura) foram obtidas e coradas em hematoxilina-eosina para análise com um microscópio de luz (microscópio óptico Olympus CX31) por dois observadores treinados. Os parâmetros morfológicos sugestivos de estresse funcional hepático analisados neste estudo, foram: degeneração hidrópica, esteatose, inflamação portal, inflamação e necrose parenquimatosa. A intensidade das mudanças morfológicas foram avaliadas como se segue: 0 (ausência de alteração morfológica); 1 (alterações morfológicas que afetam menos de 10% dos hepatócitos); 2 (alterações morfológicas que afetam entre 10% e 50% dos hepatócitos); e 3 (mudanças morfológicas que afetam mais de 50% dos hepatócitos). Obtida a média ± DP.

4.7 Métodos de análise sorológica da função hepática

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 rpm por dez minutos e o soro foi separado e analisado pela técnica Cinética Biocromática, utilizando-se kit da marca comercial Labtest Diagnóstica S.A. (Belo Horizonte, MG, Brasil), através de aparelho automático modelo Dimension AR do fabricante Date Behring®. Foram dosados aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutanil transpetidase (GGT), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), e albumina (ALB).

4.8 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de distribuição gaussiana, por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição gaussiana foram comparados entre si, por meio de teste T de Student pareado para análise de amostras de médias dependentes e T de Student não pareado para médias de amostras independentes. Dados com distribuição não-gaussiana e de amostras independentes foram comparados entre si pelo teste U de Mann-Whitney. Foram consideradas significativas a diferença entre médias quando $p < 0,05$.

4.9 Aspecto ético da pesquisa

Esta pesquisa foi submetida à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT), seguindo os parâmetros de princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (anexo 1). A obtenção do Parecer de Aprovação do Projeto de Pesquisa está registrada no número de protocolo **021114** e foi realizada no Laboratório de Morfologia e e Biologia Estrutural (LMBE), localizado no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes (UNIT), em Aracaju (SE).

5 RESULTADOS

Neste estudo, observou-se diferença significativa no peso corporal dos animais tratados com 100 mg/Kg EAPB em comparação com o grupo em que foi administrado água destilada (Tabela 2, $p > 0,05$).

Tabela 2: Peso o corpo dos animais submetidos a hepatectomias de 70% e tratados com água destilada e 100 mg/Kg de EAPB

	Massa corpórea (g)		Valor de p (bicaudal) ^b
	HP70+AD	HP70+EAPB	
Pré-operatório	258,2±38,3	271.1±16,9	0,35
Pós-operatório	236,7±33,7	259,0±17,7	0,08
Valor de p (bicaudal) ^a	< 000,1	< 0,0001	

^a Teste T Student's pareado; ^b Teste T Student's não pareado

Em ambos os grupos experimentais (HP70+AD e HP70+EAPB), observou-se um aumento significativo no peso dos fígados remanescentes 24 h após o primeiro tempo cirúrgico (Tabela 3, $p < 0,0001$). No entanto, o índice de regeneração hepática observado no grupo tratado com água destilada só foi estatisticamente comparável àquele tratado com 100mg/Kg de EAPB ($p = 0,84$).

Tabela 3: Peso de fígado dos animais submetidos a hepatectomias de 70% e tratados com água destilada e 100 mg/Kg de EAPB

	Massa do fígado (g)		Valor de p (bicaudal) ^b
	HP70+AD	HP70+EAPB	
Fígado remanescente (30%)	2,5±03	2,6±0,1	0,44
Fígado remanescente (24h)	4,1±0,4	4,2±0,3	0,49
Valor de p (bicaudal) ^a	< 0,0001	< 0,0001	
Índice regenerativo (%)	39,4±9,4	38,7±4,1	0,84

^a Teste T Student's pareado; ^b Teste T Student's não pareado

Na avaliação macroscópica e morfológica no primeiro ato cirúrgico, observou-se que todos os fígados apresentavam características compatíveis com a normalidade. No momento da segunda cirurgia, o fígado remanescente apresentava aspecto marcheteado e amarelado, típico da degeneração gordurosa decorrente da agressão cirúrgica pela hepatectomia alargada. Este aspecto foi semelhante tanto no grupo teste como no controle (Figuras 12a e 12b).

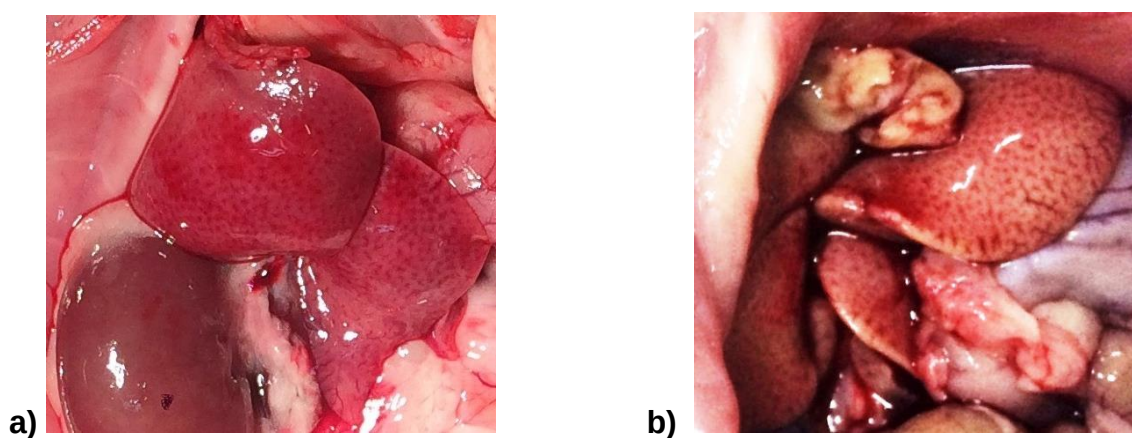


Figura 12: **a)** apresentação macroscópica do fígado no primeiro momento cirúrgico: parênquima liso, friável e de cor marrom avermelhada escura, típico do órgão com grande aporte sanguíneo; **b)** apresentação macroscópica do fígado remanescente, durante o segundo momento cirúrgico: o parênquima apresenta-se marcheteado e amarelado, devido à infiltração gordurosa após a hepatectomia alargada

Antes do segundo procedimento cirúrgico, vinte e quatro horas após a primeira hepatectomia, os ratos foram avaliados pela a veterinária. Todos os animais do grupo Sham e os submetidos a hepatectomias de 70% tratados com o EAPB apresentavam-se mais ativos/mais ágeis (+++). Os ratos hepatectomizados a 70% e tratados com água destilada apresentavam variação de agilidade entre ++ e +++ . Os animais submetidos a hepatectomia de 80% e tratados com EAPB, apresentavam níveis entre + e ++ , enquanto que os ratos que receberam apenas água destilada, não sobreviveram.

A hepatectomia mais alargada, a 80%, provocou a morte de todos os animais que não receberam tratamento com o EAPB. Enquanto que, nos animais que sofreram a mesma agressão hepática e receberam o tratamento agudo do EAPB, houve sobrevivência de 50% destes, tanto nas dosagens de 100 como de 200mg/kg do EAPB (Figura 13).

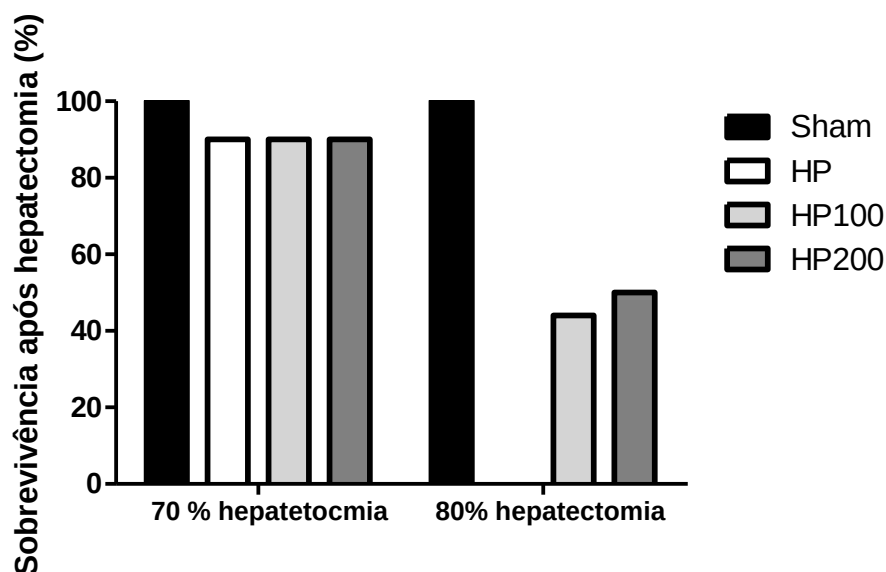


Figura 13 . Análise de sobrevivência dos animais submetidos a manipulação cirúrgica do fígado e a hepatectomia de 70 e 80%

Após hepatectomia parcial alargada em ratos com e sem a utilização do EAPB, foram encontrados os escores médios da intensidade das alterações da arquitetura histológica e/ou morfologia celular hepática sugestivas de estresse funcional, em ambos os grupos (Tabela 4). A vacuolização citoplasmática não-lipídica, interpretada como degeneração hidrópica, foi caracterizada pela perda progressiva de eosinofilia e rechaçamento dos grânulos citoplasmáticos para a periferia, discreta balonização celular e, por vezes, picnose nuclear (Figura 14A). Não houve diferença nos escores médios de degeneração hidrópica hepática nos grupos estudados ($p=0,792$). A vacuolização lipídica, ou esteatose macrovesicular, caracterizou-se por intensa picnose e excentricidade nuclear associada a formação de vesícula clara (negativa ou lipóide) intracitoplasmática (Figura 14B). Os escores médios de vacuolização citoplasmática lipídica (esteatose) foram significativamente

menores no grupo tratado com EAPB quando comparado ao grupo tratado com água destilada ($p=0,02$). A reação inflamatória periportal (Figura 14C), quando evidenciada, variou entre leve a moderada e esteve representada por linfócitos e ocasionais neutrófilos, enquanto que a inflamação intraparenquimatosa (Figura 14D) foi predominantemente leve; contudo, não houve diferença significativa em relação ao tratamento utilizado ($p=0,195$ e $p=0,495$, respectivamente). Os corpos apoptóticos, estruturas eosinofílicas homogêneas e globulares, por vezes contendo restos nucleares picnóticos em seu interior (Figura 14E), foram igualmente raros em ambos os grupos ($p=0,906$). De modo geral, as áreas de necrose, quando presentes, eram focais e, em sua maioria, afetavam pequenos grupos celulares e, comumente, promoviam discreta infiltração inflamatória local (Figura 14F). Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos quanto aos escores médios de necrose, deve ser ressaltado que em 20% dos espécimes do grupo HP+AD, essa alteração foi notada em pouco mais de 50% do parênquima hepático remanescente. Áreas tão extensas de necrose não foram evidenciadas no grupo HP+EAPB.

Tabela 4. Escores médios de intensidade das alterações histopatológicas hepáticas nos dois grupos estudados

Variáveis histológicas	Grupo HP70+AD		Grupo HP70+EAPB		Valor de p (teste de Mann Whitney)
	Média $\pm$ DP	Mediana (min-máx)	Média $\pm$ DP	Mediana (min-máx)	
• Degeneração hidrópica	2,8 $\pm$ 0,41	3 (2 – 3)	2,86 $\pm$ 0,35	3 (2 – 3)	0,792
• Esteatose	1,3 $\pm$ 0,67	1 (0 – 2)	0,56 $\pm$ 0,63	0 (0 – 2)	0,020
• Inflamação portal	1,4 $\pm$ 0,51	1 (1 – 2)	1,00 $\pm$ 0,53	1 (0 – 2)	0,145
• Inflamação intraparenquimatosa	0,3 $\pm$ 0,48	0 (0 – 1)	0,53 $\pm$ 0,51	1 (0 – 1)	0,495
• Necrose	1,1 $\pm$ 1,10	1 (0 – 3)	0,46 $\pm$ 0,51	0 (0 – 1)	0,175
• Apoptose	0,9 $\pm$ 0,31	1 (0 – 1)	0,86 $\pm$ 0,35	1 (0 – 1)	0,906

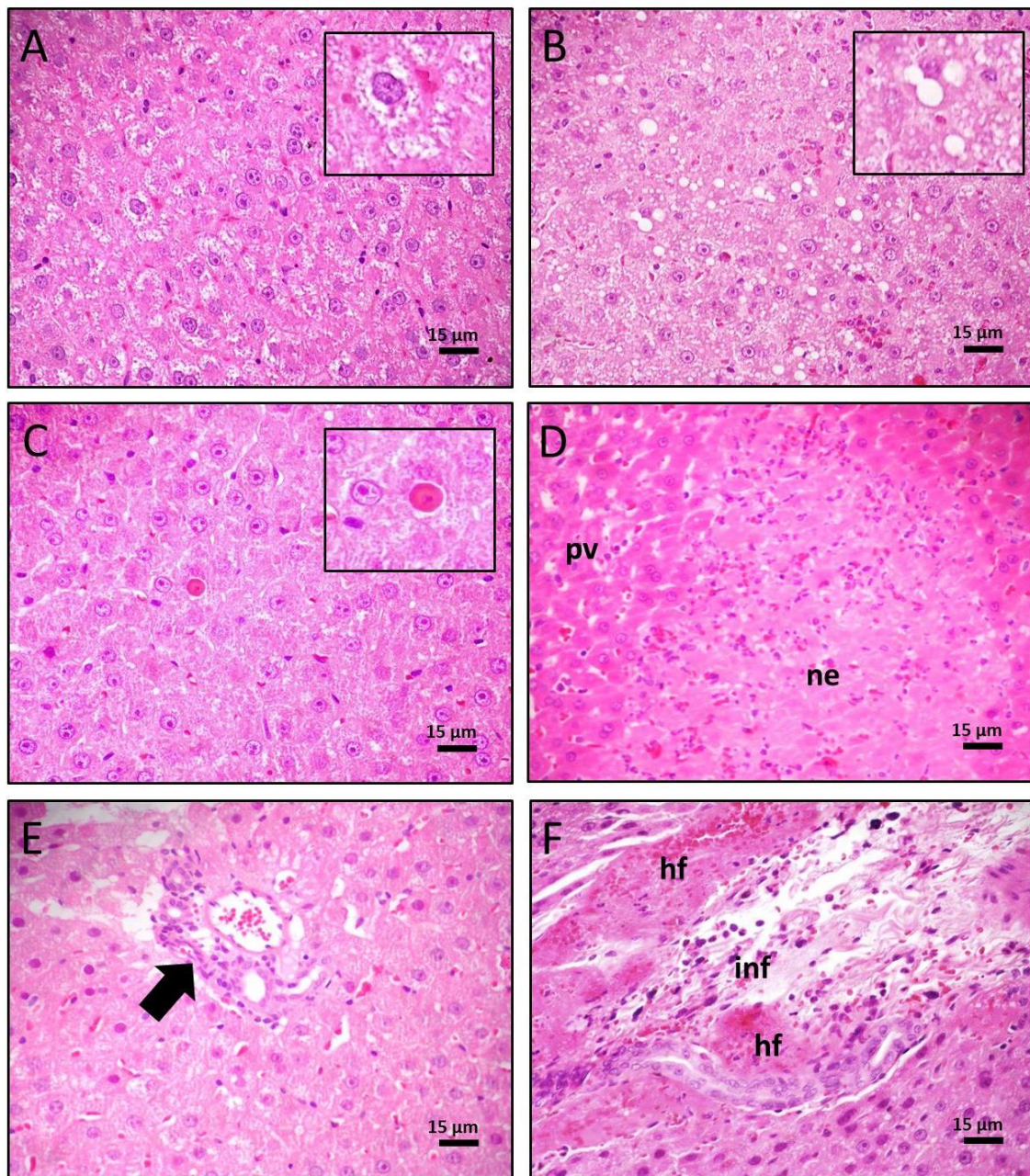


Figura 14. Secções histológicas coradas em hematoxilina/eosina (H/E) mostrando as principais alterações histopatológicas do parênquima e estroma hepáticos observadas nos grupos estudados. **(A)** Vacuolização não lipídica compatível com degeneração hidrópica em animal do grupo tratado com EAPB e **(B)** vacuolização lipídica consistente com esteatose macrovesicular em amostra de animal tratado apenas com água destilada. **(C)** Corpo apoptótico e **(D)** área de necrose (ne) circundada por parênquima viável (pv) em amostras hepáticas de animal tratado apenas com EAPB e água destilada, respectivamente. **(E)** Reação inflamatória focal intraparenquimatosa (seta) e **(F)** inflamação portal difusa (inf) associada a áreas hemorrágicas focais (hf) em amostras hepáticas de animal tratado com água destilada.

Observou-se positividade, significativamente maior, na marcação do Ki67 nos hepatócitos dos grupos de ratos submetidos a hepatectomia a 70% que receberam tratamento de 100mg/kg do EAPB do que daqueles hepatectomizados e tratados com água destilada (Figura 15) (Figura 16 a e b).

Figura 15: índice proliferativo das amostras dos fígados remanescentes após 24 h de hepatectomia alargada (70%) nos grupos experimentais (teste de t de Student).

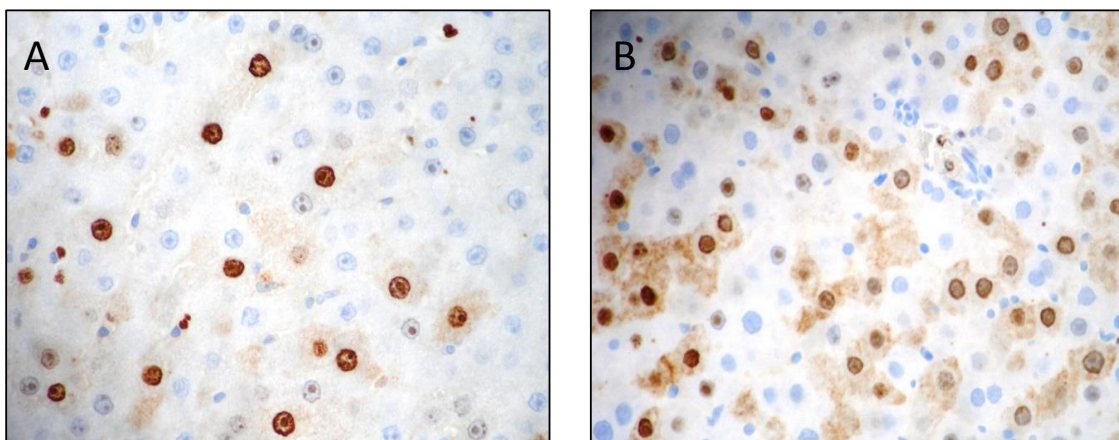
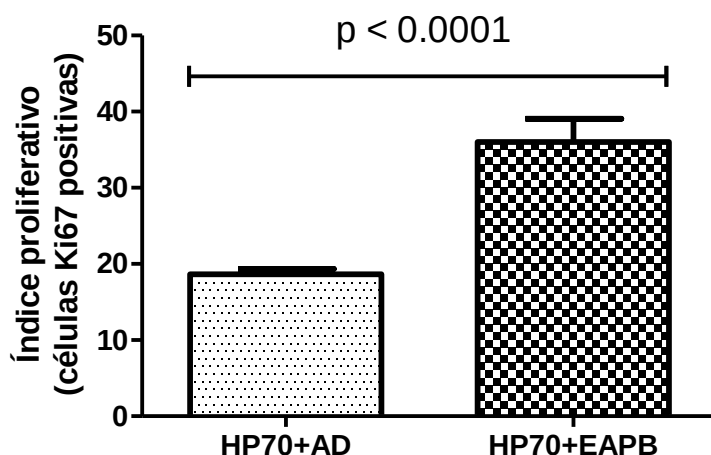


Figura 16. **A)** marcação para o antígeno Ki67 em secção histológica de tecido hepático de rato hepatectomizado a 70% e tratado com água destilada ; **B)** marcação forte e difusa para o antígeno Ki67 em secção histológica de tecido hepático de rato hepatectomizado a 70% e tratado com o EAPB (SABC, 400 x)

Os ratos hepatectomizados a 80% e tratados com água destilada não sobreviveram. Enquanto que houve sobrevivência de cinquenta por cento dos ratos submetidos a hepatectomia de 80% e que foram tratados com 100 e 200mg/kg do EAPB. O fígado desses ratos apresentaram marcação positiva de Ki-67, indicando proliferação hepática (Figuras 17a e 17b).

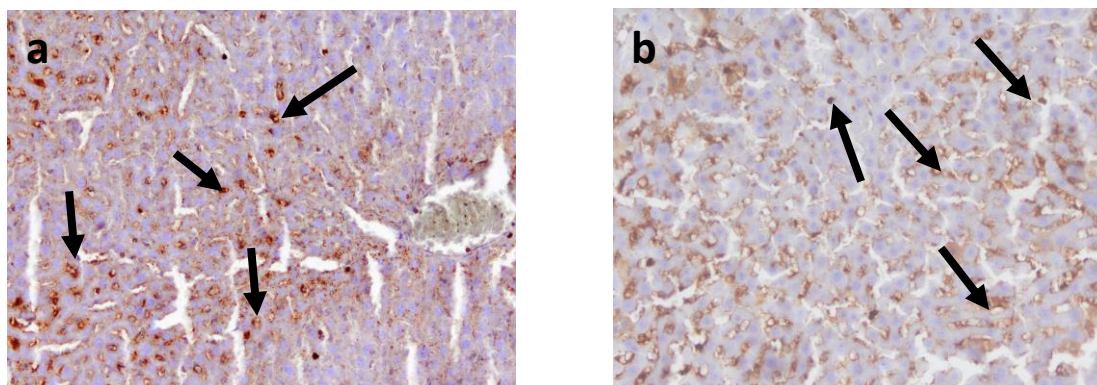


Figura 17: Secções histológicas mostrando o resultado da imunohistoquímica de fígados de rato 24horas após hepatectomia parcial a 80%: **a)** grupo HP100/80 **b)** grupo HP80/200 (as setas mostram hepatócitos marcados pelo Ki67)

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores sorológicos do colesterol, glicemia, triglicérides, aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase, fosfatase alcalina, como também da bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta dos animais dos grupos estudados submetidos a hepatectomia a 70% com e sem tratamento de EAPB (Tabela 5).

Tabela 5: Análise bioquímica dos parâmetros sorológicos dos animais submetidos a hepatectomias de 70% e tratados com água destilada e 100 mg/Kg do EAPB

Parâmetros sorológicos	HP70+AD		HP70+EAPB		Valor de p ^a
	Média	DP	Média	DP	
Glicose (mg/dL)	114,56	35,68	134,13	24,66	0,486
Bilirrubina total (mg/dL)	0,16	0,03	0,18	0,09	0,213
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,11	0,03	0,13	0,07	0,175
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,05	0,03	0,06	0,04	0,533
Triglicérides (mg/dL)	25,89	15,21	46,63	63,13	0,584
Colesterol (mg/dL)	46,33	11,83	52,38	14,59	0,588
Fosfatase alcalina (U/L)	403,44	108,54	488,75	162,15	0,169
Aspartate aminotransferase (U/L)	463,22	232,64	530,50	254,44	0,114
Alanine aminotransferase (U/L)	444,89	163,10	525,38	213,61	0,383

^a Unpaired T Student's test.

6 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foram utilizados ratos da raça Wistar (*Novergicus albinus*), por serem animais dóceis e de baixo custo tanto de aquisição como de manutenção; e, ainda, por apresentarem elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgica e serem o modelo experimental *in vivo* mais empregado para documentar a atividade proliferativa hepática (HIGGINS e ANDERSON, 1931) . Foram escolhidos animais jovens porque a idade pode comprometer a resposta regenerativa pós-hepatectomia parcial e, do gênero masculino, visando atenuar a reconhecida influência dos estrógenos na regeneração hepática (FRANCAVILLA *et al.*, 1989). Não houve diferença no peso dos ratos em relação aos grupos estudados, o que denota a homogeneidade dos animais.

Os métodos de estudo mais comuns para demonstrar o índice de regeneração hepática são a macroscópica, o peso úmido ou seco do fígado remanescente e o estudo microscópico a partir da verificação da cinética de proliferação dos hepatócitos. A proliferação é verificada através da expressão de genes e da síntese de antígenos nucleares em ensaios de imunohistoquímica, como o antígeno Ki67, técnica de custo moderado e alta sensibilidade. No presente estudo não houve diferença no aspecto macroscópico e do peso úmido do fígado entre os grupos estudados. Entretanto, em virtude da maior sensibilidade da técnica de imunohistoquímica, observou-se positividade significativamente maior na marcação do Ki67, nos hepatócitos dos grupos de ratos submetidos a hepatectomias a 70% e que receberam tratamento do EAPB, do que daqueles hepatectomizados e tratados com água destilada.

O tamanho relativo dos lobos do fígado varia de um rato para outro e, a massa de fígado ressecada, também é variável. Em geral, a massa removida de fígado é de menor importância, enquanto que as variações tornam-se relevantes quando se calcula a massa de fígado remanescente, após ressecções alargadas e, especialmente, durante a tentativa de determinar a massa hepática mínima compatível com a sobrevivência dos animais. No presente trabalho o peso úmido dos fígados ressecados e remanescentes foram uniformes, tanto no grupo controle como no teste, portanto sem interferência no resultado do índice de proliferação alcançado pelo estudo imunohistoquímico. Esses achados levam a crer que o resultado de maior proliferação de hepatócitos nos animais que

receberam tratamento com EAPB se deva, de fato, à interferência positiva desse extrato no fígado em regeneração.

Os hepatócitos são o principal alvo de estudo da regeneração, pois constituem 90% da massa hepática e 60% do número total de células (AGUIAR *et al.*, 2011). Vários fatores influenciam na replicação dos hepatócitos com ação direta ou indireta na síntese de DNA. Esses fatores são chamados mitogênicos ou co-mitogênicos, respectivamente. (ANDREI *et al.*, 1981; ASAKAWA *et al.*; 1989; GORLA *et al.*, 2001 MAGALHÃES *et al.*, 2014; MONTENEGRO *et al.*, 2014).

Autores destacam o extrato das folhas de *Peumus boldus* como uma substância hepatotrófica e, por isso hepatoprotetora. Eles baseiam essa hipótese de estímulo mitogênico no fato desse fitoterápico apresentar, em sua composição química, alcaloides como a boldina e flavonoides como a quercetina, compostos ativos com propriedades antioxidantes já muito bem comprovadas. (DROGE, 2002; SANTANAM *et al.*, 2004; O'BRIEN, 2006; SOUSA *et al.*, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2009).

Segundo dados existentes na literatura, as folhas de boldo contêm alcalóides pertencentes à classe dos benzoquinolínicos, sendo a boldina o principal alcaloide (O'Brien *et al.*, 2006). Suas atividades farmacológicas, decorrentes da ação antioxidante, já foram bem estudadas. (LANHERS, 1991; MARTINEZ *et al.*, 1992; CEDERBAUM *et al.* 1992; UBEDA *et al.*, 1993; BACKHOUSE *et al.*, 1994; FRANSWORTH, 1995; KRINGSTEIN e CEDERBAUM, 1995; HIDALGO *et al.*, 1998; JIMENEZ *et al.*, 2000; FETROW e ÁVILA, 2000; JIMENEZ *et al.*, 2000; JANG *et al.*, 2000; YOUN *et al.*, 2002; RANCAN *et al.*, 2002; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003; SANTANAM *et al.*, 2004; YUAN, 2005; FERNANDEZ, LAGO e RIVIERA, 2009; BITTNER *et al.*, 2009; O'BRIEN *et al.*, 2006; FALÉ *et al.*, 2012; LAU *et al.*, 2013 a-b). Nas folhas de boldo são encontrados, ainda, os flavonoides (catequina e quercetina) responsáveis por 60% da atividade antioxidante do boldo. Esses flavonoides, além de inibirem o estresse oxidativo hepático são, também, responsáveis pela oxidação de LDL, peroxidação de fosfolípidos da membrana, peroxidação lipídica microssomal e mitocondrial, peroxidação de eritrócitos e fotoxidação e peroxidação de cloroplastos (SCHEMEDA-HIRSCHMANN, 2003; SANTANAM *et*

al.; 2004 O'BRIEN *et al.*, 2006 ;FERNANDEZ *et al.*, 2009). No presente estudo, o possível efeito hepatoprotetor pode ser justificado pela presença dos alcaloides e flavonoides no extrato de *Peumus boldus*.

No óleo essencial das folhas do *Peumus boldus* são encontrados, basicamente, terpenoides, sendo o ascaridol seu principal componente. (LANHERS, 1991; SPEISKY, 1994). Ainda não existem estudos que indiquem ação hepatoprotetora diretamente ligada ao óleo essencial. Porém, Lima *et al.* (2002), Melo (2005) e Silva, *et al.* (2002), demonstraram que a administração, durante quatro dias, do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata*, mais conhecida como “sambacaitá” ou “canudinho”, pode estimular a proliferação de hepatócitos em ratos submetidos a hepatectomia de 67%. Semelhante ao *Peumus boldus*, o óleo essencial da *Hyptis pectinata* contém 33 compostos, com predominância de monoterpenos, e seus principais constituintes são o timol e o β -terpineno. Portanto, os efeitos verificados com a utilização do EAPB em ratos hepatectomizados, podem ser decorrentes do óleo essencial no boldo, com ação hepatoprotetora à semelhante da ação observada com o *Hyptis pectinata*.

A ação da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática pode ser sinérgica a da insulina e do o IGF-1 ("insulin-like growing factor"), aumentando a síntese de DNA. Em 2006, Silva mostrou o efeito da *Sida cordifolia*, popularmente conhecida como “malva-branca”, na regeneração hepática. Essa planta que possui flavonoides e alcaloides semelhantes aos do *Peumus boldus*. Silva sugere que o extrato da malva-branca age também estimulando a insulina, importante fator co-mitogênico, facilitando a cinética proliferativa. Não existem estudos que comprovem a ação dos alcaloides e flavonoides da *Sida cordifolia* diretamente no hepatócito. É possível que a ação do EAPB, sobre o fígado em regeneração, se deva a presença desses flavonoides e alcaloides.

Viana *et al.*, em 2011, observou que os extratos de *Baccharis trimera* (carqueja) e *Hyptis fruticosa* (alecrim-do-campo ou alecrim do vaqueiro) também estimulam a proliferação do parênquima hepático após hepatectomia. Como o boldo, esses fitoterápicos apresentam flavonoides e alcaloides como seus componentes químicos, o que reforça a ideia de que a ação benéfica do EPAB se deva à presença desses componentes.

A eficiência da restauração compensatória do fígado está diretamente relacionada à quantidade de perda tecidual. A partir desta afirmação, acreditava-se que 70% de hepatectomia era o estímulo máximo para se conseguir a proliferação dos hepatócitos em ratos. (HIGGINS e ANDERSON, 1931; COUART *et al.*, 2002; BIONDO e SIMÕES, 2007; MORTENSEN, 2011; KELE, 2012). Ressecções mais extensas do fígado, nas cirurgias experimentais com ratos, apresentavam alta taxa de mortalidade sendo consideradas modelo de falência hepática fulminante (GAUB e IVERSEN, 1984; EMOND *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 2000; HAMAZAKI *et al.*, 2002). Porém, novos procedimentos cirúrgicos, baseados no conhecimento mais detalhado da anatomia vascular hepática e no uso de substâncias com possível ação mitogênica, tornaram viável a realização de hepatectomias mais alargadas de 80, 85 e 90%, com taxa de sobrevivência significativa (EGUCHI *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1997; KOGURE *et al.*, 1999; MADRAHIMO *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2015).

No presente trabalho verificou-se que, vinte e quatro horas após a hepatectomia mais alargada em torno de 80%, que consistiu na ressecção dos lobos mediano, lateral esquerdo, caudado e do tecido hepático em torno da veia da veia cava, houve morte de todos os animais que não receberam tratamento com o EAPB. Porém, houve sobrevivência de 50% e marcação positiva de hepatócitos dos animais que sofreram a mesma agressão hepática e receberam o tratamento agudo do EAPB, nas dosagens de 100 e 200mg/kg. É possível que um dos componentes do EAPB apresente propriedades que auxiliem a função e a proliferação hepática. A hipótese de estímulo mitogênico pode se dar em virtude desse fitoterápico apresentar, em sua composição química, alcaloides como a boldina e flavonoides como a quercetina, compostos ativos com propriedades antioxidantes. (DROGE, 2002; SANTANAM *et al.*, 2004; O'BRIEN, 2006; SOUSA *et al.*, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2009).

Pesquisas sobre a regeneração hepática e de fatores que podem acelerar esse processo são importantes para a área da saúde (Bbiondo,2007). Portanto, este estudo pioneiro merece ser complementado, com o intuito de identificar os princípios ativos presentes na *Peumus boldus* e os mecanismos que participam no estímulo da proliferação do hepatócito.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração aguda, via oral, do extrato aquoso, bruto e liofilizado das folhas de *Peumus boldus*, na concentração 100 mg por quilo de animal, durante os quatro dias anteriores à hepatectomia parcial 70 % em ratos, exerce efeito positivo na proliferação de hepatócitos e mantém a função hepática inalterada, 24 horas após a hepatectomia. E conclui-se, ainda, que a administração aguda de EAPB na concentração de 100 e 200 mg/kg reduziu a mortalidade dos animais submetidos a hepatectomia alargada de 80%, com resposta positiva ao estímulo de proliferação dos hepatócitos.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados encontrados são de extrema relevância, visto a escassez de pesquisa dos produtos naturais, tão utilizados pela população. Havendo a comprovação científica, esse produto, de baixo custo e fácil aquisição, poderá ser utilizado como um coadjuvante da função hepática, em doses seguras.

9 REFERÊNCIAS:

AFABAS'EV, I.B. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory Action of rutin and quercetin in lipid peroxidation Biochem. Pharmacol., v. 38, p. 1763-9, 1989;

ABREU C.L.C.; PRESGRAVE O.A.F.; DELGADO I.F. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle de qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária Revista do CFMV, v. 45, p. 20-27, Brasília, 2008;

AGRA M.J.; 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. 114-1410, 2007;

AGUIAR L.R.F. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos a hipertensão portal pós-hepática ABCD Org. Bras. Cien. Dig.; p. 144-151; abr-jun 2011;

ALMEIDA, E.R. Toxicological evalution of hydro-alcool extract of dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats Phytotherapy research, v. 14, n. 2, p. 99-102, 2013;

ALMEIDA, E. R; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldina in rats Phytoterapy Research, v.14, p. 99-102, 2000;

AMARAPURKAR D.; KAMANI P.; PATEL N. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: popular based study Ann. Hepatol. , v. 9, n. 161, 2007;

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.*, v. 72, p. 265-272, 1981;

ARAÚJO C.R.F.; SILVA A.B.; TAVARES E.C.; COSTA E.P.; MARIZ S.R. Profile and prevalence of the use of medicinal plants in a local Public Health Service Family Clinic in Campina Grande, Paraíba *Rev. ciênc. farm. básica apl.*, v. 35, n. 2, 2014;

ARNOUS A.H.; SANTOS A.S.; BEINNER R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular interesse por cultivo comunitário *Rev. Espaço para Saúde*, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun 2005;

ASAKAWA K.; HIZUKA N.; TAKANO K.; HORIKAWA R.; SUREGAWA I.; TOYODA C.; SHIZUME K. Human growth hormone stimulates liver regeneration in rats *J. Endocrinol. Invest*, v. 12, p. 343-347, 1989;

ASSY N.; MINUK G.Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applicatio *J. Hepotol.*, v. 26, n. 4, p. 945-952, 1997;

BACKHOUSE N.; DELPORTE C.; GIVERNAU M.; CASSELS B. K.; VALENZUELA A.; SPEISKY H. Antiinflammatory and antipyretic effects of boldine *Agents and Actions*, v. 42, n. 3-4, p. 114-117, 1994;

BAGNATO V.S., KURACHI C., CASTRO e SILVA O. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases *Acta Cir. Brasil*. v. 25, p. 214-216, 2010;

BARROS, N.F. de. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: uma ação de inclusão *Revista Ciência e Saúde Coletiva*. v. 11,n. 3, Rio de Janeiro, jul-set 2006;

BARROS, N.F., SIEGEL, P., DE SIMONI, C. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares: passos para o pluralismo na saúde. v. 23, n.12, Rio de Janeiro, dez 2007;

BASILIA D.; YUAN C.S. Effects of dietary supplements on coagulation and platelet function Thrombosis Research, v. 117, p. 49-53, 2005;

BELLATO H.R.; CARVALHO B.; IRULEGUI R. S. C.; ANDRADEM C.A.; BARACHO N. C. V. Histopathological analysis of the liver, stomach and intestines of mice undergoing acute ethanol exposure Rev. Ciências e Saúde, v. 5, n. 2, 2015;

BENINI E.B.; SARTORI M.A.B.; BUSCH G.C. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico Rev. Destaque Acadêmico, ano 2, n. 3, 2010;

BIONDO-SIMÕES M.L.P.; MATIAS J.E.F. *et al.* Influência da glutamina na regeneração hepática Revista de Medicina, v. 8, .n. 4, p. 219-223, 2007;

BIONDO-SIMÕES M.L.P.; GRECA F.H.; SAMANIOTTO G.H.; TECHY F.; SOARES D.P.; KANNENBERG C.; CASTRO C.C.L.; VASCONCELOS C.N. Effect of histamine on liver regeneration Acta Cir. Bras., v. 15, n. 1, São Paulo, Jan/Mar 2000;

BIONDO-SIMÕES M.L.; MATIAS J.E.F., MONTIBELLER G.R.; SIQUEIRA L.C.D.; NUNES E.S.; GRASSI C.A. Effect of aging on liver regeneration in rats Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21, n. 4, p. 197-202, 2006;

BITTNER N.; AGUILERA M.; HERNÁNDEZ V.; ARBERT C.; BECERRA J.; CASNUEVA E. Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus Mol* Chilean Journal of Agricultural Research, v. 69, p. 30-37, 2009;

BONTRAGER K. L. Técnica radiológica e base anatômica. 7. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2009;

BRANDÃO M.G.L.; COSENZA G.P.; MOREIRA R.A.; MONTE-MOR R.L.M. Pharmacopeia. Rev. Bras. Farmacogn. , v. 16, p. 408-420, 2006;

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 1998;

CABRERA-ABREU J.C.; GREEN A. Gamma-glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics Ann. Clin. Biochem., v. 39, n. 22 ,2002;

CADWELL S.H.; CRESPO D.M. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease J. Hepatol., n. 40, v. 578, 2004;

CÁMARA C.; BORNANCINI C.A.; CABRERA J.L.; ORTEGA M.G.; YUDIAL.M. Quantitative analysis of boldine alkaloid in naturalextracts by cyclic voltammetry at a liquid–liquid interface andvalidation of the method by comparison with highperformance liquid chromatography TALANTA v. 83,p. 623–630, 2010;.

CAPELOZZI, V.L. Papel da imunohistoquímica no diagnóstico da câncer de pulmão J. Bras. Pneumol., v. 35, n. 4, 2009;

CARVALHO A.C.B.; BALBINO E.E.; MACIEL A.; PERFEITO J.P.S. Situação do registro nde medicamentos fitoterápicos Rev. Bras. Farmacogn., v. 18, n.2, p.314-319, 2008;

CASTRO e SILVA O.; RAMALHO L.Z.; ZILIO S.; BAGNATO V.S.; GRANATO R.G. Aspectos básicos da regeneração hepática e o papel da luz laser e convencional como agentes estimulantes Acta Cir. Brasil, v. 11, p. 14-16, 1996;

CASTRO e SILVA O.Jr.; SILVA R.L., MELO V.A.; LIMA S.O. *et al.* Proliferative effect of medicinal plants and laser on liver regeneration. A considerable experimental model: from experimental model to clinical applications Acta Cir. Bras., v. 18, n .5, São Paulo, 2003;

CASTRO e SILVA O.Jr.; ZUCOLOTO S.; MARCASSA L.G.; KURACHI C.; MELO C.A., RAMALHO F.S.; RAMALHO L.N.; BAGNATO V.S. Spectoral response enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats *Lasers Surg. Med.*, v. 32, p. 50-53, 2003;

CEDERBAUM A.I.; KUKIELA E.; SPEISKY H. Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine *Biochemical Pharmacology*, v. 44; p. 1765-1772, 1992;

CENTER S.A. Interpretation of liver enzymes *Veterinary clinics small animal practice*, v. 37, n. 2, p. 297-333, mar., 2007;

COUINAUD C.M. Le foie: études anatomiques et chirurgicales Paris, Masson, 1954;

COSTA-LOTUFO L. V.; MONTENEGRO R. C.; ALVES A. P. N. N; MADEIRA S. V. F.; PESSOA C.; MORAES M. E. A.; MORAES, M. O. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará *Rev. Virtual Quím.*, v. 2, n. 1, p. 47-58. Data de publicação na Web: 30 de agosto de 2010 <http://www.uff.br/rvq>

CORDELL G.A.; COLVARD M.D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology *J. Ethnopharmacol*, v. 100, p. 5-14, 2005;

COURT F.G.; WEMYSS-HOLDEN S., DENNISON A.R.; MADDERN G.J. The mystery of liver regeneration *Br. J. Surg.*, v. 89, n. 9, p. 1089-1095, 2002;

DIAS E.G.E.; VALENZUELA V.C.T.; ALVES M.R.;DUARTE M.G.R.; GARCIA E.F. Qualidade e autenticidade de folhas de *Echinodorus grandiflorus* oriundos de fornecedores de São Paulo *Rev. Bras. de Plantas Med.*, v. 15, n. 2, 2013;

DIEHL A.M.; RAI D. Review: Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines *J. Gastroenterol. Hepatol*, v. 11, n. 5, p. 466-470, 1996;

DONG XIN ZHANG; CHONG HUI LI ;AI QUN ZHANG; SHAN JIANG;
YAN HUA LAI; XIN LAN; KE PAN; JIA HONG DONG mTOR-Dependent
Suppression of Remnant Liver Regeneration in Liver Failure After Massive Liver
Resection in Rats Digestive Diseases and Sciences, v. 60,n. 9, p. 2718-2729,
2015;

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function Physiol
Rev , v. 82, p. 47-95, 2002;

DUNCAN A.W.; DORRELL C.; GROMPE M. Stem cells and liver regenerationn
Gastroenterology, v.137, n. 2, p. 466-81, 2009;

EGUCHI S.; KAMLOT A.; LJUBIMOVA J., *et al.* Fulminant hepatic failure in rats:
survival and effect on blood chemistry and liver regeneration.
Hepatology, v. 24, p. 1452–1459, 1996;

ELLIS G.; GOLDBERG D.M.; SPOONER R.J.; WARD A.M. Serum enzyme tests
in diseases of the liver and biliary tree Am. J. Clin. Pathol., v. 70(2) n. 248, 1978;

EMANI J. *In vivo in vitro* correlation: from theory to application J. Pharm. Sci. , v.
2, n. 2, p. 169-189, 2006;

ERLINGER S,; ARIAS I.M., DHUMEAUX D. Inherited disorders of bilirubin
transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and
consequences Gastroenterology, v. 146, n. 1625, 2014;

FALÉ P.L.; AMARAL F.; AMORIN M.P.J.; SOUZA S.M.; FLORÊNCIO M.H.;
FARZÃO F.N.; SERRALHEIRO M.L. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidante
activity and toxicityof *Peumus boldus* water extracts on HeLa and acaco-2 cell
lines Food and Chemical Toxicology, v. 50, p. 2656-2662, 2012;

FARGES O.; GOUTTE N.; BENDERSKY N., *et al.* Incidence and risks of liver
resection: an all-inclusive French nationwide study Ann Surg, p. 256:697, 2012,.

- FAUSTO N. Liver regeneration J. Hepatol.,v. 32, n. 19, p. 1477-1487, 2002;
- FAUSTO N.; LAID 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, 1995;
- FELEKOURAS E.S.; KAPARELOS D.C.; PAPALAMBROS E. The history of liver surgery, hepatectomy and haemostasis Hellenic Journal of Surgery, v. 82, n. 5., p. 280-296, 2010;
- FERNANDEZ J.; LAGOS P.; RIVERA P. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. Phytotherapy Research, v. 23, n. 7, p. 1024-1027, 2009;
- FERNANDEZ J.; LAGOS P.; RIVERA P.; ZANORAO-PONCE E. Effects of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion in lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. Phytother Res. , v. 23, n. 7, p. 1024-1027, jul 2009;
- FERREIRA C.T.; RABERVEL T. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. Rev. Bras. Epidemiol., v. 7, n. 4, dez, 2004;
- FETROW C.W.; ÁVILA J.R. Manual de Medicina Alternativa. Rio de Janeiro:Guanabara/Koogan, p. 743, 2000;
- FIEGEL H.C.; KAUFMANN P.M.; BRUNS H.; KLUTH D.; HORCH R.; VACANTI J.P.; KNESER U. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory. J Cell Mol Med., v. 12, n. 1; p.56-66, 2008;
- FILTER M.; FREITAS E.M.; PÉRICO E. Effect of different BAP and NAA concentration on micropropagation of *Malva sylvestris*. Rev. Bras. Plantas Med., v. 16; n. 1, 2014;

FLADMARK K.E.; GJERTSEN B.T.; MOLVEN A.; MELLGREN G.; VINTERMYR O.K.; DOSKELAND S.O. Gap junctions and growth control in liver regeneration and isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, v. 25, n. 4, p. 847-855, 1997;

FLEXA, L.A.; SILVA, G.H. Estudo da ação hepatoprotetora da quercetina em modelo experimental de lesão hepática por paracetamol em ratos, 2012;

FRANCAVILLA A.; BARONE M.; TODO S.; ZENG Q.H.; PORTER K.A.; STARZL T.E. Augmentation of rat liver regeneration by FK506 compared with cyclosporin. *Lancet*, v. 2, n. 8674, p. 1248-1249, 1989;

FREITAS, D. Fígado e Vias Biliares. In: *Gastroenterologia Clínica e Laboratorial*, Freitas Diniz ed., p. 537-566, 2005;

FRIEDMAN L.S. Approach to the patient with abnormal liver biochemical and function tests. *Up To Date*, 2015;

GAMA FILHO. O.; TORDEKE E.L.; BARRETA G.A.P.; SAKAMOTO D.G.; AGULHAM M.A.; TAMBARA E.M. *et al.* Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.*, v. 23, n. 2, p. 74-80, 2010;

GARTNER L.; HIATT J. L. *Tratado de Histologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, P. 430-433, 2007;

GAUB J.; IVERSEN J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology*, 1984;

GONZÁLEZ F.H.D.; SILVA S.C. Perfil bioquímico sanguíneo. In: *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. 2ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, cap. 8, p. 315-358, 2006;

GORLA Jr. J.A.; FAGUNDES D.J.; PARRA O.M.; ZAIA C.T.B.V.; BANDEIRA C.O.P.; TAHA M.O. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. *Acta Cir Bras*, v. 16, n. 3, 2001;

GUYTON A.C., HALL J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 881-886, 2011;

HAQ I. Safety of medicinal plants. *Pakistan Journal of Medical Research*, v. 43, n. 4, p. 203-210, 2004;

HAMAZAKI K.; DOI Y.; KOIDE N. Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, v. 49, p.1514 –1516, 2002;

HERNANDEZ G.E.A; FRIEDMAN S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.*, v. 6, p. 425-456, 2011;

HIDALGO M.E.; FARAH M. CARRASCO L. Boldine as sunscreen its photoprotector capacity against uvb radiation. *Cosmet Toiletries*, v. 113, p. 59-66, 1998;

HIGGINS G.M.; ANDERSON R.M. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical remove. *Arch. Pat.*, n. 12, p. 186-202, 1931;

HIRSCHI K.K.; LI S.; ROY K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine *Annu Rev Biomed Eng* , v. 16, p. 277-94, 2014;

HUCH M. Regenerative biology. The versatile and plastic liver *Nature*, v. 517, p.155-156, Jan, 2015;

INUE A.H.; ANDRADE A.C.; FERREIRA A.L. *et al.* *Atlas de patologia geral*. 2ª ed., Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina/ Paraná, 2013;

JANG Y.Y.; SONG J.H.; SHIN Y.K.; HAN E.S.; LEE C.S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rat. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, v. 42, n. 4, p. 361-371, 2000;

JEMAL A.; BRAY F.; CENTER M.M. Global cancer statistics. *C A Cancer Journal Clinic*, v. 61, p. 69, 2011;

JESUS R.P.; WALTZBERG D.L.; CAMPOS F.G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 46, n. 3, São Paulo, jul/set 2000;

JIMENEZ I.; GARRIDO A.; BANNACH R.; GOTTELAND M.; SPEISKY H. Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 339-343, 2000;

JIN S, FU Q, WUYUN G, WUYUN T. Management of post-hepatectomy complications. *World J Gastroenterol* v. 28, n. 19(44), p. 7983-91, 2013;

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

KANG, L.P. Effect of genistein and quercetin on proliferation, collagen synthesis, and type I procollagen mRNA levels of rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 22, n. 9, p. 793-796, 2001;

KELE P.G.; de BOER M.; van der JAGT E.J.; LISMAN T., PORTE R.J. Early hepatic regeneration index and completeness of regeneration at 6 months after partial hepatectomy. *Br J Surg.* , v. 12, n. 99, p. 1113-1119, 2012;

KESKIN N.; MAMMADOV R.; ILI P. The effects of *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz extract on biochemical indices and apoptosis in partially hepatectomized liver in rats. *Bosn J Basic Med Sci.*, v. 12, n. 3, p. 177-181, 2012;

KIM H.Y.; KIM C.W.; LEE C.D.; CHOI J.Y.; PARK C.H.; BAE S.H.; YOON S.K.; PARK Y.M. Can "healthy" normal alanine aminotransferase levels identify the metabolically obese phenotype? Findings from the Korea national health and nutrition examination survey 2008-2010 *Dig. Dis. Sci.*, v. 59, n. 6, p. 1330-1337, 2014;

KLIMACZEWSK C.V.; SARAIVA R.A.; ROOS D.H.; BOLINGON A.; ATHAYDE M.L.; KAMDEM J.; BARBOSA N. V.; ROCHA J.B.T. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)–citrate in rat liver mitochondria *in vitro*. *Industrial Crops and Products*, v. 54, p. 240–247, 2014;

KNOPP J.; MACHO L.; FICKOVA M.; ZORAD S.; KVET N.Y.R.; JARO S.C. Insulin and catecholamines act at different stages of rat liver regeneration. *Ann N Y Acad Sci*, v. 827, p. 489-393, 1997;

KOGURE K.; ISHIZAKI M.; NEMOTO M. *et al.* A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, v. 6, p. 171-175, 1999;

KRINGSTEIN P.; CEDERBAUM A.I. Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502E1. *Free Radical Biol Med*, v. 18, p. 559-563, 1995;

KUBOTA T.; TAKABE K.; YANG M. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, v. 4, p. 398 – 403, 1997;

LANHERS M.C.; JOYEUX M.; SOULIMANI R.; FLEURENTIN J.; SAYAG M.; MORTIER F.; YOUNUS C.; PELT J.M. Hepatoprotective and anti-inflamatoty

effects of a tradicional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Medica*, v. 57, n. 2, p.110-115, 1991;

LAU Y.S.; TIAN X.Y. HUANG Y.; MURANG D.; ACHIKE F.I.; MUSTAFA M.R. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. *Biochemical Pharmacology*, v. 85, n. 3, p. 367-375, 2013a;

LAU Y.S.; TIAN X.Y.; ACHIKE F.I.; MURUGAN D.; MUSTAFA M.R.; LIU J.; ZHANG Y.; LAU C.W.; HUANG Y. Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. *British Journal of Pharmacology*, v. 170, n. 6, p. 1190-1198, 2013b;

LAWRENCE S.; FRIEDMAN M.D. Liver biochemical tests that detect injury to hepatocytes, UpToDate, 2014;

LINDROOS P.M.; ZARNEGAR R.; MICHALOPOULOS. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increase in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*, v. 13, p. 743-750, 1991;

LIMA I.O.; OLIVEIRA R.A.G.; LIMA E.O.; FARIAS N.M.P.; SOUZA E.L. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006;

LIMA S.O. Influência da inervação parassimpática do fígado na regeneração dos hepatócitos, na insulinemia portal, na glicemia e na taxa de lipídios totais do fígado após hepatectomia parcial em ratos. [Tese de Doutorado] Ribeirão Preto: USP, 1989;

LIMA S.O.; CENEVIVA R. Role of the hepatic branch of the left vagus nerve in DNA synthesis by hepatocytes of rats subjected to partial hepatectomy. Research in Surgery, v. 5, p. 181-183, 1993;

LIMA S.O.; CENEVIVA R. Importance of the branch of the left vagus—influence on lipid levels of regenerating liver in rat. International Hepatology Communications, v. 2, p. 223-226, 1994;

LIMA S.O.; MELO G.B.; MELO V.A.; ANTONIOLLI A.R.; BAGNATO V.S.; ZUCOLOTO S.; RAMALHO F.S.; MARCASSA L. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. Digestive Diseases and Sciences, v. 50, n. 5, p. 949-954, 2005;

LIMA S.O.; SILVA R.L.; MELO G.B.; ANTONIOLLI A.R.; ARAGÃO de V.; RAMALHO F.; LEANDRA N.Z.; ZUCOLOTO S.; SILVA JÚNIOR O.C. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. Acta Cir. Bras., v. 17, n. 3, p. 101-105, 2002;

LIMA S.O.; VIANA L.D.A. C.; SANTANA F.R.; ZUCOLOTO S.; ALBUQUERQUE JUNIOR R.L.; GOMES M.Z. Proliferative effect of aqueous extract of *hyptis fruticosa* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats Acta Cir Bras. , v. 27, n. 1, p. 71-75, 2012;

LIMA S.O.; CABRAL F.L.D.; PINTO NETO A.F.; MESQUITA F.N.B.; FEITOSA M.F.G.; SANTANA V.R. Epidemiological evaluation of abdominal trauma victims submitted to surgical treatment Rev. Col. Bras. Cir., v. 39, n. 4, 2012

LIU C.; SCHREITER T; DIRSCH O.; GERKEN G.; OLDHAFFER K.J.; BROELSCH C.E.; TREICHEL U. Presence of markers for liver progenitor cells in human-derived intrahepatic biliary epithelial cells Liver Int., v. 42; n. 6; p. 669-78, 2004;

LONDON J.A.; PARRY L.; GALANTE J.; BATTISTELLA F. Safety of early mobilization of patients with blunt solid organ injuries. Arch Surg., v. 143, n. 10, p.972-976, 2008;

LOPES-JÚNIOR A.G.; BELEBECHA V.; JACOB C.E. Hepatectomy: a critical analysis on expansion of the indications. ABCD Arq. Bras. Cir. Dig., v. 27, n. 1, São Paulo, jan/mar 2014;

LORENZINI S.; GITTO S.; GRANDINI E.; ANDREONE P.; BERNARDI M. Stem cells for end stage liver disease: How far have we got? World J Gastroenterol , v. 14, n. 29, p. 4593-4599, 2008;

MACHADO H. L; MOURA V.L.; GOUVEIA N.M.; COSTA, G.A.; ESPINOLA F.S.; BOTELHO, F.V. Research and extension activities in herbal medicine developed by Rede FitoCerrado: rational use of medicinal plants by elderly in Uberlândia – MG. Rev. Bras. Plantas Med., v. 16, n. 13, Botucatu-SP, July/Sept 2014;

MACHADO A.L.S.; ROCHA R.F.; SANTOS R.C.S. Partial hepatectomy: the study of the proliferative response. Rev. Biociências, v. 8, n. 2, Rev. biociênc.,Taubaté, v.8, n.2, 2002;

MADRAHIMOV N.; DIRSC O.; BROELSCH C.; DAHMEN U. Marginal Hepatectomy in the Rat:From Anatomy to Surgery. Annals of Surgery , v. 244, n. 1, July, 2006;

MAGALHÃES C.R.; MALAFAIA O.; TORRES O.J.M.; *et al.* Liver regeneration with l-glutamine supplemented diet: experimental studies in rats. Rev. Col. Bras. Cir., v. 41, n. 2, p. 117-121, 2014;

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, 2006;

MARLES R.J.; FARANSWORTH N.R. Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine, v. 2, p. 137-189, 1995;

MARTIN P.; DiMARTINI A.; FERG S. Evolution for liver transplantation in adults: 2013 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and American Society of Transplantation. Hepatology, v. 59, 2014;

MARTÍN, V. Sistema digestivo 3, glândulas digestivas We Sapiens Org. open knowledge community, 2012;

MARTINS A.C.A.; MACHADO A.M. The intra-hepatic approach for liver resections. Rev. Col. Bras. Cir., v. 35, n. 1, 2008;

MARTINEZ, J.A.B. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. J Bras Pneumol., v. 34, n. 7, p. 445-452, 2008;

MARTINEZ L.A.; RÍOS J.L.; PAYÁ M.; ALCARAZ M.J. Inhibition of nonezyme lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. Free Radical Biological Medical, v. 12, p. 287-292, 1992;

MELO G.B.; SILVA R.L.; LIMA S.O.; ANTANIOLLI A.R.; CASTRO e SILVA T.; MARCASSA L.G.; BAGNATO V.S.; ZUCOLOTO S.; RAMALHO L.N.; RAMALHO F.S.; CASTRO e SILVA O. Jr. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. Acta Cir. Bras., v. 17, suppl. 3, São Paulo, 2005;

MENGUE, S. S.; MENTZ, L.A.; SHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. Revista Brasileira Farmacognosia, v.11, p. 21-35, 2001.

MILTERSTEINER, A. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 18, n. 3, p. 232-7, 2003;

MIZSPUTEN S.J.; SZEJINFELD J.; AMBROGINI Jr O.; SHIGUEOKA D.; THULER F.P.G.M.; FREIRE FILHO E.O. Avaliação ultra-sonográfica da resposta motora da vesícula biliar em adultos assintomáticos após medicação fitoterápica. Gastroenterol. Endosc. Dig, v. 24, n. 4, p. 181-185, 2005;

MICHALOPOULOS G.K.; De FRANCES M.C. Liver regeneration. SCIENCE, v. 276, p.60-66, 1997;

MICHALOPOULOS G.K. The liver is a peculiar organ when it comes to stem cells. Am. J. Pathol., v. 184, p. 1263-1267, 2014;

MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o estudo de doenças do fígado. Prática Hospitalar, Ano IX, n. 51, p. 44-48, 2007;

MIYAOKA Y.; MIYAJIMA A. To divide or not divide: revisity liver regeneration. Cell Div. (Lond.) v. 8, p. 1-12, 2013;

MONTENEGRO W.S.; MALAFAIA O.; NASSIF P.A.N.; *et al.* Evaluation of liver regeneration with use of diet supplemented with L-arginine. Acta Cir. Bras., v. 29, n. 9, p. 603-607, 2014;

MORAIS S.M.; CAVALCANTI S.B.; COSTA S.M.O.; AGUIAR L.A. 2009 Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 1B, p. 603-607, 2009;

MORTENSEN K.E.; REVHAUG A. Liver regeneration in surgical animal models - a historical perspective and clinical implications. Eur. Surg. Res., v. 46, n. 1, p.1-18, 2011;

MOTTA E.V.S.; PINTO N.C.C.; DUQUE A.P.N.; MENDES R. F.; BELLOZI P.M.Q.; SCIO E. Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activity of Mucuna pruriens (L.) DC. Leaves. Rev. Bras. Plantas Med.,v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013;

MOTTA V.T. Bioquímica Clínica: Princípios e interpretações. 5ª edição, Medbook, p. 99-116, 2009;

MULLHAUPT B.; FERE A.; FODORE J.A. A liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. J. Biol. Chem., n. 269, n. 31, p. 19667-19670, 1994;

MUTLU E.A.; KESHAVARZIAN A.; MUTLU G.M. Hyperalbuminemia and elevated transaminases associated with high-protein diet. Scand. J. Gastroenterol., v. 41, n. 759, 2006;

O'BRIEN P.; CARRASCO-POSO C.; SPEISKY H. Boldine and its antioxidante or health-promoting properties. Chemico-biological interactions, v. 159, p. 1-17, 2006;

OCHOA C. Efecto protector de Peumus Boldus en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. CIMEL, v. 13, n. 1, p. 20-25, 2008; disponível em: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13_n1/pdf/a05v13n1.pdf

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. A ONU e a governance, 2014. Disponível em: <http://www.onu.org.br/a-onu-em-ação/>, acessado em: 13 de março de 2015;

OLIVEIRA F.O.; SILVA T.C.; SANKARANKUTTY A.K.; PACHECO E.G.; FERREIRA J; BAGNATO V.B.; ZUCOLOTO S.; CASTRO e SILVA O. The effect of laser on remanescant liver tissue after 90% hepatectomy in rats. Acta Cir. Bras., v. 21, suppl. 1, São Paulo, 2006;

OTHAKE M.; SAKAGUAHI T.; YOSHIDA K.; MUTO T. Hepatic branch vagotomie can suppress liver regeneration in partially hepatectomized rats. HPB Surgery, v. 6, issue 4, p. 277-289, 1993;

OVERTURF K., AL DHALIMY M., FINEGOLD M., GROMPE M. The repopulation potencial of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. Am. J. Phatol., n. 155, p. 2135-2143, 1999;

PAES-BARBOSA, COLAGROSSI F.; FERREIRA F.G.; SZUTAN L.A. Hepatectomy preoperative planning. Rev. Col. Bras. Cir., v. 37, n. 5, p. 370-375, Sep/Oct, 2010;

PANQUEVA R.P.L. Hepatopathology for gastroenterologists and hepatologist
Rev Col Gastroenterol, v .28, n. 2, 2013;

POCOCK G; RICHARDS C.D. Fisiologia Humana: a base da Medicina, 2ª ed.
rev. amp., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 427, 2006;

PRATT D.S.; KAPLAN M.M. Avaliação da função hepática. In: Harrison Medicina
Interna, 17ª ed., Rio de Janeiro, Editora Graw-Hill Interamericana do Brasil, p.
1923-1927, 2008;

PRESGRAVE O. A proposal of establishing a Brazilian center of validation of
alternative methods In: Abstracts of the 7º WORLD CONGRESS ON
ALTERNATIVES & ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES, v. 26, n. 19,
Rome/Italy, 2009;

PRETE, A.D. *et al.* Herbal products: benefits, limits and applications in chronic
liver disease Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.
2012, article ID 837939, 2012;

QUEZEDA M.; ASECIO M.; DEL VALLE J.M.; AGUILERA J.M.; GÓMES B.
Atioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction and flavonoid from boldo
(*Peumus boldus Molina*) leaves Journal of Food Science, v. 69, p. 371-379,
2004;

QUIRINO G S. Scientific and traditional knowledge: it is good for what? Ciência &
Educação , v. 21,n. 2, 2015;

RACAN R.; ROSAN S.; BOEHM K. Protection against uvb irradiation by natural
extracted from lichens. J. Photochem. Photobiol., v. 68, p. 133-139, 2002;

RAMALHO F.S. Regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da
angiotensina Acta Cir. Bras., v. 12, n. 2, São Paulo, 2000;

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

RATES S.M.K. Plants as source of drugs. Toxican, n. 39, p. 603-613, 20

REHM J.; SAMOKHVALOV A.V.; SHIELD K.D. Global burden of alcoholic liver diseases J Hepatol, v. 59, n. 160, 2013;

REHMAN K.; IQBAL M.J.; ZAHRA N.; AKASH M.S. Liver stem cells: from preface to advancements Curr Stem Cell Res Ther, v. 9, n. 1, p. 10-21, 2014;

RICTHER K.P. Doenças do fígado e do sistema hepatobiliar . Gastroenterologia de pequenos animais. 2ª ed. São Paulo: Roco, cap. 9, p. 283-348, 2005;

RÍOS J.L.; CHOLBI A.I.; HUGUET A.; MORA S.; MAÑEZ M.; PAYÁ M. ALCARAZ M.J. Effects of benzylisoquinolines on lipid peroxidation and superoxide scavenging. Planta Medica, v. 56, p. 645-656,1999;

ROBBINS S.L., COTRAN, R.S. Pathologic basis of diseases. Elsevier Editora Ltda., p. 842-898, 2010;

RODRIGUES C.R.; DIAS J.H.; de MELLO R.N.; RICHTER M.F.; PICADA J.N.; FERRAZ A.B. Genotoxic and antigenotoxic properties of Baccharis trimera in mice. J Ethnopharmacol., v. 125, n. 1, p. 97-101, 2009;

RODRIGUES, A.G.; PEREIRA, A.M.; DE SIMONI, C; *et al.* Relatório da Gestão 2006/2010: Práticas Integrativas e Complementares do SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Brasília-DF, fev 2011;

RODRIGUES A.G.; SANTOS M.G.; AMARAL A.C.F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Brasília-DF, 2006;

ROTHSCHILD M.A.; ORATZ M.; SCHREIBER S.S. Serum albumin. *Hepatology*, v. 8, n. 385, 1988;

RUIZ A.L.T.; TAFFARELLO D.; SOUZA V.H.S.; CARVALHO J. E. *et al.* Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Rev. Bras. de Farmacog.*, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008;

SACRAMENTO H.T. Fitoterapia nos serviços públicos do Brasil. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, v. 5, p. 28, UNESP, 2000;

SANTANAM N.; PENUMETCHA M.; SPEISKY H.; PARTHASARATHY S. A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDL^{R-/-} mice. *Atherosclerosis*, v. 173, p. 203-210, 2004;

SANTOS Z. S.; BOBEK V.B.; PIETRUCHINSKI E. Evaluation of the activity of essential oil antifungal *Peumus boldus* facing the yeast species *Candida albicans*. *Visão Acadêmica*, v. 15, n. 2, 2014;

SARAC T.P.; SAX H.C.; DOERR R. *et al.* Preoperative fasting improves survival after 90% hepatectomy. *Arch Surg*, v. 129, p. 729 –733, 1994;

SCHEMEDA-HIRSCHMANN G.; RODRIGUEZ J.A.; THEODULOZ C.; ASTUDILLO S.L.; FERESIN G.E.; TAPIA A. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ('Boldo'), *Free Radic.Res.*, v. 37, p. 447-452, 2003;

SCHINONI, Ml. Fisiologia hepática. *Gazeta Médica da Bahia*, n. 2 (140), 2008;

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Rational Phytotherapy. A Physician's Guide to Herbal Medicine, 4th Ed., Berlin, Springer-Verlag, 2001;

SCHWANZ M.; FERREIRA J.J.; FROEHLICH P.; ZUANAZZI J.A.S.; HENRIQUES A.T. Pharmacobotanical Characterization of *Peumus boldus* Molina

(Monimiaceae) and Evaluation of the Pharmacological Activities of Alkaloid Boldine. Lat. Am. J. Pharm., v. 27 n. 6, p. 871-879, 2008;

SCHWANZ M.; FERREIRA J.J.; FRÖEHLICH P.; ZUANAZZI J.A.S.; HENRIQUES A.T. Análise de metais pesados em amostras de *Peumus boldus* Mol. Ver. Bras. Farmacogn. , v. 18, p. 98-101, 2008;

SCOTTÉ M.; MASSON S.; HIRON M.; *et al.* Cytokine gene expression in liver following minor and major hepatectomy in rat. Cytokine, v. 9, n. 11, p. 859-867, 1997;

SILVA Jr. O.C.; SILVA R.L.; MELO G.B.; MELO V.A.; LIMA S.O.; ANTONIOLLI A.R.; BAGNATO V.S. Proliferative effect of medicinal plants and laser on liver regeneration. A considerable experimental model: from an experimental model to clinical applications. Acta Cir. Bras., v. 18, n. 5; p. 6-8, 2003;

SILVA R.L.; MELO G.B.; ANTONIOLLI A.R.; LIMA S. O.; *et al* . Effect of aqueous extract of *Hyptis pectinata* on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. Acta Cir. Bras., v. 17, n. 3, p. 101-105, 2002;

SILVA R.L.; MELO G.B.; ANTONIOLLI A.R.; MICHELLONI P.R.; ZUCOLOTO S.; PICINATO M.A.; FRANCO C.F.; MOTA G. A.; SILVA O.C. Effect of aqueous extract of *Sida cordifolia* on liver regeneration after partial hepatectomy. Acta Cir. Bras., v. 21, suppl. 1, p. 37-39, 2006;

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G. Farmacognosia. Da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. Universal; Florianópolis: Ed. da UFSC, p. 301-330, 2002;

SKULLMAN S, WIRÉN M, GARLICK PJ, MCNURLAN A, LARSSON J. Protein Synthesis in regenerating rat liver during Malnutrition. J Hepatology, v. 21, p. 174-181, 1994;

SMELTZER S.C.; BARE B.G. Brunner/Suddarth: tratado de enfermagem médico-cirúrgica. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 56, p. 1395-1440: Tratamento de pacientes com distúrbios neurológicos. 1994;

SOARES FILHO P.J.; CARVALHO,A.C.G.; GUSMAN-SILVA,M.A. O da unidade fundamental dos hepatócitos: uma ferramenta para diagnóstico e pesquisa. C. Bras. Rad. Med. Lab., v. 48, n. 3, Rio de janeiro, 2012;

SOTO C.; CABELLERO E.; PÉREZ E.; ZÚÑIGA M.E. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. Food and Bioproducts Processing, v. 92, p. 328-333, 2014;

SOUZA MARI A N.C.V.; TANGERINA M.M.P.; SIVA V.C.; VILEGAS W.; SANNOMIYA M. Abortive medicinal plants used by women of Basic Health Units: ethnopharmacology and cromatographic analysis by TLC and HPLC. Rev. bras. plantas med. , v. 5, n. 4, supl. 1, 2013;

SOUZA T.J.T.; APEL M.A.; BORDIGNON S.; MATZENBACHER N.I.; ZUANAZZI J.A.S.; HENRIQUES A.T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Rev Bras Farmacogn, v. 17, p. 368-372, 2007;

SPAGNUOLO R.S.; BALDO R.C.S. Plantas medicinais e seu uso caseiro: conhecimento popular. Ciência Biológica e da Saúde, v. 11, n. 1, p. 31-34, 2009;

SPEISKY R.; CASSELS B.K. Boldo and boldine: an emerging case of natural dug development, Pharmacol. Res., v. 29, p. 1-12, 1994;

STASSEN N.; BHULLAR I.; CHENG J. *et al.* Nonoperative management of blunt hepatic injury: An Eastern Association for the Surgery of Trauma practice management guideline J Trauma Acute Care Surg., v. 73, n. 5, 2012;

STRANG W. R. Vander's human physiology. The mechanisms of body function. Mac Grow Hill, 10th edition;

STALHSCHMIDT C. M. M.; FORMIGHIERI B.; MARCON D. M.; TAKEJIMA A. L.; SOARES G. S. Hepatic trauma: five years of epidemiology in an emergency department Rev. Col. Bras. Cir., v. 35, n. 4, 2008;

STRASBERG S.M.; PHILLIPS C. Use and dissemination of the Brisbane 2000 nomenclature of liver anatomy and resections. Ann. Surg., v. 257, n. 3, p. 377-2013;

TANG T.X.; HASHIMOTO T.; CHAO L.Y.; *et al.* Effect of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats. J. Surg. Res., v. 72, n. 1, p. 8-14, 1977;

TARLÁ M.R.; RAMALHO F.; RAMALHO L.N.Z.; CASTRO e SILVA T.; BRANDÃO D.F.; *et al.* Cellular aspects of liver regeneration. Acta Cir. Bras., v. 21(suppl. 1), p. 63-66, 2006;

TAUFICK M.L.C.; EVANGELISTA L.A.; SILVA M.; OLIVEIRA L.C.M. Alcohol consumption patterns among patients in primary health care detection by health professionals. Cad. Saúde Pública, v. 30, n. 2, p. 427-432, 2014;

TEEB. A quick guide: the economics of ecosystems and biodiversity for local and regional policy. Earthscan, London, 2010;

TINKOFF G.; ESPOSITO T.J.; REED J.; KILGO P.; FILDES J.; PASQUALE M.; MEREDITH J.W. American Association for the Surgery of Trauma Organ Injury Scale I: spleen, liver, and kidney, validation based on the National Trauma Data Bank J Am Coll Surg. , v. 207, n. 5, 2008;

TODERKE E.L.; BARETTA G.A.P.; GAMA FILHO O.P.; MATIAS J.E.F. Sirolimus influence on hepatectomy-induced liver regeneration in rats Rev. Col. Bras. Cir. , v. 41, n. 3, p. 203-207, 2014;

TORRES E.R.; ORTEGÓN E.J.; SANDOVAL I.R. Conocimiento del personal y recomendación de plantas medicinales. Ciência & Salud, v. 1; n. 4, 2013;

TORRES O.J.M.; ARRAES L.R.G., FERREIRA E.D.Z.; COUTINHO I.H.I.L.S.; DOMINICI A.J. Hepatectomia central. ABCD Arq. Bras. Cir. Dig., v. 18, n.1, p. 30-32, 2005;

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. Corpo humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia. 6ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2008;

TUROLLA M.S.R.; NASCIMENTO E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Ver. Bras. de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 254-258, 2009;

TRIVIÑO, T. Anatomia cirúrgica do fígado. Acta Cir. Bras., v. 18, n. 5, set.-out. 2005.

UBEDA A.; MONTESINOS C.; PAYÁ M.; ALCARAZ M.J. Iron-reducing and free-radicalscavenging properties of apomorphine and some related benzyllisoquinolines. Free Radical Biological Medical, v. 15, p. 159-167, 1993;

van den BROEK MA, OLDE DAMINK SW, DEJONG CH, LANG H, MALAGÓ M, JALAN R, SANER FH. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. Liver Int, v. 28, n. 6, p. 767-780, 2008;

VELDHUYZEN VAN ZANTEN S.J.; DEPLA A.C.; DEKKER P.C. The clinical importance of routine measurement of liver enzymes, total protein and albumin in a general medicine outpatient clinic: a prospective study. Neth. J. Med., V. 40; N. 53, 1992;

VIDHYA, A.; INDIRA, M. Protective effect of Quercetin in the Regression of Ethanol-Induces Hepatotoxicity. Indian J Pharm Sci., v. 7, n. 5, p. 527-532, 2009;

VILA R.; VALENZUELA L.; BELLI H.; CAÑIGUERAL S.; MONTES M.; ADZET T. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Peumus boldus* Leaves, *Planta Medica*, n. 65, p. 178-179, 1999;

VILLIGER A.; SALA F.; SUTER A.; BUTTERWECK V. *In vitro* inhibitory potential of *Cynara scolymus*, *Silybum marianum*, *Taraxacum officinale*, and *Peumus boldus* on key enzymes relevant to metabolic syndrome. *Phytomedicine*, n. 22, p. 138–144, 2015;

WEI W.; DIRSCH O.; MCLEAN A.L.; ZAFARNIA S.; SCHWIER M.; DAHMEN U. Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration. *Eur Surg Res.* v. 54, n. 3-4, p. 97-113, 2015;

YAMAGUCHI T.; MINOR T.; ISSELHARD W *et al.* Effect of Glutamine or Glucagon-Insulin Enriched Total Parenteral Nutrition on Liver and gut in 70 % Hepatectomized Rats. *J Am Coll Surg*, v. 185, p. 156-162, 1997;

YANG J.D.; HARMSSEN W.S.; SLETTEDAHL S.W.; CHAITEERAKIJ R.; ENDERS F.T.; THERNEAU T.M.; ORSINI L.; KIM W.R.; ROBERTS L.R. Factors that affect risk for hepatocellular carcinoma and effects of surveillance. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* , v. 9, n. 7; p. 617, 2011;

YANGER K.; ZONG Y.; MAGGS L.R. *et al.* Robust cellular reprogramming occurs spontaneously liver regeneration. *Genes Dev.*, v. 27, n. 7, p. 719-72, April, 2013;

YOUN Y.C.; KNOW O.S.; HAN E.S.; SONG J.H.; SHIN Y.K.; LEE C.S. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 63, p. 495-505, 2002;

YUJI ISHII, RYOTA SAITO, HIDEKI MARUSHIMA, RYUSUKE ITO, TARO SAKAMOTO, KATSUSUHIKO YANAGA. Hepatic reconstruction from porcine

liver cells using a radial flow bioreactor World journal of gastroenterology, v. 14, n. 17, p.2740-2747, 2008.

ZAGO T.M.; PEREIRA B.M.; CALDERAN T.R.A.; HIRANO E.S.; RIZOLI S.; FRAGA G.P. BLUNT hepatic trauma:comparison between surgical and nonoperative treatment Rev. Col. Bras. Cir., v. 39; n. 4, 2012;

ZHANG W.J.; LIU W.; CUI L.; CAO Y. Tissue engineering of blood vessel J Cell Mol Med. v. 11, n. 5, p. 945-57, 2007;

ZIMMERMAN H.J.; WEST M. Serum enzyme levels in the diagnosis of hepatic disease. Am J Gastroenterol, v. 40, n. 387, 1963;

YANG J.D.; HARMSSEN W.S.; SLETTEDAHN S.W.; CHAITEERAKIJ R.; ENDERS F.T.; THERNEAU T.M.; ORSINI L.; KIM W.R.; ROBERTS L.R. Factors that affect risk for hepatocellular carcinoma and effects of surveillance. Clin. Gastroenterol. Hepatol. , v. 9, n. 7; p. 617, 2011;

10 ARTIGO SUBMETIDO

The effect of the water extract of *Peumus boldus* on hepatocytes proliferation and liver function in rats subjected to extended hepatectomy

O efeito do extrato aquoso de *Peumus boldus* sobre a proliferação dos hepatócitos e função do fígado em ratos submetidos a hepatectomia alargada

Maria Bernadete Galrão de Almeida Figueiredo^I, Maria Júlia Nardeli^{II}, Ana Galrão Figueiredo^{III}, Ricardo Luiz de Albuquerque Junior^{IV}, Juliana Cordeiro Cardoso^{IV}, Sônia Oliveira Lima^{IV}

^IFellow Master degree, Department of Morfology and Structural Biology (LMBA), Postgraduate Program in Health and Environment, Tiradentes University, Sergipe, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript writing, critical revision.

^{II}MD, Postgraduate student, Department of Veterinary, Tiradentes University, Sergipe, Brazil. Responsible for animal analysis, critical revision

^{III} Medical Student, Medical School, Tiradentes University, Aracaju, SE, Brazil.

^{IV} PhD, Full Professor, LMBE, ITP, Tiradentes University, Sergipe, Brazil. Conception and outlining of the study, responsible for intellectual and scientific contents of the article, acquisition and interpretation of data, manuscript writing, statistical analysis, responsible for English language.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the effect of aqueous extract of *Peumus boldus* on hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats.

METHODS: Twenty rats were divided in two groups: vehicle and AEPB 100 (Whose rats received aqueous extract of *Peumus boldus* 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 70% of liver. Twenty four hours later, they were sacrificed, and the remaining mass of liver was removed and prepared to be studied through the Ki67 immunohistochemical technique.

RESULTS: the proliferative index, expressed by the percentage mean of Ki67-positive cells in the remaining hepatic samples, was significantly higher in the group treated with AEPB at 100 mg/Kg than in the one treated with vehicle only ($p < 0.0001$).

CONCLUSION: These results show that the administration of aqueous extract of *Peumus boldus* using the dose of 100mg/kg/day increased the hepatocyte proliferation in the group AEPB 100.

Key words: Plants, Medicinal. Hepatectomy. Proliferating Cell Nuclear Antigen. Liver Regeneration.

Introduction

The liver parenchyma is quiescent and only a small percentage of cells is in the cell cycle division at any time. But after chemical, viral and traumatic injury, hepatocytes are able to undergo a proliferative response in order to restore the lost parenchyma¹. Liver proliferation is a compensatory hyperplasia process, which is driven more by functional than anatomical need².

Operation on the liver is challenging because of its vital functions. Despite technical advances and high experience of liver resection of specialized centers, there are still relatively high rates of postoperative morbidity and mortality associated with post-hepatectomy complications, including fever, hemorrhage, bile leakage, liver failure, pleural effusion, and subphrenic infection³. Therefore, depending on the severity of the hepatic injury and consequent hepatectomy, the time-course of liver restoration may be too long, which may lead to long-term hepatic deficiency^{4,5}.

Many substances have been tried in partially hepatectomized animals to improve liver regenerative process in rodent model⁵ and herbal products appear as important alternatives in this search^{6,7,8}. Although Brazil has a rich botanic variety and traditionally uses medicinal plants, including *Peumus boldus*, most of the time it is based only on the popular knowledge, with no pre-clinical or clinical evidence⁹.

Peumus boldus, popularly known as boldo, is found in official pharmacopoeia of Brazil, Chile, Germany, Spain, Portugal and Switzerland as a reference in treatment of liver diseases. Boldo is popularly used in cases of hepatitis, hepatic colic, biliary lithiasis and intestinal disorders, and rheumatism, poor digestion, asthenia, dyspepsia, inappetence and other disorders¹⁰. Studies have demonstrated that polar extracts of *Peumus boldus* are able to display antioxidant activity¹¹ and reduce hepatic lipoperoxidation induced by cisplatin^{12,13,14}.

Extracts of *Peumus boldus* obtained with polar solvents, like water, are rich in flavonoids, such as quercetin, kaempferol and isorhamnetin derivatives, as well as in alkaloids, such as boldine¹⁵. Boldine has proved to attenuate cholestasis associated with nonalcoholic fatty liver disease in high-sucrose diet-induced hereditary hypertriglyceridemia¹⁶ and enhance bile production via osmotic and farnesoid X receptor dependent mechanisms¹⁷ in rodent model. In addition, quercetin is able to regulate hepatic cholesterol metabolism mainly through the pathways that promote cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux¹⁸ and reduce galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity.

As boldo and its chemical compounds have previously demonstrated beneficial properties on the of *Peumus boldus* leaves on the liver proliferative response after hepatectomy in rodents hepatic disorders, the purpose of the current study is to assess the effect of aqueous extract.

Material and methods

Ethical aspects. Ethical principles of the COBEA (Brazilian College for Animal Experimentation) for experiments in animals were applied in this study, which was approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation (approval 021114).

Extract preparation. Leaves of *Peumus boldus* (Farmácia Viva, Parque da Sementeira, Aracaju/SE, Brazil) were dried, weighed and grounded in electric mill until a fine-grained powder was obtained. *Peumus boldus* sample (20 g) was extracted using distilled water (200 mL) under constant stirring for 4 hours at 35°C. After extraction, the mixture was filtered, lyophilised and stored at 5°C (Figure 11). The dry extract was suspended in distilled water at 100 mg/mL for oral administration by gavage to the animals.

Biological assay. Twenty *Novergicus albinus* male rats, Wistar lineage, weighing 30±5 g were randomly assigned into two experimental groups as described in Table 1. Animals were housed in plastic cages with wood-shavings bedding, which was replaced daily, under controlled temperature at 22±2°C and a 12-hr light/dark regimen, with water and food (Labina; Purina, Sao Paulo, Brazil) *ad libitum*. The animals were subjected to dissociative anesthesia with intraperitoneal administration of 0.10 mL/100 g of 10% ketamine (Ketamine[®], Rhobifarma Ind. Ltd. Pharmaceutical.) and 0.25 mL/100 mg of xylazine (Anasedan[®] Purina Agribrands of Brazil Ltda.). After trichotomy and antisepsis with PvPi, the access to the peritoneal cavity of the animals was performed by median laparotomy, approximately 4 cm from the xiphoid appendix in caudal direction. The median and left lateral lobes of the liver (corresponding to 70% of the organ) were excised after clamping and ligating the narrow pedicle with a 3-0 cotton suture (LIMA *et al.*, 2012). After surgery, the rats were on a normal diet for the whole experimental period. Twenty four hours later, animals underwent a new operation to remove the

remaining liver. The abdomen was closed in two planes with continuous sutures 4-0 mononylon, the peritoneum and aponeurosis in deep planes and skin on a superficial plane. Surgical procedures were always performed at the same time, to avoid the influence of variations of the circadian cycle.

Table 1. Distribution of the animals to the two groups according to the experimental procedures.

Groups (n=5)	Gavage procedures	Volume
Vehicle	Distilled water	2 mL
AEPB 100	AEPB at 100 mg/kg	2 mL

Biochemical analysis. Before the second laparotomy, blood samples (2 mL) were collected from the inferior vena cava of all rats for serologic testing of hepatic functional status. The blood samples were centrifuged at 1000 rpm for 10 min and serum was separated and analyzed by the biochromatic Kinetics technique, using the kit trademark Labtest Diagnostica SA (Belo Horizonte, MG, Brazil) in automatic device model (Dimension AR Date of Behring®). The serum parameters analyzed in this study were: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutanil transpetidase (GGT), total bilirubin (TB), direct bilirubin (BD), indirect bilirubin (BI), and albumin (ALB).

Histological analysis. Tissue specimens were fixed in buffered formaldehyde (10%, pH 7.4) for 48 h, decalcified in 5% nitric acid for 72 h, dehydrated in increasing ethyl alcohol solutions, and diaphanized in xylol for inclusion in paraffin. Subsequently, ten histological sections (5 µm thick) were obtained and stained in hematoxylin-eosin for analysis using a light microscope (Olympus CX31 optic microscope) by two trained observers. The morphological parameters suggestive of hepatic functional stress

analyzed in this study were: hydropic degeneration, steatosis, portal inflammation, parenchymatous inflammation and necrosis. The intensity of the morphological changes was assessed as follows: 0 (lack of morphological change); 1 (morphological changes affecting less than 10% of the hepatocytes); 2 (morphological changes affecting between 10% and 50% of the hepatocytes); and 3 (morphological changes affecting more than 50% of the hepatocytes).

Liver regeneration analysis. Liver regeneration was evaluated by immunohistochemical staining for Ki67 antigen using monoclonal primary anti-Ki67 antibody (MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark, 1:50) on 5 µm-thick histological sections obtained from the formalin-fixed and paraffin-embedded liver tissues. Sections were mounted on poly-L-lysine-coated glass slides, deparaffinized, rehydrated in an increasing alcohol series, placed in phosphatebuffered saline (PBS), and treated with 2% hydrogen peroxide in methanol for 15 min to block endogenous peroxidase activity. Subsequently, monoclonal primary antibody was incubated for 120 min at 25°C. The sections were then incubated for 35 min with a biotinylated horse antimouse 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 Ki67 (positive nuclei/total number of counted nuclei) were determined by evaluation of at least 1000 hepatocyte nuclei.

Statistical analysis. All data were first subjected to analysis of gaussian distribution. Statistically significant differences between mean values presenting Gaussian distribution were analyzed using paired and unpaired T Student's test. Non-gaussian data

were analyzed using Mann-Whitney's test. Differences between means were considered significant when $p < 0.005$.

Results

In this study, no significant difference was observed in the body weight of the animals in response to the treatment with 100 mg/Kg AEPB in comparison with the administration of distilled water (vehicle) (Table 2, $p > 0.05$).

Table 2: Body weight of the animals subjected to 70% hepatectomy treated with vehicle and aqueous extract of *Peumus boldus* at 100 mg/Kg.

Experimental conditions	Body weight (g)		Two-tailed P values ^b
	Vehicle	AEPB 100 mg/Kg	
Pre surgery	258.2±38.3	271.1±16.9	0.35
Post-surgery	236.7±33.7	259.0±17.7	0.08
Two-tailed P values ^a	< 000.1	< 0.0001	

^a Paired T Student's test; ^b Unpaired T Student's test

In both experimental groups (vehicle and AEPB 100), a significant increase in the weight of the remaining livers was observed after 24 h (Table 3, $p < 0.0001$). However, the hepatic regeneration index observed in the group treated with vehicle only was statistically comparable to that treated with AEPB 100 ($p = 0.84$).

Table 3: Liver weight of the animals subjected to 70% hepatectomy treated with vehicle and aqueous extract of *Peumus boldus* at 100 mg/Kg.

Experimental conditions	Liver weight (g)		Two-tailed P values ^b
	Vehicle	AEPB 100 mg/Kg	
30% remaining liver	2.5±0.3	2.6±0.1	0.44
Remaining liver after 24 h	4.1±0.4	4.2±0.3	0.49
Two-tailed P values ^a	< 0.0001	< 0.0001	
Regenerative index (%)	39.4±9.4	38.7±4.1	0.84

^a Paired T Student's test; ^b Unpaired T Student's test

The analysis of the livers of the animals at the first surgery revealed Gross features represented by smooth parenchyma, crumbly and dark reddish brown color, typical of the body with great blood supply, which were compatible with normality. However, over the course of the second surgery, the parenchyma of the remaining livers presented a yellowish appearance, consistent with fatty degeneration, likely as a result of surgical aggression by extended hepatectomy (Figure 1).

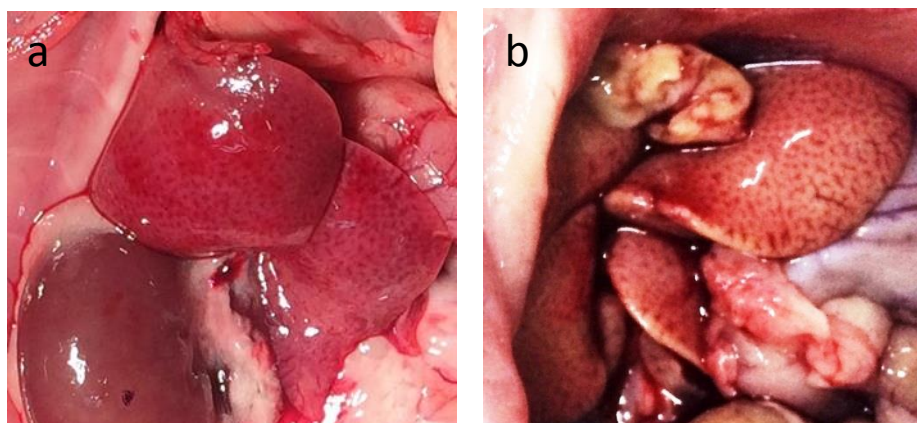


Figure 1. Gross features of the livers a) in the first surgical time and b) during the second surgical time (after extended hepatectomy). No substantial difference in the hepatic gross features was observed between the experimental groups, either in the first or in the second surgical times.

As shown in Table 4, no significant differences in the serum levels of cholesterol, glucose, triglycerides, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline

phosphatase, as well as in total, direct and indirect bilirubin, were observed between the groups treated with vehicle only and with AEPB at 100 mg/Kg.

Table 4. Biochemical analysis of serum parameters of the animals subjected to 70% hepatectomy treated with vehicle and aqueous extract of *Peumus boldus* at 100 mg/Kg.

Serum parameters	Vehicle		AEPB 100		P values ^a
	Mean	SD	Mean	SD	
Glucose (mg/dL)	114.56	35.68	134.13	24.66	0.486
Total bilirubin (mg/dL)	0.16	0.03	0.18	0.09	0.213
Direct bilirrubina (mg/dL)	0.11	0.03	0.13	0.07	0.175
Indirect bilirrubina (mg/dL)	0.05	0.03	0.06	0.04	0.533
Triglycerides (mg/dL)	25.89	15.21	46.63	63.13	0.584
Cholesterol (mg/dL)	46.33	11.83	52.38	14.59	0.588
Alkaline phosphatase (U/L)	403.44	108.54	488.75	162.15	0.169
aspartate aminotransferase (U/L)	463.22	232.64	530.50	254.44	0.114
alanine aminotransferase (U/L)	444.89	163.10	525.38	213.61	0.383

^a Unpaired T Student's test.

After enlarged partial hepatectomy in rats treated with EAPB at 100 mg/Kg, the mean scores of the pathological changes, concerning the hepatic histological architecture and cell morphology, suggestive of functional stress were found in both groups (Table 5). The cytoplasmic non-lipid vacuolation of the hepatocytes interpreted as hydropic degeneration was characterized by progressive loss of eosinophilia and displacement of cytoplasmic granules to the periphery, discrete cell ballooning and sometimes nuclear pyknosis (Figure 3A). No significant difference in the mean scores of hepatocyte ballooning consistent with hydropic degeneration between the groups ($p = 0.792$). The lipid vacuolation, or macrovesicular steatosis, was characterized by intense pyknosis and nuclear eccentricity associated with intracytoplasmic vesicle formation, and round-shaping of the hepatocytes (Figure 3B). The mean scores of lipid vacuolation (steatosis) were significantly lower in the group treated with EAPB at 100 mg/Kg than in the group

treated with vehicle only ($p = 0.02$). The periportal inflammatory reaction (Figure 3C) ranges from absent to moderate and was represented by occasional lymphocytes and polymorphonuclear neutrophils, whereas the intraparenchymatous inflammation (Figure 3D) was predominantly mild; however, no significant difference between groups ($p = 0.195$ and $p = 0.495$, respectively). The apoptotic bodies, represented by homogeneous and eosinophilic globular structures, sometimes containing pyknotic nuclear remains inside (Figure 3E), were uncommon in both groups, and no significant difference was observed between them ($p = 0.906$). In general, areas of necrosis were focal and mostly affected small cell groups and usually promoted discrete local inflammatory infiltration (Figure 3F). Although no significant difference was observed between groups in the mean scores of necrosis, 20% of the animals belonging to the vehicle group presented approximately half of the remaining hepatic parenchyma affected by necrosis, whereas such extensive damage associated to necrotic areas were not found in the group treated with AEPB at 100 mg/Kg.

Table 5. Mean scores of liver pathological changes intensity in the experimental groups.

Pathological parameters	Vehicle		AEPB 100		P values ^a
	Mean $\pm$ SD	Median (min – max)	Mean $\pm$ SD	Mediana (max – min)	
Hydropic vacuolation	2.8 $\pm$ 0.41	3 (2 – 3)	2.86 $\pm$ 0.35	3 (2 – 3)	0.792
Steatosis	1.3 $\pm$ 0.67	1 (0 – 2)	0.56 $\pm$ 0.63	0 (0 – 2)	0.020
Portal inflammation	1.4 $\pm$ 0.51	1 (1 – 2)	1.00 $\pm$ 0.53	1 (0 – 2)	0.145
Parenchymatous inflammation	0.3 $\pm$ 0.48	0 (0 – 1)	0.53 $\pm$ 0.51	1 (0 – 1)	0.495
Necrosis	1.1 $\pm$ 1.10	1 (0 – 3)	0.46 $\pm$ 0.51	0 (0 – 1)	0.175
Apoptosis	0.9 $\pm$ 0.31	1 (0 – 1)	0.86 $\pm$ 0.35	1 (0 – 1)	0.906

^a Mann-Whitney's test

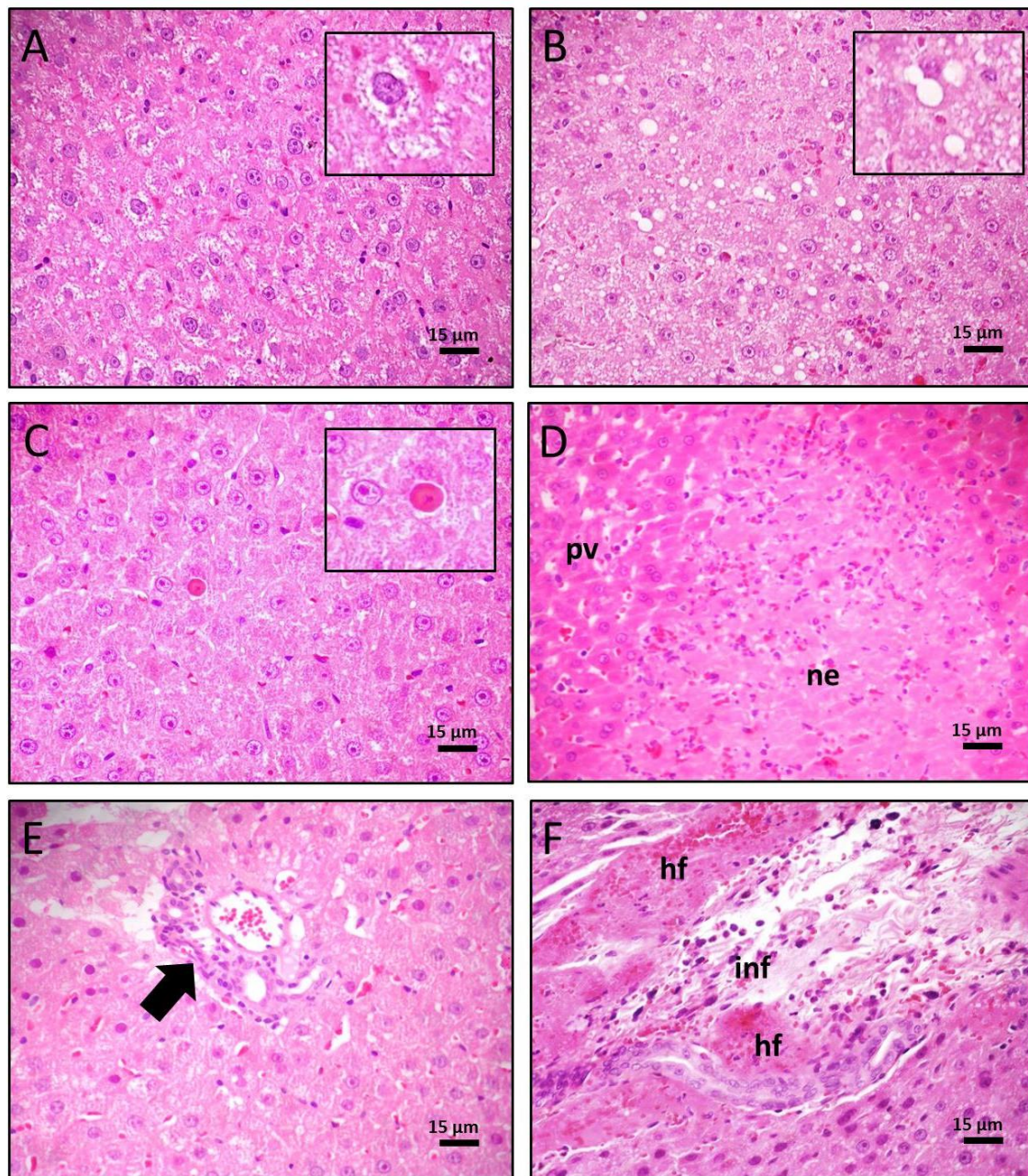
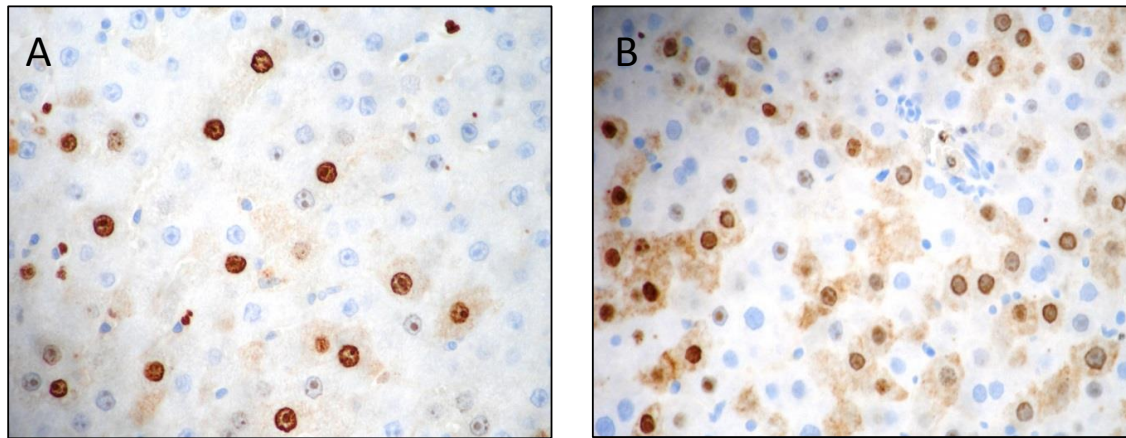


Figure 2. Histological sections stained with hematoxylin/eosin (HE) showing the main pathological changes of the hepatic parenchyma and stroma observed in the experimental groups. (A) non-lipid vacuolation compatible with hydropic degeneration in the group treated with AEPB and (B) lipid vacuolization consistent with macrovesicular steatosis in an animal treated vehicle only. (C) Apoptotic body and (d) necrosis area (ne) surrounded by viable parenchyma (pv) in s liver sample of animal treated AEPB and vehicle only, respectively. (E) Focal parenchymal inflammatory infiltrate (arrow) and (F) diffuse portal inflammation (inf) associated with focal hemorrhage areas (hf) in hepatic samples of animal treated with vehicle only.

In this study, immunoexpression of Ki67 antigen was observed mainly in the nuclei of hepatocytes, although mild to moderate cytoplasmic staining was also observed in some samples, irrespective to the treatment used (Figure 3). As described in Figure 4,

the proliferative index, expressed by the percentage mean of Ki67-positive cells in the remaining hepatic samples, was significantly higher in the group treated



with AEPB at 100 mg/Kg than in the one treated with vehicle only ($p < 0.0001$).

Figure 4. Histological section of mouse liver tissue after 70% hepatectomy. A) Nuclear immunopositivity for the Ki-67 antigen in the group treated with vehicle only (distilled water). B) Intense and diffuse nuclear/cytoplasmic immunoexpression of Ki-67 antigen in the group treated with AEPB at 100 mg/Kg (SABC, 400 x)..

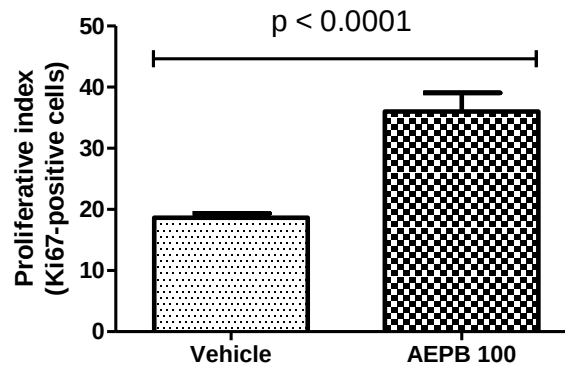


Figure 4. Proliferative index of the remaining hepatic samples after 24 h of enlarged hepatectomy (70%) in the experimental groups (T Student's test).

Discussion

The restoration of the liver weight after partial hepatectomy in humans appears to occur in two to three weeks and completes after three months¹⁹. Due to limitations in using human liver for studies on hepatic regeneration, most of the information on this process has been obtained from *in vivo* animal models (e.g. rats and mice) or with hepatic cells in culture (*in vitro*)²⁰. Hepatic proliferative process in rats is similar to the proliferation of human liver, which explains its widespread use in many areas of biomedical research, such as endocrine, cellular, genetic and molecular²¹. We used rats in this research due to the low cost of acquisition and maintenance of the animals and because of their high resistance to infection and surgical trauma. We picked young animals as their age may compromise the partial post-hepatectomy regenerative response, and only male rats were used in attempt to mitigate the recognized influence of estrogen on the hepatic proliferation^{22,23}.

In this study, the use leaves-derived aqueous extract of *Peumus boldus* was based on its phytochemical composition and biological effects. Studies have demonstrated the presence of more than 30 different compounds in *Peumus boldus* leaves. However, the therapeutic benefits of this plant are associated with benzoquinoline alkaloids like boldine, isocordine, secoboldine and N-methylaurotetanine; flavonoids, particularly catechins and quercetin; and essential oils found in its leaves and husk²⁴. Boldine is the principal alkaloid found in the leaves of boldo²⁵. Its pharmacological activities, resulting from the antioxidant activity have been well described in the literature científica^{25,26,27,28}.

Previous studies have failed to demonstrate choleretic activity after oral administration of 200–800 mg/kg of aqueous ethanolic boldo extract, or after intravenous

administration of either ethanolic extract (Lanthers et al., 1991), On the other hand, lower doses of the same extract, ranging from 20 to 40 mg/Kg, have demonstrated to ameliorate toxicity generated by cisplatin in liver tissue *in vivo* ²⁹. In this study, the damage induced in the liver of rats by hepatectomy was extensive and, due to the little amount of references regarding the use of these extracts in experimental models of hepatic diseases, we decided to try a bit higher dose than the ones described by Mondal et al (2014)³⁰, but lower than those used by Lanthers et al. (1991), which have failed in previously reported experiments.

Hepatocytes are the main target of studies on liver regeneration, once these cell subsets comprise 90% of the hepatic weight and approximately 60% of the total number of cells of the liver². Therefore, in order to evaluate the proliferative activity of hepatocytes we assessed the immunoexpression of Ki67 nuclear antigen, a protein associated with the cell cycle and essential for DNA synthesis.

In this study, the proliferative index of hepatocytes, assessed by the immunoexpression of Ki67 positive cells, was significantly increased in the AEPB-treated group, suggesting a possible trophic effect of the extract on the damaged liver tissue. Several factors can influence the replication of hepatocytes, with direct or indirect effects on DNA synthesis, which are called mitogenic and co-mitogenic factors, respectively^{27,28,29}. As in this study, leaves-derived extracts of *Peumus boldus* induced hepatocytes proliferation, it is possible to suggest that this natural product display trophic effects on liver tissue. The precise mechanism underlying the proliferative effect displayed by AEPB is still unclear, but it is possible to suppose a possible relation with the well-established antioxidant properties of the bioactive compounds present in the extract, such as alkaloids and flavonoids^{10,11,15,31,32}. However, although we provide

evidence of a possible hepatotrophic effect of AEPB, further investigations are still required in order to clarify the biochemical mechanism responsible for such biological activity.

Surprisingly, we found no significant difference in the remaining liver weights after oral administration of AEPB at 100 mg/Kg in comparison with distilled water administration (vehicle). This apparent paradox might be related to the short time-course of the experiment (24 h only). Thus, although the number of hepatocytes in the cell cycle (Ki67 positive cells) was clearly increased by the administration of the AEPB, the proliferation of the liver tissue after 24 h was likely not expressive enough to reflect a massive gain of weight. Biochemical data obtained in this study appear to support this theory, since no difference between groups was observed. Therefore, further studies are necessary to evaluate the effect of such increased proliferative index of the hepatocytes on the liver weight, gross features, histological architecture and biochemical function in longer-term experimental designs.

Conclusion

We provide evidence that oral administration of leaves-derived aqueous extract of *Peumus boldus* at 100 mg/Kg displays hepatotrophic effects after 70% hepatectomy in rats.

References

- 1- Toderke EL, Baretta GAP, Gama Filho OP, Matias JEF. Sirolimus influence on hepatectomy-induced liver regeneration in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2014;41(3):203-207.
- 2-Aguiar LRF. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos a hipertensão portal pós-hepática. *ABCD Arq Bras Cir Dig Artigo Original* 2011;24(2): 144-151.
- 3- Jin S1, Fu Q, Wuyun G, Wuyun T. Management of post-hepatectomy complications. *World J Gastroenterol.* 2013 Nov 28;19(44):7983-91. doi: 10.3748/wjg.v19.i44.7983.
- 4-van den Broek MA, Olde Damink SW, Dejong CH, Lang H, Malagó M, Jalan R, Saner FH. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int.* 2008 Jul;28(6):767-80. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01777.x
- 5-Wei W, Dirsch O, Mclean AL, Zafarnia S, Schwier M, Dahmen U. Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration. *Eur Surg Res.* 2015;54(3-4):97-113. doi: 10.1159/000368573.
- 6-Keskin N, Mammadov R, Ili P. The effects of *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz extract on biochemical indices and apoptosis in partially hepatectomized liver in rats. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012 Aug;12(3):177-81.
- 7-Lima SO, Viana Lda C, Santana FR, Zucoloto S, Albuquerque Junior RL, Gomes MZ. Proliferative effect of aqueous extract of *Hyptis fruticosa* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras.* 2012 Jan;27(1):71-5.
- 8-Yang JY, Wang JS, Liu HB. Fructus polygoni orientalis extract inhibited liver regeneration and proliferation of bone marrow cells of rat after partial hepatectomy. *Genet Mol Res.* 2015 Jul 13;14(3):7671-9. doi: 10.4238/2015.July.13.12.
- 9-Mazutti M, Mossi AJ, Cansian RL, Corazza ML, Dariva C, Oliveira JV. Chemical profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus* Molina) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. *Braz J Chem Engin* 2008; 25(2), 427-434.
- 10-Ruiz ALT, Taffarello D, Souza VHS, Carvalho JE *et al.* Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Rev Bras Farmacog.* 2008;18(2), 295-300.
- 11-Klimaczewisk CV, Saraiva RA, Roos DH, Bolingo NA, Athayde ML, Kamdem J, Barbosa NV, Rocha JBT. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria *in vitro*. *Industrial Crops and Products.* 2014;54, 240–247.
- 12-Fernández J, Lagos P, Rivera P, Zamorano-Ponce E. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phyther Res.* 2009 Jul;23(7):1024-7. doi: 10.1002/ptr.2746.

13-Mondal J, Bishayee K1, Panigrahi AK2, Khuda-Bukhsh AR3. Low doses of ethanolic extract of Boldo (*Peumus boldus*) can ameliorate toxicity generated by cisplatin in normal liver cells of mice in vivo and in WRL-68 cells in vitro, but not in cancer cells in vivo or in vitro. *J Integr Med.* 2014 Sep;12(5):425-38. doi: 10.1016/S2095-4964(14)60045-5.

14-Lanthers MC, Joyeux M, Soulimani R, Fleurentin J, Sayag M, Mortier F, Younos C, Pelt JM. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Med.* 1991 Apr;57(2):110-5.

15-Simiriotis MJ, Schmeda-Hirschmann G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010 Jan 22;1217(4):443-9. doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.014. Epub 2009 Dec 4.

16-Zagorova M, Prasnicka A, Kadova Z, Dolezelova E, Kazdova L, Cermanova J, Rozkydalova L, Hroch M, Mokry J, Micuda S. Boldine attenuates cholestasis associated with nonalcoholic fatty liver disease in hereditary hypertriglyceridemic rats fed by high-sucrose diet. *Physiol Res.* 2015;64 Suppl 4:S467-76.

17- Cermnova J, Kadova Z, Zagorova M, Hroch M, Tomsik P, Nachtigal P, Kudlackova Z. Boldine enhances bile production in rats *via* osmotic and Farnesoid X receptor dependent mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2015;285(1):12-22.

18- Zhang M, Xie Z, Gao W, Pu L, Wei J, Guo C. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. *Nutr Res.* 2016 Mar;36(3):271-9. doi: 10.1016/j.nutres.2015.11.019. Epub 2015 Nov 27.

19. Kemelo MK, Horinek A, Canová NK, Farghali H. Comparative effects of Quercetin and SRT1720 against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in rats: biochemical and molecular biological investigations. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2016; 20: 363-371.

20-Khan AZ, Mudan SS. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. *ANZ J Surg.* 2007; (77): 9-14.

21-Koniaris LG, Mckillop I, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 2003; 197(4): 634-48.

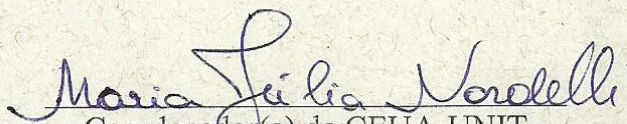
22-Rosal MA, Gonçalves WJ, Alves MTS, Baracat EC, Lima GR. Análise histopatológica e imuno-histoquímica (Antígeno nuclear de proliferação celular) de pacientes com carcinoma cervical incisivos antes e após cirurgia. *RevAssocMed Bras.* 2002; 48(1): 32-5.

- 23-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.
- 24-Schemeda-Hirschmann G; Rodriguez JA; Theoduloz C; Astudillo SL; Feresin GE; Tapia A Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ('Boldo'), *Free Radic.Res.* 2003; (37): 447-452.
- 25-O'Brien P; Carrasco-Poso C; Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-biological interactions*. 2006; (159): 117.
- 26-Fernandez J; Lagos P; Rivera P. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytotherapy Research*. 2009; 23 (7): 1024-1027.
- 27-Bittner N; Aguilera M; Hernández V; Arbert C; Becerra J; Casnueva E. Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol Chilean Journal of Agricultural Research. 2009; (69): 30-37.
- 28-Falé PL; Amaral F; Amorin MPJ.; Souza SM; Florêncio MH; Farzão FN; Serralheiro ML. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and acaco-2 cell lines *Food and Chemical Toxicology*. 2012; (50): 2656-2662.
- 29- Lau YS; Tian XY; Achike FI; Murugan D; Mustafa MR; Liu J; Zhang Y; Lau CW; Huang Y. Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. *British Journal of Pharmacology*. 2013; 170 (6): 1190-1198.
- 30-Mondal J1, Bishayee K1, Panigrahi AK2, Khuda-Bukhsh AR3. Low doses of ethanolic extract of Boldo (*Peumus boldus*) can ameliorate toxicity generated by cisplatin in normal liver cells of mice *in vivo* and in WRL-68 cells *in vitro*, but not in cancer cells *in vivo* or *in vitro*. *J Integr Med*. 2014 Sep;12(5):425-38. doi: 10.1016/S2095-4964(14)60045-5.
- 30-Santanam N; Penumetcha M; Speisky H; Parthasarathy S. A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDL_R^{-/-} mice. *Atherosclerosis*. 2004; (173): 203-210.

11 ANEXOS

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto de pesquisa, “Efeito do extrato aquoso de *Peumus boldus*, própolis vermelha e própolis verde associado ao laser de baixa potência sobre a função e regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos”, processo nº 021114RR, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pela pesquisadora **Sonia Oliveira Lima**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 12 de março de 2015.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

Prof.^a *Maria Júlia Nardelli*
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

FORMULÁRIO DE PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo nº: 021114RR	Data de Entrada: 05/03/2015	Data do Parecer: 12/03/2015
Pesquisador Responsável: Sonia Oliveira Lima		
Instituição/Setor: Universidade Tiradentes/ Curso de Biologia		
Título do Projeto: Efeito do extrato aquoso de <i>Peumus boldus</i> , própolis vermelha e própolis verde associado ao laser de baixa potencia sobre a função e regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos.		
1- Equipe envolvida no projeto/experimento: (X) De acordo () Pendência Observação:		
2- Qualificação do(s) executor(es): (X) De acordo () Pendência Observação:		
3- Data de Início: 20/03/2015		Data do Término: 20/03/2018
4- Resumo do projeto: (X) De acordo () Pendência Observação:		
5- Objetivos do projeto: (X) De acordo () Pendência Observação:		

9- Espécie(s) animal(is):

() Bovino () Camundongo () Coelho () Suíno (X) Rato
Outros:

10- Procedência do(s) animal(is):

(X) De acordo () Pendência
Observação:

11- Planejamento estatístico/delineamento experimental:

(X) De acordo () Pendência
Observação:

12- As condições de alojamento e a alimentação dos animais:

(X) De acordo () Pendência
Observação:

13- Procedimentos que minimizem ou evitem a dor, o estresse e sofrimento dos animais:

(X) De acordo () Pendência
Observação:

14- Destino dos animais:

(X) De acordo () Pendência
Observação:

15- Protocolo de eutanásia:

(X) De acordo () Pendência () Não se aplica
Observação:

16- Resumo do procedimento experimental, incluindo a justificativa da finalidade do uso de animais:

(X) De acordo () Pendência () Não se aplica
Observação:

17- Forma de descarte da carcaça:

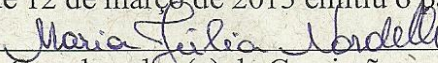
(X) De acordo () Pendência () Não se aplica
Observação:

18- Parecer:

(X) Aprovado () Reencaminhar aos autores () Não Aprovado
Observação:

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, da Universidade Tiradentes, na sua reunião de 12 de março de 2015 emitiu o parecer.

Assinatura:


Coordenador(a) da Comissão

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B.FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

2 Prof.^a Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

TELEFONE: (79)3218 2112
FAX: (79) 3218 21 00

