

PRISCILA GONÇALVES SILVA

**AVALIAÇÃO HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS ADULTOS SUBMETIDOS À
INGESTÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *Pfaffia glomerata*
(SPRENG.) PEDERSEN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Fabiana Cristina S. A. de Melo

Coorientadores: Fernanda Carolina R. Dias
Reggiani Vilela Gonçalves
Sérgio Luis P. da Matta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Viçosa

T

S586a
2021
Silva, Priscila Gonçalves, 1997-
Avaliação hepática de camundongos adultos submetidos à ingestão do
extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen /
Priscila Gonçalves Silva. - Viçosa, MG, 2021.
71 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. *Pfaffia glomerata*. 3. Stress oxidativo.
4. Testes de toxicidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22. ed. 581.634

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6 2578

PRISCILA GONÇALVES SILVA

**AVALIAÇÃO HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS ADULTOS SUBMETIDOS À
INGESTÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA RAIZ DE *Pfaffia glomerata*
(SPRENG.) PEDERSEN**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de março de 2021.

Assentimento:



Priscila Gonçalves Silva
Autora



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo
Orientadora

Ao Jacob, por todo o amor de gato.

AGRADECIMENTOS

Meu pai sempre disse que eu aprenderia na vida de duas formas: ou pelo amor ou pela dor. De quase tudo o que sei, atrevo a me dizer que a dor me ensinou mais do que o amor. E no final desta caminhada sou grata por “não ter vendido a alma ao diabo” (Expressão de Humberto Gessinger, da banda Engenheiros do Hawaii). Não cedi às vantagens de trocar as minhas virtudes com este mundo moderno e deixar de ser quem eu sou. E com teimosia eu coloquei isso na minha cabeça e em tudo o que faço: crescer sem abrir mão da essência.

Muitas pessoas o chamam de Deus. Eu também o chamo de Olorum, Pai Divino que moldou a minha essência e a minha força. E desde sempre eu ando com ela e não costuma falhar. A Umbanda tem um lugar especial no meu coração, pois me acolheu e me deu um mundo mais bonito, que exige disciplina e força. Quando eu caio não me faltam amor e irmandade.

À Minha mãe Neide Aparecida Gonçalves Silva. Eu te agradeço eternamente, mãe. Ver o tempo passar por você me ensinou mais sobre mim mesma. Tuas rezas em meio aos meus dias sem dormir, incertezas e processos trouxeram para mim a luz que eu precisava para seguir em frente. Obrigada por ter me feito a tua filha, me ensinado tanto e ter se doado tanto pelas minhas causas. Eu venci porque você venceu o mundo. Eu te amo!

Ao meu pai Marcelo Leal Silva. Eu herdei de você a minha força, a minha resiliência e a minha capacidade de transformar erros em acertos. Obrigada pela oportunidade de conviver com você e partilhar das tuas dores, memórias e sentimentos!

Ao meu gato Jacob. Ter por você este amor é amar sem possuir e cuidar sem controlar e se impor. Conviver com você, Jacob, é o que ativou de fato o meu lado mais humano. Agradeço aos oito anos consecutivos que estamos vivendo. Eu digo que te amo, Jacob, sem medo algum.

À minha avó, que não está mais entre nós, mas continua sendo a minha guia: Iracema Augusta Gonçalves. Teu amor e tua paciência acolhedora fizeram de mim um ser humano com grandes oportunidades.

À Kyvia Lugate Cardoso Costa. Obrigada por ter acreditado em mim e ver em mim o que ninguém mais via. Eu sou tão grata por ter convivido por quatro anos com você! Teus conselhos ativaram em mim a capacidade de enxergar as virtudes

das pessoas. Eu digo que a humanidade que você carrega é tão grande, tão justa e sincera. Por ter sido o meu primeiro exemplo acadêmico, muito de você eu absorvi e hoje posso ter a amplitude de ver um mundo mais justo e ser mais sincera comigo mesma. Hoje eu tenho compaixão comigo mesma e me vejo com bons olhos. E por isso eu te agradeço.

Aos meus também professores que me deixaram grande saudade: Braz Antônio Pereira Cosenza, Michel Barros Faria, Jaquelina Alves Nunes, Daniel Ferraz. Estes nomes me trazem grande saudade. O professor Michel me disse durante a colação de grau que eu chegaria em casa após ter terminado um ciclo tão bonito e difícil e veria que minha vida seria cinza, pois eu estaria pensando no próximo passo da minha caminhada. Ao caminhar ao lado desses grandes nomes eu percebi que a UEMG Carangola nunca deixará de ser o no qual passei as horas mais trabalhosas e gratificantes da minha vida.

E o que eu poderia dizer para você, Fernanda Carolina? De Fernanda você passou a ser “Tramontina”. E em meio aos risos de uma pessoa capenga, eu te agradeço por me fazer ver os dois lados da moeda e passar a agradecer por estar onde eu estou e ser quem eu sou. Não vou pedir aqui desculpas pelo apelido carinhoso que você carrega a partir daqui, o aceite com carinho. Obrigada por ter me ensinado tanto nos laboratórios quanto fora deles.

À Elizabeth Lopes de Oliveira pelas frases soltas em meio ao caos que fizeram a minha vida tomar um sentido diferente. Você também me fez perceber se tudo deu certo foi porque tudo o que eu planejei deu errado. E nada mais certo que isso.

Agradeço aos professores Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo e Sérgio da Matta. Ambos foram pontos importantes para que eu pudesse enxergar a ansiedade na minha vida como vejo hoje. E foi a partir daí que eu pude começar a ter mais amor com o meu corpo, com a minha alma, a enxergar os meus limites. Fabiana, eu sou imensamente grata também por ter me aceitado e por ter me concedido a oportunidade de realizar este sonho que o mestrado é para mim! Obrigada por tudo!

À professora Reggiani pelas excelentes aulas de Patologia durante o mestrado. Por sua causa eu me tornei uma grande admiradora de fígado e viciada em baixar livros da Elsevier que falam do órgão. Com certeza, o que eu aprendi nas aulas modulou tudo o que sei da minha área de estudo. E é esse conhecimento

adicional de fígado que eu tenho certeza de que vai me ajudar muito ao longo da caminhada!

À minha professora de italiano Suélen. Suas risadas e sua ironia fizeram de mim uma pessoa que adora rir. Obrigada pelas aulas e conversas fora das salas. Obrigada por ter me passado suas experiências! *Bacio!*

À Jéssica Pellenz e ao Júnior (companheiros de pós-graduação): Obrigada pelas boas risadas e pela companhia, em especial à Jéssica por ativar meu lado prático quando precisava. Muito de você eu vejo em mim hoje e sou grata por cada churrasco, almoço, corrida e caminhada que tivemos!

À minha terapeuta Paula por todo o apoio, amizade e todas as vezes que me balançou, pegou na minha mão e me ajudou a vida com outros olhos. Você me inspira e me ajuda muito!

Ao Caetano pela parceria, ajuda, companheirismo, carinho, amor e humildade. Seu afeto é tudo o que há de mais bonito e seus valores acabaram por me tornar uma pessoa mais bonita e feliz em meio ao caos. Obrigada por tudo! Eu te amo!

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa pelas simples perguntas em meio aos dias corridos: “você já almoçou?”. Ao Adnilson Brasileiro, Lúcia, Simone, Donizete e aos demais cujos nomes me escaparam da mente.

Aos demais membros do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural e aos discentes dos demais laboratórios que de alguma forma me ajudaram em detalhes corriqueiros do dia-a-dia.

À Universidade Federal de Viçosa pelo acolhimento e a CAPES pelo fomento! Uma bolsa CAPES não é só uma bolsa, é uma Prada!

Por último e não menos importante, eu quero me agradecer por não ter desistido e por ter lutado para ser quem sou hoje e por ser a primeira pessoa a ter sonhado com as minhas conquistas!

“No início de minha peregrinação, procurava ir junto com meu grupo. Me cansava, exigia de meu corpo mais do que podia dar, vivia tensa, e terminei tendo problemas nos tendões do pé esquerdo. Impossibilitada de andar por dois dias, entendi que só conseguiria chegar a Santiago se obedecesse meu ritmo pessoal.”

“Demorei mais que os outros, tive que andar sozinha por muitos trechos, mas foi só porque respeitei meu próprio ritmo que consegui completar o caminho. Desde então aplico isso a tudo que preciso fazer na vida: respeito meu tempo”

(Paulo Coelho, Maktub).

RESUMO

SILVA, Priscila Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Avaliação hepática de camundongos adultos submetidos à ingestão do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** Orientadora: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo. Coorientadores: Fernanda Carolina Ribeiro Dias, Reggiani Vilela Gonçalves e Sérgio Luis Pinto da Matta.

As folhas e raízes de *Pfaffia glomerata* são usadas como tranquilizantes, analgésicas, e no tratamento de doenças gastrointestinais. No entanto, ainda existem poucos estudos descrevendo a dose e o tempo de exposição seguros para o uso da planta. Baseado nisso objetivou-se avaliar o efeito de extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (BGE) sobre o parênquima hepático, no balanço oxidativo e sobre marcadores bioquímicos e inflamatórios. As metodologias usadas foram quantificação de citocinas, marcadores teciduais oxidativos, enzimas antioxidantes, parâmetros bioquímicos, bem como análises morfométricas e patológicas no tecido hepático. Camundongos adultos (n=30) foram divididos em controle (água), BGE nas doses diárias de 100, 200 e 400 mg/kg e uma dose descontínua (200 mg/Kg a cada três dias) por 42 dias. Após a ingestão de BGE houve diminuição de GST, consequência da ativação da exatão enzimática em resposta às possíveis altas concentrações de radicais livres no tecido hepático. Estes por sua vez atuam na peroxidação lipídica, o que refletiu no aumento de malondialdeído (MDA) em BGE 400 mg/kg e 200 D mg/kg. O óxido nítrico (ON) aumentou em BGE 200 e 400 mg/kg, o que indica alterações no status oxidativo hepático. Houve aumento de IL-10, reforçando o papel desta interleucina na manutenção da inflamação hepática juntamente com a modulação fatores pró e anti-inflamatórios produzidos possivelmente por macrófagos. Neste estudo também houve aumento da população de macrófagos em todos os grupos BGE tratados. Além disso, foi constatada congestão sinusoidal após todos os BGE tratados, indicando alterações no fluxo hemodinâmico do fígado. O aumento dos minerais zinco (Zn), (Cu) e diminuição de (Mn) estão associados com a possível manutenção de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e do equilíbrio enzimático dos hepatócitos. Já as alterações morfológicas como a diminuição do percentual de citoplasma de hepatócitos e a diminuição do percentual destas células indica atuação dos radicais livres no estresse de organelas. Todas estas alterações no balanço antioxidante e oxidativo

foram capazes de levar o fígado a alterações morfológicas do parênquima que são capazes de prejudicar a detoxificação hepática.

Palavras-chave: Status oxidativo. Extrato de *ginseng* brasileiro. Histopatologia. Toxicidade hepática.

ABSTRACT

SILVA, Priscila Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2021. **Hepatic evaluation of mice subjected to an intake of hydroalcoholic extract of the root of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** Adviser: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo. Co-advisers: Fernanda Carolina Ribeiro Dias, Reggiani Vilela Gonçalves and Sérgio Luis Pinto da Matta.

Leaves and roots of *Pfaffia glomerata* are commonly used as tranquilizers, analgesics and in treatment of gastrointestinal diseases. However, a very few studies have described the safe dose and exposure time for plant use. Based on that, we aimed to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of root of *P. glomerata* (BGE) on the hepatic parenchyma and histomorphometry, oxidative stress, minerals quantification, cellular viability, biochemical parameters and inflammation. The methodologies used were morphometric and pathological analyses in liver tissue, quantification of oxidative tissue markers, antioxidant enzymes, biochemical parameters, and cytokines. Adult mice (n=6/group) were divided in control group (water), BGE at daily doses of 100, 200 e 400 mg/Kg and an intermittent dose (200 BGE mg/Kg each three days) during 42 days. After BGE intake there was a decrease in GST as a consequence of activation of enzyme exhaustion in response to possible high concentrations of free radicals in the liver tissue. These in turn act in lipid peroxidation, which reflected in the increase of malondialdehyde (MDA) in BGE 400 mg/kg and 200 mg/kg. Nitric oxide (ON) increased in BGE 200 and 400 mg/kg, indicating changes in liver oxidative status. There was an increase of IL-10, reinforcing the role of this interleukin in the maintenance of hepatic inflammation along with the modulation of pro and anti-inflammatory factors possibly produced by macrophages. An increase in the macrophage population was also observed in all treated BGE groups. In addition, sinusoidal congestion was observed in all treated BGE groups, indicating changes in liver hemodynamic flow. The increase of the minerals zinc (Zn), copper (Cu) and decrease of manganese (Mn) are associated with the possible maintenance of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the enzymatic balance of hepatocytes. On the other hand, morphological changes such as decreased volume and percentage of cytoplasm of hepatocytes and decreased percentage of these cells indicate the action of free radicals in stress of organelles.

All these changes in the antioxidant and oxidative balance were able to lead the liver to morphological changes in the parenchyma that are capable of impairing liver detoxification.

Keywords: Oxidative status. Brazilian *ginseng* extract. Histopathology. Liver toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. <i>Pfaffia glomerata</i>	15
2.2. Fígado.....	16
2.3. Estresse oxidativo.....	17
2.4. Citocinas e o mecanismo de inflamação hepática.....	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. REFERÊNCIAS	21

CAPÍTULO I: Efeitos bioquímicos Efeitos bioquímicos e teciduais do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen no fígado de camundongos adultos

30

<i>Resumo</i>	31
<i>Abstract</i>	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. <i>Coleta e processamento da planta</i>	34
2.2. Extração.....	35
2.3. Perfil fitoquímico do extrato.....	35
2.4. Animais experimentais.....	35
2.5. Tratamento.....	35
2.6. Coleta de amostras hepáticas e processamento.....	36
2.7. Biometrias corporal e hepática.....	36
2.8. Status oxidativo	36
2.8.1. Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S- transferase.....	37
2.8.2. Marcadores de estresse oxidativo.....	37
2.8.2.1. Óxido nítrico (ON).....	37
2.8.2.2. Malondialdeído (MDA).....	37
2.9. Quantificação de citocinas no tecido hepático.....	38
2.10. Quantificação das proteínas hepáticas.....	38
2.11. Extração e quantificação de glicogênio hepático.....	38
2.12. Avaliação do teor de água no tecido hepático.....	38
2.13. Quantificação de minerais no tecido hepático.....	39
2.14. Avaliação de viabilidade celular hepática.....	39
2.15. Quantificação de colágeno total.....	39
2.16. Morfometria hepática.....	40
2.17. Estereologia hepática.....	40
2.18. Análises histopatológicas hepáticas.....	40
2.19. Análises estatísticas.....	41
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Perfil fitoquímico da planta.....	41

3.2. Biometrias corporal e hepática.....	41
3.3. Status oxidativo.....	41
3.4. Citocinas no tecido hepático.....	42
3.5. Proteínas hepáticas.....	42
3.6. Glicogênio hepático.....	42
3.7. Minerais hepáticos	42
3.8. Viabilidade celular hepática	42
3.9. Colágeno total no tecido hepático	42
3.10. Morfometria hepática	43
3.11. Estereologia hepática	43
3.12. Histopatologia hepática	43
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS.....	52
7. ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

Mesmo com a ascensão da medicina europeia como principal fonte de tratamento, o uso de plantas no tratamento de doenças sobrevive à evolução cultural e passa através de gerações (Castro e Figueiredo, 2019; Ramos, de Oliveira e Damascena, 2019). A grande busca por terapias alternativas que envolvam o uso de plantas medicinais é associada à carência de tratamentos de origem sintética (Ferreira et al., 2019; Rodrigues e da Silva Mello, 2019). O consumo de plantas se deve à comprovação de seus efeitos no tratamento de doenças e à presença de substâncias de interesse farmacológico (Santos et al., 2016).

Compostos químicos oriundos de plantas tendem ao acúmulo em tecidos metabolicamente ativos como o fígado (Stickel e Schuppan, 2007). Neste contexto, o monitoramento do sistema antioxidante e de produtos tóxicos endógenos gerados por estresse oxidativo é fundamental para compreender a geração de danos celulares e patologias hepáticas (Tringali, 2011). Portanto, a investigação hepática é fundamental para identificar possíveis toxicidades herbais ou a descoberta de novos agentes terapêuticos para o tratamento de disfunções hepáticas (Lu et al., 2017).

Dentro das espécies de interesse está *Pfaffia glomerata* (Spreng.), detentora de importância alimentar e farmacêutica (Nishimoto et al., 1987). O interesse nesta espécie deve-se à presença de compostos adaptógenos em suas raízes tuberosas que proporcionam o aumento de resistência do organismo (Shiobara et al., 1993). As propriedades medicinais da espécie são atribuídas à presença do composto ecdisterona ou 20-hidroxi-ecdisona (Gavin et al., 2015).

Este composto é um fitoesteroide presente nas raízes de *P. glomerata*, utilizada na produção de medicamentos adaptógenos (Vigo et al., 2003). Além disso, análises fitoquímicas da planta demonstraram a presença de ácido oleanólico, rubrosterona, β -glucopiranosil oleanolato, ginsenosídeos Rb e Rb 1 em suas raízes (Shiobara et al., 1993; Coradin e Siminski, 2011).

Popularmente, *P. glomerata* tem sido utilizada na forma de tônico, antienvelhecimento e afrodisíaca (Mendes, 2011); anti-úlceras e cicatrizante (Rates e Gosmann, 2002); estimulante da circulação periférica (Ferreira e Marques, 2018); e no tratamento de doenças dos sistemas respiratório e digestório (Oliveira, 1986). Diversas propriedades medicinais da planta foram comprovadas, como depressor do

sistema nervoso e antimicrobiano (Rates e Gosmann, 2002); analgésico e anti-inflamatório (Neto et al., 2005); anti-melanogênico e antileishmanial (Caleffi et al., 2015); protetor da mucosa gástrica (Queiroz et al., 2014); antineoplásico (Felipe et al., 2014); e auxiliar no tratamento das doenças gastrointestinais (Freitas et al., 2004).

Apesar de sua ampla aplicabilidade, a segurança do uso de *P. glomerata* ainda não foi completamente definida, uma vez que o consumo depende da avaliação minuciosa de seus efeitos no organismo. Superdosagens da planta podem causar efeitos colaterais como desenvolvimento de asma, hipertensão e insônia, sugerindo que diferentes doses da planta provocam diferentes respostas sobre o Sistema Nervoso Central (Coradin e Siminski, 2011).

Comprovou-se que apesar do efeito afrodisíaco de *P. glomerata*, seu extrato hidroalcoólico promoveu alterações estruturais nos túbulos seminíferos e testículos de camundongos Swiss (Dias et al., 2019). Foi relatado o efeito abortivo e anti-implantação de blastocistos em ratas Wistar (Toledo et al., 2004). Com relação ao fígado, este mesmo estudo sugere uma correlação da atrofia pulmonar com hepatomegalia em ratas após exposição ao extrato aquoso de *P. glomerata*, indicando possível toxicidade hepática.

Dentro deste contexto, são escassos os estudos que avaliam a toxicidade de *P. glomerata* no fígado. Isso evidencia a necessidade de novos estudos toxicológicos a fim de verificar o nível de segurança do seu uso (Smolarek et al., 2009). O uso de plantas medicinais deve prever uma investigação científica dos benefícios e riscos dos extratos vegetais, garantindo assim o consumo seguro, eficiente e de qualidade (Paranaguá et al., 2009).

Desta maneira o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *P. glomerata* no fígado camundongos adultos. Esta avaliação foi feita através de análises bioquímicas, morfológicas, histomorfométricas e patológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pfaffia glomerata*

A família Amaranthaceae possui 60 gêneros e 900 espécies, distribuídas em regiões tropicais e temperadas (Rahman e Gulshana, 2014). No Brasil, estão

presentes 13 gêneros e aproximadamente 100 espécies (Siqueira, 1987). Dentro da família, o gênero *Pfaffia* possui grande importância medicinal e econômica (Vasconcelos et al., 2014). Um estudo prévio mostrou a presença de 20 espécies em território nacional presentes no Cerrado, Caatinga e Campos rupestres (Marchioretto et al., 2009).

Na sabedoria popular, as espécies do gênero são conhecidas como sempre-viva, corango, corango-açu, acônito do mato, doril, anador e batata-do-mato (Carriconde et al., 1996). Dentre as espécies, *P. paniculata*, *P. iresinoides* e *P. glomerata* são conhecidas como *ginseng* brasileiro (Oliveira, 1986). Essa nomenclatura vem do chinês “jensheng”, que se traduz para “na imagem do homem”, cujo formato se assemelha à suas raízes (Nocerino et al., 2000).

Análises fitoquímicas de plantas do gênero comprovaram a presença de ferro, fósforo, saponinas notriterpênicas e ecdisterona. Este último é apontado como principal ecdisteróide de *P. glomerata* (Rates e Gosmann, 2002). Ainda, a planta ganha maior destaque por ser a única das três espécies principais que apresenta compostos fafosídeos com atividade antitumoral (Nakai et al., 1984).

Na terapia alternativa é comum a recomendação do uso de raízes e folhas de *P. glomerata* no tratamento de reumatismo, cicatrização de feridas em diabéticos (Silva et al., 2010); astenia, fadiga e indisposição (Nicoloso et al., 1999; Silva Júnior e Osaida, 2005); além de tranquilizante, antioxidante, antimicrobiano, antitérmico e miorrelaxante (Souza et al., 2005). A intensa exploração tem contribuído para o aumento da demanda comercial e farmacológica da espécie (Ramos, De Oliveira e Damascena, 2019).

2.2 Fígado

O fígado está envolvido em diversas funções metabólicas. Seu papel de detoxificação de xenobióticos ocorre em decorrência da ligação da proteína Citocromo P450 ao retículo endoplasmático das células hepáticas. É também no fígado que ocorre a síntese de hepcidina, proteína responsável pela regulação de ferro através da inibição da proteína transportadora ferroportina (Dufour e Clavien, 2010). O órgão também exerce papel pivotal na regulação de glicose através transportadores de glicose de membrana integral (GLUTs), dos quais GLUT-1,

GLUT-2, GLUT-9, e GLUT-10 são encontrados nos hepatócitos (Karim, Adams e Lalor, 2012).

Ainda, o fígado armazena glicogênio, minerais e vitaminas; sintetiza glicose a partir de aminoácidos, participa de diversas funções metabólicas como homeostase de colesterol, processamento de macronutrientes, controle das vias de sinalização de crescimento, controle do volume sanguíneo e por isto é susceptível a injúrias (Porth e Matfin, 2010). Um vasto número de substâncias químicas usadas farmacologicamente aumenta o risco de lesões hepáticas, podendo existir um amplo espectro de efeitos produzidos por estas substâncias (Veiga Júnior et al., 2005).

A maior causa de desordens hepáticas ocorre por exposição a metais pesados, tetracloreto de carbono, álcool e medicamentos, os quais lesionam o fígado através da produção de espécies reativas de oxigênio (Kasperczyk et al., 2013), apoptose de células hepáticas (Liu et al., 2018), perda da capacidade antioxidante (Huo et al., 2007), danos no DNA (Ozkaya et al., 2016), peroxidação lipídica (González Rendón et al., 2018) e decréscimo dos níveis de ferro e transferrina em células hepáticas (Barnum-Huckins et al., 1997).

2.3 Estresse oxidativo

Antes de gerar qualquer ação sistêmica, compostos fitoquímicos são processados no fígado. Neste órgão, as células hepáticas são o centro da biotransformação de tais substâncias, envolvida principalmente com o Citocromo P450. Ao final deste processo, são gerados subprodutos tóxicos os quais necessitam ser excretados pelo fígado. (Egbuna et al., 2019). Dentro deste contexto, alguns fatores como a natureza sinérgica dos fitocompostos, desequilíbrio das dosagens, tempo de administração e acúmulo de metabólitos tóxicos colaboram para a intoxicação das células hepáticas (Potts, Ebehrard e Wharton, 2015).

Dentro das células são comuns reações de oxirredução necessárias à manutenção do metabolismo celular e necessárias à detoxificação. Ao decorrer destas reações, enzimas antioxidantes atuam na proteção celular contra agentes oxidantes gerados durante o processo. Quando a produção de agentes oxidantes supera a capacidade antioxidante enzimática de defesa, há grande potencialidade para a formação de danos celulares (Brasileiro Filho, 2011).

Durante esses processos, são formadas moléculas instáveis que possuem um elétron desemparelhado no orbital externo e são denominadas radicais livres. A intoxicação das células hepáticas leva ao desequilíbrio do status oxidativo das células (Ushioda e Nagata, 2019). Essa resposta é denominada estresse oxidativo. Este desequilíbrio, sua vez promove a migração de células inflamatórias para o tecido as quais são responsáveis por fagocitar e degradar os subprodutos tóxicos presentes no tecido (Ramos-Tovar e Muriel, 2020).

Entretanto, durante esse processo, mediadores inflamatórios são liberados por essas células causando uma sobrecarga tecidual, liberando maior quantidade de radicais livres (De Andrade et al., 2015). Uma vez que possuem um elétron desemparelhado no orbital externo, estes radicais captam os elétrons de proteínas e lipídeos a fim de obter estabilização e transformam em radicais livres as moléculas das quais captou o elétron, gerando peroxidações constantes (Brasileiro Filho, 2016). Ainda, a geração de radicais livres através de oxigênio molecular (O_2^* ; forma altamente instável do O_2) favorece o aparecimento de lesões teciduais, a depender da permanência do estresse e do agente agressor (Muriel, 2009).

Em resposta à exposição da maquinaria bioquímica aos radicais livres, as células eucariotas desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes na forma de enzimas (Brasileiro Filho, 2011). A enzima Superóxido dismutase (SOD) converte o radical superóxido em água oxigenada (H_2O_2), através da passagem do segundo elétron. A água oxigenada serve como substrato para que Catalase (CAT) produza água e radical hidroxila. Já a enzima Glutathiona reduzida (GSH) age como um protetor celular contra a oxidação, sobretudo em proteínas que possuem grupamentos tiol (Rodrigo, 2009).

O óxido nítrico (ON) é uma molécula sinalizadora que está envolvida na regulação da pressão sanguínea, neurotransmissão e sinalização intra e extracelular. Durante o estresse oxidativo, o ON reage com O_2^{*-} formando oxidantes como o peroxinitrito. Ainda, durante o processo de peroxidação, age na célula como um sinalizador que comunica o status redox celular ou outras informações necessárias à sobrevivência da célula (Bondy e Campbell, 2016). O malondialdeído (MDA) é determinado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras teciduais, sendo um importante produto intermediário de estresse oxidativo (Boyer et al., 2016).

Portanto, devido à sua ampla atividade metabólica e a manifestação de amplos sintomas, os marcadores de estresse oxidativo hepáticos tornam-se fundamentais para que haja o entendimento dos mecanismos fisiológicos afetados pela exposição do fígado aos metais pesados e às diversas substâncias (Preedy e Patel, 2017).

2.4 Citocinas e o mecanismo de inflamação hepática

Drogas, metabólitos reativos ou xenobióticos envolvidos no estresse oxidativo ou radicais livres por ele produzidos podem desencadear estresse nas organelas celulares. Desta forma, os agentes lesivos podem induzir uma resposta adaptativa de forma a atenuar e reparar os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO's) ou então ou então causar mecanismos inflamatórios no órgão (Chen e Will, 2018), resultado da migração celular de macrófagos para o tecido hepático.

Estes macrófagos exercem um papel importante na resposta inflamatória, uma vez que durante a sua migração liberam fatores pró-inflamatórios no tecido (Ramos-Tovar e Muriel, 2020). Durante a tentativa de limpeza tecidual, os fagócitos liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem trazer danos nas membranas das células, oxidação de seus componentes e por consequência alterar suas funções celulares. Este processo recebe o nome de explosão respiratória. (Gonçalves, Costa e Grzeskowiak, 2021).

Ainda durante esse processo, células de Kupffer (CK's) metabolicamente ativadas lançam citocinas inflamatórias no tecido, tais como interleucinas IL-1, IL-6 e TNF- α . Devido à sua ação parácrina, as citocinas passam a estimular a secreção de interleucinas pelas demais CKs adjacentes (Ramadori e Armbrust, 2001). A ativação das CKs também pode também ser alimentada pela expressão de interferon (Li et al., 2017). Além das CK's, células endoteliais dos capilares também são conhecidas pela produção de citocinas sob condições de estresse (Ramadori, 1992).

Sendo assim, as diversas interleucinas (IL's) vão modular as respostas da inflamação no fígado. A IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão envolvidos na ativação de vias de transcrição de fator nuclear $\kappa\beta$, ativação da sinalização intracelular. A expressão da interleucina IL-17 por células Th17 está relacionada com o agravamento da inflamação, provocando lesões hepatocelulares

nos ductos biliares (Sasaki et al., 2015). Já a secreção de IL-2 por CKs, marca o desenvolvimento de hepatite. A IL-4 está associada à mesma doença, atuando na deposição de colágeno durante o seu desenvolvimento (Burt, Ferrell e Hubscher, 2017).

Já durante o período de resolução da inflamação, a IL-10 atua reduzindo a resposta inflamatória, uma vez que estimulam a síntese de fatores que estimulam a remoção das partes lesadas do tecido (Bekker et al., 2016). Essas citocinas são produzidas por macrófagos ativados do tipo M2, que estão envolvidos no mecanismo de reparo tecidual. A IL-10 reduz a atividade pró-inflamatória dos macrófagos do tipo M1, cuja função é liberar fatores pró-inflamatórios no início da inflamação. Diferentemente destes, macrófagos M2 removem corpos apoptóticos do tecido e promovem a limpeza do mesmo (Brasileiro Filho, 2011).

É evidente, desta maneira que por ação da explosão respiratória dos macrófagos ativados, as espécies reativas liberadas levam a um desbalanço oxidativo nas células do tecido. Portanto, o desenvolvimento de lesões hepáticas durante a exposição do fígado a substâncias exógenas pode ser influenciado pela persistência do agente agressor e pela atuação das diferentes citocinas no mecanismo inflamatório.

Dentro deste contexto, estudos subcrônicos com modelos murinos permitem compreender de uma melhor forma a toxicocinética e dos extratos utilizados e prover informações sobre doses pré-clínicas para tratamento humano com base no entendimento da toxicologia hepática envolvida frente à exposição a diferentes substâncias de interesse (Denny e Stewart, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento subcrônico de doses crescentes e uma dose descontínua do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (BGE) no tecido hepático de camundongos Swiss adultos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter valores biométricos corporais e do fígado;

- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) no fígado;
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo óxido nítrico (ON) e malondialdeído (MDA) no fígado;
- Quantificar a produção de marcadores inflamatórios (citocinas IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; IL-17; e interferon) no tecido hepático;
- Quantificar os níveis das proteínas hepáticas Fosfatase Alcalina (ALT) e Aspartato Transaminase (AST);
- Avaliar a viabilidade celular hepática;
- Quantificar o conteúdo de minerais: zinco (Zn), selênio (Se), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn) no tecido hepático;
- Quantificar o glicogênio tecidual hepático;
- Avaliar o teor de água presente no tecido hepático;
- Quantificar o colágeno total presente no tecido hepático;
- Identificar e quantificar possíveis patologias ocorridas no tecido hepático através da contagem de elementos do parênquima como tamanho de núcleo, congestão vascular, infiltrados inflamatórios;
- Quantificar através de morfometria hepática a proporção dos seguintes elementos do parênquima: citoplasma e núcleo de hepatócitos, hepatócitos binucleados, capilares sinusóides, células de Kupffer, e gotículas lipídicas.

4. REFERÊNCIAS

1. PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. Biomarkers in Liver Disease. 1 ed. Londres: Springer; 2017.

2. BARNUM-HUCKINS, K. M.; MARTINEZ, A. O.; RIVERA, E. V.; ADRIAN, E. K. J. R.; HERBERT, D. C.; WEAKER, F. J.; WALTER, C. A.; ADRIAN GS. A comparison of the suppression of human transferrin synthesis by lead and lipopolysaccharide. **Toxicology**, v. 118, n. 1, p. 11-22, 1997.
3. BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. (Ed.). Inflammation, aging, and oxidative stress. 1 ed. Cham: Springer, p.1-405, 2016.
4. BOYER, T. D.; SANYAL, A. J.; TERRAULT, N. A.; LINDOR, K. D. Zakim and Boyer's hepatology: a textbook of liver disease. 7 ed. New York: Elsevier Health Sciences, 2016.
5. BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1-894, 2011.
6. BURT, A. D.; FERRELL, L. D.; HUBSCHER, S. G. MacSween's Pathology of the Liver E-Book. Filadélfia: Elsevier Health Sciences, 2017.
7. CALEFFI, E. R.; KRAUSOVÁ, G.; HYRŠLOVÁ, I.; PAREDES, L. L. R.; DOS SANTOS, M. M.; SASSAKI, G. L.; GONÇALVES, R. A. C.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 392-399, 2015.
8. CARRICONDE, C.; MORES, D. ; FRITSCHEN, M. V.; CARDOZO JÚNIOR, E. L. Plantas medicinais e alimentícias. OLINDA: **Centro Nordestino De Medicina Popular**, v. 1, p. 45-47, 1996.
9. CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56-70, 2019.
10. CHEN, M.; WILL, Y. Drug-induced Liver Toxicity. Louisville: Humana Press, 2018.
11. CHO, Y. E.; IM, E. J.; MOON, P. G.; MEZEY, E.; SONG, B. J.; BAEK, M. C. Increased liver-specific proteins in circulating extracellular vesicles as potential

- biomarkers for drug-and alcohol-induced liver injury. **PloS One**, v. 12, n. 2, p. 1- 23, 2017.
12. CHO, Y. E.; SONG, B. J.; AKBAR, M.; BAEK, M. C. Extracellular vesicles as potential biomarkers for alcohol and drug-induced liver injury and their therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 187, p. 180-194, 2018.
13. CORADIN, L.; SIMINSKI, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região sul. **Ministério do Meio Ambiente**, v. 1, p. 1-934, 2011.
14. DIAS, F. C. R.; MARTINS, A. L. P.; DE MELO, F. C. S. A.; CUPERTINO, M. C.; GOMES, M. L. M.; DE OLIVEIRA, J. M.; DAMASCENO, E. M.; SILVA, J.; OTONI, W. C.; DA MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 179-189, 2019.
15. DUFOUR, J.; CLAVIEN, P. A. Signaling pathways in liver diseases. 3 ed. Springer-Verlag: Berlin, p.421-437, out. 2010. DOI: 10.1002/9781118663387.
16. FELIPE, D. F.; BRAMBILLA, L. Z., PORTO, C., PILAU, E. J., & CORTEZ, D. A. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15720-15734, 2014.
17. FERREIRA, E. T.; DOS SANTOS, E. S.; MONTEIRO, J. S.; GOMES, M. D. S. M.; DE OLIVEIRA MENEZES, R. A.; DE SOUZA, M. J. C. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 1511-1523, 2019.
18. FERREIRA, L. A. Q.; MARQUES, C. A. Garrafadas: uma abordagem analítica. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 243-262, 2018.
19. FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK, L.; DE MORAES SANTOS, C. A.; JÚNIOR, C. C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G.;

- MARQUES, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of the aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167-1179, 2004.
20. GAVIN, R. S.; REISDORFER, E.; DA SILVA GHERARDI-DONATO, E. C.; DOS REIS, L. N.; ZANETTI, A. C. G. Associação entre depressão, estresse, ansiedade e uso de álcool entre servidores públicos. **Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas**, v. 11, n. 1, p. 2-9, 2015.
21. GONZÁLEZ RENDÓN, E. S. CANO, G. G.; ALCARAZ-ZUBELDIA, M.; GARIBAY-HUARTE, T.; FORTOUL, T. I. Lead inhalation and hepatic damage: Morphological and functional evaluation in mice. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 2, p. 128-138, 2018.
22. HUO, X.; PENG, L.; XU, X.; ZHENG, L.; QIU, B.; QI, Z.; ZHANG, B.; HAN, D.; PIAO, Z. Elevated blood lead levels of children in Guiyu, an electronic waste recycling town in China. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 7, p. 1113-1117, 2007.
23. KASPERCZYK, S.; DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, A.; OSTAŁOWSKA, A.; & BIRKNER, E. The administration of N- acetylcysteine reduces oxidative stress and regulates glutathione metabolism in the blood cells of workers exposed to lead. **Clinical Toxicology**, v. 51, n. 6, p. 480-486, 2013.
24. LI, P.; HE, K.; LI, J.; LIU, Z.; GONG, J. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 222-229, 2017.
25. LIU, B.; JIANG, H.; LU, J.; BAIYUN, R.; LI, S.; LV, Y.; LI, D.; WU, H.; ZHANG, Z. Grape seed procyanidin extract ameliorates lead-induced liver injury via miRNA153 and AKT/GSK-3 β /Fyn-mediated Nrf2 activation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 52, p. 115-123, 2018.
26. LORÉAL, O.; CAVEY, T.; BARDOU-JACQUET, E.; GUGGENBUHL, P.; ROPERT, M.; BRISSOT, P. Iron, hepcidin, and the metal connection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 5-128, 2014.

27. LU, K. H.; WENG, C. Y.; CHEN, W. C.; SHEEN, L. Y. *Ginseng* essence, a medicinal and edible herbal formulation, ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative stress and liver injury in rats. **Journal of Ginseng Research**, v. 41, n. 3, p. 316-325, 2017.
28. MARCHIORETTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; SIQUEIRA, J. C. Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia**, v. 60, n. 3, p. 667-681, 2009.
29. MENDES, F. R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 754-763, 2011.
30. MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases. **Hepatology International**, v. 3, n. 4, p. 526-536, 2009.
31. NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides and norriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1703-1705, 1984.
32. NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHÓLIS, A.H.C.; POSSEBOM, L.S.; SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 87-91, 2005.
33. NICOLOSO, F. T.; FORTUNATO, R. P.; FOGAÇA, M. A. F. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 277-283, 1999.
34. NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S.; TAKEMOTO, T.; DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; HIROMISHI, M. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2505-2507, 1987.

35. NOCERINO, E.; AMATO, M.; IZZO, A. A. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 1-5, 2000.
36. OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze: o ginseng brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 1, n. 1, p. 86-92, 1986.
37. OZKAYA, A.; SAHIN, Z.; DAG, U.; OZKARACA, M. Effects of naringenin on oxidative stress and histopathological changes in the liver of lead acetate administered rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 243-248, 2016.
38. PARANAGUÁ, T. T. D. B., BEZERRA, A. L. Q., SOUZA, M. A. D., & SIQUEIRA, K. M. As práticas integrativas na Estratégia Saúde da Família: visão dos agentes comunitários de saúde. **Revista de Enfermagem da UFRJ**, v. 17, n. 1, p. 75-80, 2009.
39. PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. *Biomarkers in Liver Disease*. 1 ed. Londres: Springer; 2017.
40. PORTH, C. M.; MATFIN, G. *Fisiopatologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-911, 2010. ISBN-10: 8527716712.
41. QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; DA MATTA, C. B. B.; SILVA, L. H. A. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DE ARAÚJO, G. B.; MOURA, F. B. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic in northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, P. 1-9, 2014.
42. RAHMAN, A. H. M. M.; GULSHANA, M. I. A. Taxonomy and medicinal uses on Amaranthaceae of Rajshahi, Bangladesh. **Applied Ecology and Environmental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2014.
43. RAMADORI G, RIEDER H, KNITTEL T. Biology and pathobiology of sinusoidal liver cells. In: *Hepatic Transport and Bile Secretion*. New York: Raven Press; 1992. pp. 83–102. In recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation, biliary epithelial cells show increased expression of mitochondrial proteins. **Virchows Archiv**, v. 467, n. 4, p. 417-425, 2015.

44. RAMADORI, G.; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 777-784, 2001.
45. RAMOS, E. S.; DE OLIVEIRA RAMOS, J. H.; DAMASCENA, R. S. Avaliação do uso de Plantas Mediciniais para o tratamento de Hipertensão Arterial Sistêmica entre os usuários de uma Unidade Básica de Saúde. **Revista Multidisciplinar e De Psicologia**, v. 13, n. 48, p. 651-661, 2019.
46. RAMOS, E. S.; DE OLIVEIRA RAMOS, J. H.; DAMASCENA, R. S. Avaliação do uso de Plantas Mediciniais para o tratamento de Hipertensão Arterial Sistêmica entre os usuários de uma Unidade Básica de Saúde. ID on line: **Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v. 13, n. 48, p. 651-661, 2019.
47. RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-92, 2002.
48. RODRIGO, R. Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease. 1 ed. New York: **Nova Science Publishers**, Incorporated, 2009.
49. RODRIGUES, M. L. F.; DA SILVA MELLO, M. G. Acesso através da análise de redes sociais à fitoterapia na saúde básica. Redes: **Revista Hispana Para el Análisis de Redes Sociales**, v. 30, n. 2, p. 244-253, 2019.
50. SANTOS, J. A. A.; DOS SANTOS, E. C. B.; MAGNATA, S. D. S. L. P.; GARCIA, J. E.; MARTINS, R. D. Diagnóstico e educação em saúde no uso de plantas medicinais: relato de experiência. **Revista Ciência em Extensão**, v. 12, n. 4, p. 183-196, 2016.
51. SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K.; NICHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. Nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.
52. SILVA JÚNIOR, A.; OSAIDA, C. C. Ginseng-brasileiro—novo estímulo para o campo e para o corpo. **Agropecuária Catarinense**, p. 41-44, 2005.

53. SILVA, T. C.; COGLIATI, B.; DA SILVA, A. P.; FUKUMASU, H.; AKISUE, G.; NAGAMINE, M. K.; MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, M. L.; DAGLI, M. L. Z. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) roots decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine hepatocarcinogenesis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 2, p.145-155, 2010.
54. SIQUEIRA, J.C. Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 9, n. 1, p. 99-110, 1987.
55. SMOLAREK, F. S. F.; CANSIAN P. M. P.; MERCALI F. C.; CARVALHO, J. L. S.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O.G. Abordagem fitoquímica e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* DC. **Visão acadêmica**, v. 10, n. 1, p. 77-82, 2009.
56. SOUZA, D.J.F.S.; ALVES, K. Z.; DA SILVA, J. D.; DA SILVA E SOUZA, P. V.; DE CARVALHO, M. G.; FREIRE, R. B.; FERREIRA, D. T.; FREIRE, M. F. L. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng) 365 Perderson (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**, v.37, n.3, p. 174-178, 2005.
57. STICKEL, F.; SCHUPPAN, D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. **Digestive and liver disease**, v. 39, n. 4, p. 293-304, 2007.
58. TOLEDO, M. R. S.; SILVA, C. C. A.; ANTONELLO, D.; PIMENTA, K. R.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M.; HEREDIA, N. A. Z.; SCALON, S. P. Q.; BAZZANO, T. S.C. Extratos aquosos de *Pfaffia glomerata* Spreng e seu efeito tóxico em ratas prenhes, **Revista Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 493-498, 2004.
59. TRINGALI, C. Bioactive Compounds from Natural Sources, Second Edition: Natural Products as Lead Compounds in Drug Discovery. 2. ed. Boca Raton: CRC Press: 2012.
60. VASCONCELOS, J. M.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; MALDANER, J.; RÊGO, M. M.; SILVA L. C.; OTONI, W. C. In vitro propagation of Brazilian

- ginseng *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen as affected by sources. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 6, p. 746-751, 2014.
61. VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
62. VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen-Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.

CAPÍTULO I

ARTIGO:

Efeitos bioquímicos e teciduais do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen no fígado de camundongos adultos

Artigo científico a ser submetido para publicação

Priscila Gonçalves Silva; Fernanda Carolina Ribeiro Dias; Elizabeth Lopes de Oliveira; Ana Luiza Pereira Martins; Marcos de Lucca Moreira Gomes; Reggiani Vilela Gonçalves; Sérgio Luiz Pinto da Matta; Wagner Campos Otoni; Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo

Resumo

As folhas e raízes de *Pfaffia glomerata* são usadas como tranquilizantes, analgésicas, e no tratamento de doenças gastrointestinais. No entanto, ainda existem poucos estudos descrevendo a dose e o tempo de exposição seguros para o uso da planta. Baseado nisso objetivou-se avaliar o efeito de extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (BGE) sobre o parênquima hepático e sua histomorfometria, balanço oxidativo, quantificação de minerais, viabilidade celular e marcadores bioquímicos e inflamatórios. As metodologias usadas foram quantificação de citocinas, marcadores teciduais oxidativos, enzimas antioxidantes, parâmetros bioquímicos, bem como análises morfométricas e patológicas no tecido hepático. Camundongos adultos (n=6/grupo) foram divididos em controle (água), BGE nas doses diárias de 100, 200 e 400 mg/kg e uma dose descontínua (200 mg/Kg a cada três dias) por 42 dias. Após a ingestão de BGE houve diminuição de GST, consequência da ativação da exaustão enzimática em resposta às possíveis altas concentrações de radicais livres no tecido hepático. Estes por sua vez atuam na peroxidação lipídica, o que refletiu no aumento de malondialdeído (MDA) em BGE 400 mg/kg e D 200 mg/kg. O óxido nítrico (ON) aumentou em BGE 200 e 400 mg/kg, o que indica alterações no status oxidativo hepático. Houve aumento de IL-10, reforçando o papel desta interleucina na manutenção da inflamação hepática juntamente com a modulação de fatores pró e anti-inflamatórios produzidos possivelmente por macrófagos. Também foi observado aumento da população de macrófagos em todos os grupos BGE tratados. Além disso, foi constatada congestão sinusoidal em todos os grupos BGE tratados, indicando alterações no fluxo hemodinâmico do fígado. O aumento dos minerais zinco (Zn), (Cu) e diminuição de (Mn) estão associados com a possível manutenção de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e do equilíbrio enzimático dos hepatócitos. Já as alterações morfológicas como a diminuição dos volumes e porcentagem de citoplasma de hepatócitos e diminuição do percentual destas células indica atuação dos radicais livres no estresse de organelas. Todas estas alterações no balanço antioxidante e oxidativo foram capazes de levar o fígado a alterações morfológicas do parênquima que são capazes de prejudicar a detoxificação hepática.

Palavras-chave: Status oxidativo. Extrato de *ginseng* brasileiro. Histopatologia. Toxicidade hepática.

Abstract

Leaves and roots of *Pfaffia glomerata* are commonly used as tranquilizers, analgesics and in treatment of gastrointestinal diseases. However, a very few studies have described the safe dose and exposure time for plant use. Based on that, we aimed to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of root of *P. glomerata* (BGE) on the hepatic parenchyma and histomorphometry, oxidative stress, minerals quantification, cellular viability, biochemical parameters and inflammation. The methodologies used were morphometric and pathological analyses in liver tissue, quantification of oxidative tissue markers, antioxidant enzymes, biochemical parameters, and cytokines. Adult mice (n=6/group) were divided in control group (water), BGE at daily doses of 100, 200 e 400 mg/Kg and an intermittent dose (200 BGE mg/Kg each three days) during 42 days. After BGE intake there was a decrease in GST as a consequence of activation of enzyme exhaustion in response to possible high concentrations of free radicals in the liver tissue. These in turn act in lipid peroxidation, which reflected in the increase of malondialdehyde (MDA) in BGE 400 mg/kg and 200 D mg/kg. Nitric oxide (ON) increased in BGE 200 and 400 mg/kg, indicating changes in liver oxidative status. There was an increase of IL-10, reinforcing the role of this interleukin in the maintenance of hepatic inflammation along with the modulation of pro and anti-inflammatory factors possibly produced by macrophages. An increase in the macrophage population was also observed in all treated BGE groups. In addition, sinusoidal congestion was observed in all treated BGE groups, indicating changes in liver hemodynamic flow. The increase of the minerals zinc (Zn), copper (Cu) and decrease of manganese (Mn) are associated with the possible maintenance of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the enzymatic balance of hepatocytes. On the other hand, morphological changes such as decreased volume and percentage of cytoplasm of hepatocytes and decreased percentage of these cells indicate the action of free radicals in stress of organelles. All these changes in the antioxidant and oxidative balance were able to lead the liver to morphological changes in the parenchyma that are capable of impairing liver detoxification.

Keywords: Oxidative status. Brazilian *ginseng* extract. Histopathology. Liver toxicity.

1. INTRODUÇÃO

Na medicina popular, as raízes de *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) são utilizadas em extratos que visam o tratamento de estresse, ansiedade, (Almeida et al., 2017) indisposição (Souza et al., 2005), reumatismos e diabetes (Silva et al., 2010). Esta espécie apresenta ainda interesse farmacêutico devido à presença de ácido oleanólico, rubrosterona, β -glucopiranosil oleanolato e ecdisterona em sua composição, sendo este último composto o principal componente empregado em medicamentos à base de ginseng brasileiro (Gavin et al., 2015).

A planta atua como depressora do sistema nervoso (Rates e Gosmann, 2002), anti-melanogênica e antileishmanial (Caleffi et al., 2015), protetora da mucosa gástrica (Queiroz et al., 2014) e antineoplásica (Felipe et al., 2014). Apesar dos efeitos positivos, existem relatos sobre o efeito negativo do extrato aquoso de *P. glomerata* na concentração de 10 e 20%, causando atrofia pulmonar e hepatomegalia (Toledo et al., 2004). Também já foi demonstrado que apesar do efeito afrodisíaco, quando o extrato foi usado na dose de 200 mg/kg, promoveu alterações estruturais nos túbulos seminíferos de camundongos (Dias et al., 2019).

É sabido que a crescente a busca de fontes naturais consumidas através de chás e extratos visam o tratamento de doenças e a melhoria da qualidade de vida (Rowe, 2016). Desta maneira, o estudo dos efeitos de extratos vegetais permite direcionar a validação de plantas na fitoterapia através da confirmação de sua efetividade e principalmente de sua segurança (Ahn, 2017; Albuquerque et al., 2018).

Dentro deste contexto, é de extrema importância a investigação dos fatores e mecanismos de ação que podem levar às lesões hepáticas induzidas por ervas (Amadi e Orisakwe, 2018; Byeon et al., 2019). Assim, a toxicidade do extrato ou sua eficácia são multifatoriais, dependendo do tempo de tratamento (Guldiken et al., 2018), da dose administrada, da via de administração e também da biodisponibilidade de seus fitoquímicos (Li et al., 2018). Além disso, a toxicidade também dependente da interação dos fitoquímicos com os fatores fisiológicos do organismo e seu sistema imunológico (Byeon et al., 2019). Apesar do grande uso de *P. glomerata*, não existem parâmetros consistentes na literatura em relação às suas doses e efeitos no fígado.

O fígado possui um sistema de defesa antioxidante composto pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST) que geram uma resposta protetiva contra os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO's) que são produzidos na cadeia transportadora de elétrons e conseqüentemente promovem uma sobrecarga tecidual conhecida como estresse oxidativo. Radicais livres e ERO's são

responsáveis por promover lesões importantes dentro das células e provocar a peroxidação de lipídeos e a oxidação de proteínas e do DNA, comprometendo atividades importantes como transcrição, tradução e geração de energia pelas mitocôndrias levando a alterações citoplasmáticas e nucleares (Gonçalves, Costa e Grzeskowiak, 2021; Galati et al., 2019, Boreli et al., 2018).

Deste modo, as enzimas antioxidantes aceleram a proteção celular contra a geração de radicais livres e ERO's em diferentes tecidos, principalmente os quais são metabolicamente ativos como o fígado. A SOD acelera a conversão do radical superóxido (O_2^{*-}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), deixando o radical superóxido menos disponível na célula para a formação do radical hidroxil (OH). O peróxido de hidrogênio formado é convertido em H_2O e O_2 por ação da enzima CAT. Já a clivagem de componentes tóxicos da célula é feita mediante a presença da enzima GST, a qual atua conjugando componentes tóxicos do organismo com a enzima glutathiona reduzida (GSH) (Brasileiro Filho, 2011; Awasthi, 2006).

Deste modo, é importante investigar a ação dos extratos vegetais na modulação dos mecanismos antioxidantes das células (Fu et al., 2018), uma vez que os mecanismos de ação de extratos e o conhecimento de seus efeitos no fígado validam ou excluem a utilização dos mesmos na área farmacológica e médica (Santos et al., 2016). Portanto, surge a necessidade de investigar os efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* no tecido hepático, dada a amplitude de utilização popular desta planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e processamento da planta

A matriz de *P. glomerata* utilizada foi cedida pela coleção de Germoplasma de Plantas Medicinais da Embrapa/Cenargen (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia) e foi cultivada em estufas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. Os espécimes utilizados neste estudo foram fornecidos pelo banco de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFV (LCT – Bioagro – UFV), e cultivados no campo experimental Sítio Bela Vista, Vila Valério, Espírito Santo, Brasil ($18^{\circ}58'55.5''S$ $40^{\circ}15'17.8''W$) e coletadas após um ano de plantio. Em seguida, foram secos em estufa ($55^{\circ}C$), triturados em moinho de facas (SL32, Solab) e armazenados. Um espécime foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ- UFJF, Minas Gerais, Brasil (CESJ-63317) como testemunho.

2.2 Extração

O extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* (BGE) foi obtido no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Uma quantidade de 700 g da raiz triturada foi deixada em maceração por 48 horas com álcool etílico 95%. Em seguida, o extrato foi submetido à percolação exaustiva com o mesmo processo, seguido de extração exaustiva. Posteriormente houve evaporação rotativa com pressão reduzida e liofilização (liofilizador VirTis BenchTop K) para remoção de solvente, com rendimento de 9,3%.

2.3 Perfil fitoquímico do extrato

A análise fitoquímica do extrato de *P. glomerata* foi realizada em trabalhos anteriores pelo nosso grupo de pesquisa (Matta et al., 2020; Dias et al., 2019). Após a preparação do extrato, a quantificação de metabólitos secundários tais como cumarinas, alcaloides, taninos, flavonoides, esteróides e antraquinonas foi realizada através de folhas de sílica gel GF254 através do método de cromatografia (SigmaAldrich®).

2.4 Animais experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (UFV, protocolo 044/2015). Trinta camundongos Swiss com 55 dias de idade oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral em condições de luminosidade (12h), temperatura (21±22°C) e umidade (60-70%) controlados, com alimentação e hidratação *ad libitum*.

2.5 Tratamento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=6 animais por grupo), sendo mantidos em gaiolas com 3 animais cada (30x20x13cm). Animais controle receberam 0,5 mL de água por gavagem. Os animais tratados diariamente com o extrato hidroalcoólico da raiz do *ginseng* brasileiro (BGE) foram distribuídos em grupos que receberam 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg. Animais do último grupo receberam extrato hidroalcoólico de BGE 200 mg/kg de forma descontínua, em intervalos de 3 dias. As concentrações do extrato foram ressuspensas em 0,5 mL de água e administradas via gavagem. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios (Matta et al., 2020). O

tratamento com BGE teve duração de 42 dias consecutivos em todos os grupos experimentais, exceto no tratamento descontínuo de 200 mg/kg.

2.6 Coleta de amostras hepáticas e processamento

Ao final do tratamento os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), inicialmente sedados e anestesiados com tiopental 30 mg/kg via intraperitoneal, seguida de aprofundamento anestésico e exsanguinação. Em seguida foi realizada a abertura da cavidade abdominal a partir de incisão na linha ventral para dissecação e retirada do fígado. Amostras hepáticas foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 4%, 1:1 em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4) por 24 horas e posteriormente desidratadas em solução crescente de etanol. Os fragmentos foram posteriormente incluídos em hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 3 µm foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de, no mínimo, 40 µm entre os cortes. Demais amostras hepáticas foram armazenadas em freezer -80° C para realização das análises bioquímicas. Amostras de 200 mg foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio e potássio (pH 7,4) e homogeneizadas, e centrifugadas a 12.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises bioquímicas, quantificação de proteínas hepáticas e de glicogênio hepático.

2.7 Biometrias corporal e hepática

Para o cálculo da variação de peso corporal (PC), os animais foram pesados no início e ao final do experimento, sendo a variação obtida pela subtração do peso corporal final pelo inicial. O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela relação entre o peso do fígado (PF) e o peso corporal final (PCf), sendo $IHS = PF/PCf \times 100$. Para determinar os volumes hepáticos foi retirado um lóbulo hepático esquerdo de cada amostra já fixada, pesado em balança analítica e posteriormente colocado em proveta milimetrada contendo 1 mL de água, e então observado o deslocamento da água dentro da proveta. Esse deslocamento foi considerado como o volume ocupado pelo lóbulo (VL) e o valor obtido foi utilizado para calcular o volume total do órgão (VF), sendo $VF = VL \times PF/PL$, onde PF = peso do fígado e PL = peso do lóbulo. A densidade do fígado foi obtida através da fórmula $d=m/v$.

2.8 Status oxidativo

2.8.1 Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST)

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada baseada na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- e assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000). A atividade enzimática da catalase (CAT) foi mensurada segundo (Aebi et al. 1984) pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM; $\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e $240 = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Os resultados de SOD e CAT foram expressos em U SOD/mg proteína. A atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) foi mensurada de acordo com um estudo anterior (Habig et al., 1974) através da formação do conjugado glutathione-2,4- dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CNDNB 1 mM em etanol, Glutathione Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7,0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorbância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar do CNDNB e $340 = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$.

2.8.2 Marcadores de estresse oxidativo

2.8.2.1 Óxido nítrico (ON)

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico foi detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H_3PO_4 . A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM (Ricart-Jané et al., 2002; Droge, 2002).

2.8.2.2 Malondialdeído (MDA)

Ao homogenato foi adicionada solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M), pois as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o MDA importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3 tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína (Buege e Aust, 1978).

2.9 Quantificação de citocinas no tecido hepático

A quantificação das citocinas (pg/mL) IL-2; IL-4; IL-10; IL-17 e interferon foi realizada através da metodologia de análise de Citometria de Fluxo (Casao et al., 2020). Amostras de tecido hepático congeladas a -80 ° C foram homogeneizadas em tampão PBS 7,4 contendo 0,05% de Tween (Tween ®, Merck, Alemanha) e centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi analisado com a utilização de kits de imunoenensaio pelo BD Cytometric Bead Array (CBA)/MouseTh1/Th2/Th17 do segmento BD citometria notes (CBA) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os dados foram coletados por meio do FACS Calibur e analisados com o *software* FCAP 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As dosagens foram fornecidas para citometria de fluxo, de acordo com as recomendações do fabricante.

2.10 Quantificação das proteínas hepáticas

Amostras de sangue foram homogeneizadas em solução tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugadas a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação das enzimas hepáticas. Os níveis séricos de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) foram determinados por um imunoenensaio de quimioluminescência (Fraga et al., 1987).

2.11 Extração e quantificação de glicogênio hepático

O glicogênio foi extraído de acordo com os métodos propostos por Hassid e Abraham (1957). Porções de 50mg de tecido hepático foram digeridas por aquecimento (100° C) em 0,5 mL de 5 NKOH por 60 minutos. O glicogênio foi purificado e precipitado com 99% de etanol em água fervente e então centrifugado (6.000 rpm por 20 minutos). Os pellets obtidos foram ressuspendidos em 1 mL de água destilada e 3mL de antrona. Foi obtida uma solução (50 mg diluída em 50 ML de H₂SO₄) e incubada por 10 minutos a 100° C. A quantificação do glicogênio das amostras foi realizada através da leitura em espectrofotômetro a 620 nanômetros (Power Wave X).

2.12 Avaliação do teor de água do tecido hepático

Um pequeno fragmento do fígado congelado foi utilizado para avaliar o teor de água do tecido. Para isso, o fragmento foi seco a 60 °C por 96 h para obter o peso constante do fígado seco. O teor de água (mL/g) foi avaliado pela diferença entre o peso do fígado úmido e

seco. O peso relativo dos órgãos foi calculado usando a razão entre o peso do órgão (PO) e o peso corporal (PC), em que o peso relativo = $PO / PC \times 100$ (Novaes et al., 2012).

2.13 Quantificação de minerais no tecido hepático

As proporções de zinco (Zn), selênio (Se), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn) foram avaliadas no tecido hepático de acordo com a metodologia de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (Ladeira et al., 2020). Fragmentos hepáticos secos a 60°C por 96h, revestidos com carbono evaporado (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, Inglaterra, Reino Unido) e analisados em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Carl Zeiss, Jena, Thuringia, Alemanha) com um sistema detector de raios X (Tracor TN5502, Middleton, WI, EUA). A análise foi realizada com uma ampliação de 100x usando uma tensão de aceleração de 20 kV e uma distância de trabalho de 10 mm. Os resultados foram expressos em valor médio.

2.14 Avaliação de viabilidade celular hepática

Fragmentos hepáticos foram incluídos em historesina (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Para a análise de viabilidade celular, as lâminas histológicas foram coradas com os marcadores laranja de acridina e iodeto de propídio. Em seguida, as mesmas foram montadas com glicerina e observadas em microscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies). Células viáveis foram marcadas em verde por laranja de acridina, observadas com o filtro GFP; células com alteração irreversível (morte celular por apoptose) foram marcadas em vermelho e células com alteração reversível (lesão membranar) em amarelo pelo iodeto de propídio, observadas com o filtro RFP (Perl e Little, 1980). Dez imagens digitais por animal foram obtidas em fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá). A análise de viabilidade celular foi realizada através de Histofofotometria Computadorizada, na qual foi feita a definição do intervalo de cor das áreas que representaram a quantidade de células em processo inicial de dano (amarelo/alaranjado) ou células mortas (vermelho) em cada campo. Para esta análise foi utilizado o software Image J® (National Institute of Health, USA).

2.15 Quantificação de colágeno total

Fragmentos hepáticos foram incluídos em historesina (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 3µm foram obtidas através de processamento em micrótomo rotativo. Para a quantificação de colágeno total as lâminas

foram coradas com Picrosirius. As preparações foram analisadas em microscópio de luz com um polarizador acoplado a um analisador de imagem. Foram selecionados 20 campos por animal, totalizando 120 campos por grupo. O colágeno total foi quantificado com o auxílio do software Image J® (National Institute of Health, USA).

2.16 Morfometria hepática

Foi projetada uma grade contendo 266 interseções sobre 10 campos capturados aleatoriamente em objetiva de 20X (Olympus AX 70 TRF), totalizando 2660 pontos por animal. Foram computados os pontos coincidentes sobre citoplasma e núcleo de hepatócitos, hepatócitos binucleados, capilares sinusóides, células de Kupffer e gotículas lipídicas. Para determinar o percentual de cada componente foi utilizada a fórmula: proporção volumétrica (%) = (número de pontos sobre cada componente hepático/2.660 pontos no total) x 100. A proporção volumétrica (%) de cada componente avaliado foi calculada usando a equação $V_v = PP / PT \times 100$, na qual PP é o número de pontos sobre a estrutura de interesse e PT é o número total de pontos na área histológica (Cupertino et al., 2013). Todas as contagens foram realizadas no software Image J- (National Institute of Health, EUA).

2.17 Estereologia hepática

O diâmetro nuclear médio dos hepatócitos foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de cada animal. O cálculo do volume nuclear (VN) foi obtido através da seguinte fórmula: $(VN = 4/3 \pi R^3)$, onde R = raio nuclear). Para cálculo do volume citoplasmático (VC) foi utilizada a fórmula $(VC = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo})$ e, em seguida, o volume do hepatócito (VH) somando-se VN e VC, sendo os valores expressos em μm^3 . Para o cálculo da relação nucleoplasmática (RNP), foi utilizada a seguinte fórmula $RNP = (\% \text{ núcleo total} / \% \text{ de citoplasma}) \times 100$. O cálculo do volume que hepatócitos ocupam no fígado (VH/Órgão) foi realizado a partir da fórmula: $VH / \text{órgão} = \text{volume do hepatócito (mL)} \times \text{Volume Fígado} / 100$. O número total de hepatócito no fígado (N. hep) foi calculado a partir da fórmula: $N. \text{ Hep} = VH \text{ por órgão} / HV (\mu\text{m}^3)$, onde: HV (μm^3) = volume de um hepatócito e VH por órgão é o volume de todos os hepatócitos no fígado.

2.18 Análises histopatológicas hepáticas

Uma lâmina de cada animal foi corada com Azul de Toluidina, sendo em seguida fotografada em aumento de 20X, em 10 campos aleatórios, totalizando 60 fotos (campos) por

grupo. Nos cortes histológicos do fígado foram avaliados em cada lâmina parâmetros que pudessem indicar a toxicidade do tratamento: a presença ou ausência de infiltrados inflamatórios, degeneração, aumento nuclear; e congestão dos capilares sinusoides.

2.19 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Os resultados dos gráficos foram expressos em mediana, intervalo interquartil, valores máximos e mínimos. Já os dados da tabela foram expressos em média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Perfil fitoquímico da planta

A prospecção fitoquímica realizada por nosso grupo de pesquisa identificou no extrato de *P. glomerata* a presença de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, triterpenos/esteróides e alcaloides (Dias et al., 2019). Diferentemente deste último, outro estudo observou a presença de compostos da classe das cumarinas no extrato da planta (Matta et al., 2020).

3.2 Biometrias corporal e hepática

Houve diminuição do peso corporal e do peso e volume do fígado dos animais tratados com BGE 200 mg/kg e BGE D 200 mg/kg. No entanto, o índice hepatossomático (IHS) apresentou redução significativa somente nos animais tratados com BGE D 200 mg/kg. Já o componente de água no tecido hepático não apresentou variação significativa entre os grupos experimentais (Tabela 1).

3.3 Status oxidativo

Com relação às enzimas antioxidantes, GST diminuiu significativamente em todos os grupos tratados com BGE em relação ao controle (Figura 1C). Os níveis de SOD e CAT não tiveram alterações significativas. Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, foi observado um aumento de ON no grupo BGE D 200 mg/kg em relação ao grupo controle

(Figura 2A) e os níveis de MDA aumentaram nos grupos tratados com BGE 400 mg/kg e 200 D mg/kg (Figura 2B).

3.4 Citocinas no tecido hepático

Os níveis de IL-10 aumentaram significativamente no grupo que recebeu o extrato BGE 200 mg/kg (Figura 3). Não houve alteração significativa nos níveis das demais citocinas avaliadas nem do interferon.

3.5 Proteínas hepáticas

Os níveis de proteínas hepáticas AST e ALT são apresentados na Figura 4. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais com relação aos níveis de AST. Entretanto, os níveis de ALT diminuíram significativamente nos grupos tratados com BGE 100 mg/kg, 200 mg/kg e 200 D mg/kg quando comparado aos demais grupos.

3.6 Glicogênio hepático

A dosagem de glicogênio no tecido hepático diminuiu em todos os grupos tratados com BGE, sendo mais acentuada no grupo BGE 100 mg/kg (Figura 5).

3.7 Minerais hepáticos

O percentual de Zinco (Zn) teve aumento significativo nos grupos BGE 400 mg/kg e 200 mg/kg D. Houve um aumento na porcentagem de Cobre (Cu) nos grupos tratados BGE 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg. Houve diminuição do mineral Manganês (Mn) no grupo BGE 400 mg/kg. Houve redução de Sódio (Na) nos grupos BGE 200 mg/kg e 400 mg/kg. Não houve alteração significativa dos minerais Ferro (Fe), Cálcio (Ca), Potássio (K) e Magnésio (Mg) nos grupos tratados com BGE em relação ao controle (Figura 6).

3.8 Viabilidade celular hepática

O percentual de células com lesões iniciais aumentou nos animais tratados com o extrato nas concentrações de 100 mg/kg, 400 mg/kg e 200 D mg/kg (Figura 7 B). A proporção de células com alterações irreversíveis (morte celular) aumentou nos grupos BGE 100 mg/kg e 400 mg/kg (Figura 7 C). Não foram observados danos iniciais ou morte celular significativa na histologia hepática do grupo controle (Figura 7). Já nos grupos tratados com BGE. Nos demais grupos tratados com BGE, observou-se a presença de células em processo de dano

inicial e morte celular, sendo o grupo D 200 mg/kg o que apresentou maior visualização de células com danos iniciais e morte celular. Em animais dos grupos BGE 100, 200 mg/kg e 200 D mg/kg foi observada uma diminuição de células com alta integridade de membranas, expressa pela marcação em fluorescência verde (Figura 7).

3.9 Colágeno total no tecido hepático

Houve diminuição significativa nos níveis de colágeno total nos grupos BGE 100 mg/kg, 400 mg/kg e BGE D 200 mg/kg (Figura 8).

3.10 Morfometria hepática

Houve diminuição do percentual e volume de citoplasma de hepatócitos acompanhada de aumento no percentual e volume de núcleos dos hepatócitos em todos os grupos tratados com BGE (Tabela 2). O extrato de BGE, em todas as doses testadas, promoveu diminuição significativa no percentual e volume de hepatócitos. Houve aumento na proporção de macrófagos (células de Kupffer) nos grupos BGE 200 mg/kg e BGE D 200 mg/kg e diminuição do volume destas células nestes mesmos grupos (Tabela 2).

3.11 Estereologia hepática

As doses de BGE testadas não promoveram alterações significativas no diâmetro do núcleo dos hepatócitos, no volume nuclear do hepatócito, no volume do hepatócito e no número de hepatócitos/órgão. Entretanto, o grupo BGE 200 mg/kg teve diminuição do volume do citoplasma. Ainda, os grupos BGE 200 mg/kg, BGE 400 mg/kg e BGE D 200 mg/kg tiveram diminuição significativa do volume de hepatócito por órgão e aumento significativo da RNP (Tabela 3).

3.12 Histopatologia hepática

Fotomicrografias da histopatologia do fígado de camundongos controle e tratados com diferentes doses de BGE estão ilustradas na Figura 9. Foi observado um quadro de congestão vascular nos grupos tratados, sendo esta mais acentuada no grupo BGE 200 D mg/kg (lâminas B a E). A quantificação de patologias hepáticas está disposta na Figura 9 A. O percentual de congestão vascular aumentou nos grupos BGE 200 mg/kg, BGE 400 mg/kg e 200 D mg/kg (Figura 9). Surpreendentemente, o percentual de infiltrados inflamatórios foi menor nos grupos tratados com relação ao grupo controle (Figura 9 A - B).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo contém informações pioneiras na avaliação dos efeitos de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro – BGE) sobre o tecido hepático. De forma geral, os resultados demonstraram que o fígado exposto ao BGE apresentou alterações enzimáticas significativas e aumento de marcadores hepáticos relacionados ao desbalanço oxidativo e consequentemente o desenvolvimento de um processo inflamatório. Além disso, o estudo mostrou alterações nos parâmetros morfológicos, volumétricos e na histomorfometria hepática.

O monitoramento da atividade antioxidante e de marcadores do estresse oxidativo hepáticos são ferramentas importantes para monitorar as respostas do órgão frente a sua exposição a um biocomposto ou extrato com importância biológica que visa sua projeção em estudos clínicos. As enzimas SOD, CAT e GST fazem parte do complexo antioxidante, responsável por acelerar a passagem dos elétrons na cadeia transportadora e assim diminuir o tempo de vida útil dos radicais livres e ERO's que são produzidos ao longo do processo (Baptista et al., 2020). A primeira enzima antioxidante, SOD, é responsável por promover a passagem do segundo elétron e pela formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que serve de substrato para a ação da segunda enzima antioxidante, a CAT. O H_2O_2 é decomposto pela CAT, que acelera a passagem do terceiro elétron e promove a formação da primeira molécula de água (H_2O), mas também do radical hidroxila (Gonçalves, Costa e Grzeskowiak, 2021). Atuando na última fase deste processo está a GST, que acelera a passagem do último elétron formando a segunda molécula de H_2O . As doses de *P. glomerata* testadas neste estudo não promoveram alterações significativas nos níveis hepáticos de SOD e CAT. Atuando na detoxificação celular, a GST catalisa a conjugação da GSH (glutathiona reduzida) com compostos tóxicos, tornando-os mais solúveis e de mais fácil excreção (Preedy e Patel, 2017). Esta enzima faz parte da fase II das defesas antioxidantes. Durante o estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio que escapam da primeira linha de defesa antioxidante podem consequentemente sobrecarregar os níveis de GST.

A persistência de agentes estressores no fígado é capaz de gerar um estresse tecidual. De forma persistente, esse estresse estimula o aumento exacerbado de radicais livres como radical hidroxila, radical peroxila lipídico, e peroxinitrito (Awasthi, 2006; Cupertino et al., 2013). Em condições de homeostase, as enzimas antioxidantes aumentam a atividade a fim de proteger as células contra danos celulares gerados por esses radicais. Entretanto, o aumento

dos radicais livres em resposta à constante atuação das enzimas antioxidantes em altos limiares leva à exaustão da defesa antioxidante, diminuindo assim a sua atividade e expressão (Gonçalves et al., 2013). Desta forma, essa exaustão enzimática é um importante mecanismo associado à geração de danos celulares e posteriormente teciduais (Freitas et al., 2016). Este mecanismo pode justificar a diminuição da enzima GST em fígados tratados com diferentes doses de BGE neste estudo.

Compostos exógenos introduzidos no organismo são metabolizados no fígado resultando na formação de pequenos metabólitos, porém altamente reativos que resultam em uma sobrecarga tecidual. Os radicais lipoperóxil, que são formados durante o processo de produção radicais livres dentro das células são altamente reativos e que atuam na desestabilização e oxidação das membranas celulares, processo denominado peroxidação celular (Destro et al., 2021). Um dos principais marcadores de peroxidação lipídica é o MDA. No presente estudo, um aumento significativo deste marcador foi observado no fígado dos animais expostos ao BGE nas doses de 400 mg/kg e 200 mg/kg D. O aumento de MDA no presente trabalho é um forte indicativo que estes grupos sofreram ataque às membranas celulares com alteração no funcionamento das ATPases e consequente diminuição da função celular. Soma-se a isto, o processo de exaustão enzimática da GST, diminuindo a resposta antioxidante das células e potencializando a produção de MDA (Kalantari et al., 2018). Portanto, os níveis de MDA tendem a crescer conforme a gravidade dos danos oxidativos (Zhang et al., 2018), sendo este aumento visto como um reflexo do estresse oxidativo induzido gerado por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO'S), podendo induzir danos hepáticos.

Além do MDA, outro marcador importante de lesão celular pela ação dos radicais livres é o óxido nítrico (ON) que em condições fisiológicas funciona como mediador de sinalização de processos como a neurotransmissão e vasodilatação (Dias et al., 2019). Assim, a taxa de produção de ON é um fator determinante que influencia diretamente as respostas celulares. No entanto, durante o processo de estresse oxidativo tecidual, o ON reage com o superóxido, resultando em peroxinitrito que é convertido na presença de excesso de ON em dióxido de nitrogênio (NO_2) e trióxido de nitrogênio (N_2O_3). Estas espécies são particularmente tóxicas e impactam as vias de sinalização mediadas por tiol, inibindo principalmente proteínas que possuem esses grupamentos. Além disto, durante o estresse oxidativo sua síntese se eleva devido ao aumento da presença da enzima iNOS, óxido nítrico

sintase induzível, potencializando o efeito lesivo deste composto (Poivre e Duez, 2017). No presente trabalho o ON apresentou aumento somente no grupo BGE 200 mg/kg D, o que está relacionado com a oxidação de proteínas das células e sua consequente exaustão, o que pode ser comprovado em nosso estudo pela diminuição nos níveis de GST, sugerindo que a exposição a esta dose é capaz de causar além da peroxidação de lipídeos a oxidação das proteínas celulares. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo anterior, no qual o composto herbal saikosaponina também foi capaz de causar depleção de GST e elevação da iNOS (Li et al., 2017).

As prospecções fitoquímicas de *P. glomerata* apontaram a presença de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, triterpenos/esteroides e alcaloides (Matta, 2020), com destaque para o composto ecdisterona como composto majoritário da constituição da planta (Corrêa et al., 2015). A observação de toxicidade e estresse oxidativo nos testículos de camundongos expostos ao extrato da planta foi atribuída à presença predominante de ecdisterona (Dias et al., 2019). Desta forma, o estresse oxidativo é uma condição tecidual que é gerada a partir da exposição a agentes estressores causado por oxidação de componentes celulares. De maneira semelhante é sugerido que, de maneira geral, em nosso trabalho, grande parte da ação do extrato sobre os parâmetros de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse encontrados estão relacionados à predominância de ecdisterona.

As citocinas são proteínas que são produzidas no organismo em condições fisiológicas não homeostáticas e patologias. Hepatotoxinas, drogas e xenobióticos podem induzir estresse nos hepatócitos de tal forma a aumentar a quantidade de quimiocinas e estimular a produção de citocinas da APR (acute phase response), ou das respostas de fase aguda (Burt, Ferrel e Hubscher, 2017). De maneira interessante, houve aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo BGE 200 mg/kg. Portanto, sugere-se que a concentração ótima de flavonoides presentes nesta concentração do extrato de BGE foi capaz de iniciar uma resposta anti-inflamatória frente a injúrias sofridas pelo tecido hepático (Preedy e Patel, 2017). O aumento de citocinas anti-inflamatórias ocorre à medida que há a resolução da inflamação e é também uma resposta ao aumento de citocinas pró-inflamatórias expressas na fase aguda anterior. Um estudo anterior também relatou aumento da citocina IL-10 em ratos alimentados com maçãs ricas em flavonoides (Sekhon-Loodu et al., 2014). Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, no qual houve aumento de IL-10

no fígado dos animais tratados com BGE 200 mg/kg, apoiando o papel da IL-10 na tentativa de induzir a homeostase hepática e reparo tecidual.

O presente estudo observou alterações hepáticas após a administração crônica do extrato. Após 42 dias de exposição ao extrato foi observado um aumento no percentual de macrófagos nos fígados tratados com BGE 200 mg/kg e 200 mg/kg D e diminuição do volume destas células nos mesmos grupos. Este resultado pode estar relacionado com a visualização de infiltrados inflamatórios dos grupos tratados com BGE. Dentro deste contexto, a toxicidade do extrato ou sua eficácia são dependentes de fatores como doses administradas, vias de administração, biodisponibilidade de seus fitoquímicos e também do tempo de exposição (Li et al., 2018). Juntos, estes fatores formam uma linha do tempo que permite a escolha de observação dos resultados encontrados em um recorte temporal dentro do experimento (Guldiken et al., 2018), o que pode justificar a observação de macrófagos e infiltrados inflamatórios em detrimento das fases de inflamação presentes no período agudo. O aumento do percentual das células de Kupffer está relacionado ao seu papel na secreção de fatores regulatórios de inflamação durante um quadro de estresse oxidativo (Predy e Patel 2017; Weng et al., 2018), o que leva a justificar o aumento no percentual de macrófagos nos fígados tratados com BGE 200 mg/kg e 200 mg/kg D e diminuição do volume destas células nos mesmos grupos. Cabe ressaltar que os tipos de fatores secretados por células de Kupffer dependem do tipo do agente estressor ao qual o fígado é exposto. O equilíbrio de minerais no fígado é essencial para o funcionamento de enzimas antioxidantes, manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico das células, regulação inflamatória e também na transmissão de sinais celulares (Sun et al., 2012). O estresse oxidativo é considerado um dos principais fatores envolvidos na alteração dos níveis de microminerais no fígado, o que leva a um maior risco no desenvolvimento de doenças (Zhang et al., 2018). Sabe-se que o desbalanço oxidativo pode diminuir a absorção e oferta de minerais e consequentemente comprometer a capacidade de enzimas importante como SOD e CAT, uma vez que muitos minerais são cofatores enzimáticos (Bhikha e Glynn, 2018). Por exemplo, o cobre (Cu) é necessário para a reação de diversas enzimas como citocromo oxidase e peroxidase, além de acelerar a conversão de radicais superóxido em O_2 e H_2O_2 por ação da SOD (Al-Fartusie e Mohssan, 2017). O zinco (Zn) é essencial para a manutenção da estrutura da SOD, além de ser encontrado em enzimas envolvidas no crescimento e metabolismo celular e está presente na estrutura de mais de 300 enzimas (Osredkar e Sustar, 2011). Por isso, ambos os minerais estão envolvidos de forma combinada na regulação do metabolismo redox das células (Lee, 2018; Li e Yang, 2018; Yu

et al., 2019). Surpreendentemente, neste estudo, a concentração de cobre aumentou nos grupos BGE tratados nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg enquanto zinco aumentou em BGE 400 mg/kg e 200 D mg/kg, alterações que não acompanharam o aumento da expressão de SOD e CAT. Apesar disso, os resultados sugerem que o aumento destes minerais é uma resposta à tentativa de manter o balanço antioxidante frente ao estresse tecidual e possivelmente foi essencial na manutenção enzimática de SOD1, atuante no citoplasma (Wang et al., 2011). O aumento de Cu e Zn também foi observado após exposição de fígados ao arsênio (Souza et al., 2018). Já o manganês (Mn) se faz extremamente necessário para o metabolismo de carboidratos e é um fator chave para o funcionamento enzimático, como na atuação de SOD no sequestro de radicais livres. No presente estudo, houve diminuição de Mn em BGE 400 mg/kg, o que sugere que o estresse tecidual provocado por esta dose foi capaz de provocar alterações no balanço redox mitocondrial, levando a alterações da SOD-2, forma de SOD presente na matriz mitocondrial (Zhang et al., 2018). O sódio (Na), por sua vez, diminuiu após o tratamento com BGE 200 e 400 mg/kg, sugerindo danos morfológicos e peroxidação nas membranas celulares, uma vez que os níveis de MDA também estavam aumentados nestes grupos, considerando que o Na é fundamental para que ocorra o transporte de íons na membrana da célula (Carafoli, 1987). Alterações nos níveis de Na também estão relacionadas com maior propensão do desenvolvimento de cirrose hepática (Eghtesad, Poustchi e Malekzadeh, 2013). Agentes estressores possuem a capacidade de afetar diversos eixos hepáticos. Porém, o fígado é um órgão que tem a capacidade de regular seus eixos de homeostase dependendo da severidade do dano. Embora tenham existido alterações nos níveis de Cu, Zn, e Na, alterações nos níveis de Fe, Ca, K e Mg, não foram alteradas com o tratamento.

Foi observada redução no número de células viáveis em animais tratados com BGE 100 e 200 mg/kg e 200 mg/kg D, sugerindo que esta dose possui uma concentração de 20-hidroxicidisona que é capaz de interferir nos mecanismos de viabilidade celular. Além disso, a descontinuidade do tratamento em 200 mg/kg D é mais propensa a intensificar os danos hepáticos, uma vez que a dose descontínua do extrato propiciou a submissão do fígado a condições de estresse após um breve intervalo de tempo utilizado pelo órgão para expressar condições fisiológicas de melhora dos danos hepáticos. Durante a exaustão enzimática, a grande quantidade de radicais livres no tecido é capaz de interagir com o Citocromo P-450, atuante na detoxificação hepática, consequência esta provocada por altas concentrações de flavonoides, que provocam efeitos tóxicos no fígado (Peález et al., 2019). Ainda, observou-se

neste estudo o aumento no número de hepatócitos células com alterações nos fígados expostos ao BGE nas doses de 100, 200 mg/kg e 200 mg/kg D e aumento no percentual de células com alteração irreversível grupos BGE 100 e 400 mg/kg, sugerindo que este resultado está associado com a ativação de vias relacionadas à apoptose. Os resultados obtidos podem ser atribuídos à possível diminuição ou perda da capacidade de detoxificação dos hepatócitos que pode influenciar e ativar vias patológicas e de inflamação (Peález et al., 2019; Kwon et al., 2012). Ocorrendo a persistência do agente agressor, as células podem apresentar alterações em vias como BAX e caspases que atuam na ativação da morte celular. De forma semelhante, o tratamento com oximatrina derivada de *Sophora flavescens* atuou diminuindo a viabilidade celular de hepatócitos (Cao et al., 2010; He et al., 2019). De fato, a marcação de células em processo de lesão inicial e lesão irreversível é um indicativo de toxicidade provocada por compostos (Buriani et al., 2017). O extrato de *Pfaffia glomerata* foi capaz de induzir apoptose em modelos murinos (Dias et al., 2019; Wang et al., 2016). De maneira semelhante, diversos compostos naturais estão associados à geração de morte celular em modelos murinos (Panigrahi et al., 2014; Lu et al., 2016; Zheng et al., 2018).

Os danos causados aos hepatócitos podem ser comprovados pelas alterações das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransaminase (AST) que são bastante utilizadas como marcadoras de lesões hepáticas provocadas por drogas ou substâncias tóxicas. Após o estresse dos hepatócitos, enzimas como ALT (citoplasmática) e AST (nas formas mitocondrial e citoplasmática) tendem a extravasar das células hepáticas para a corrente sanguínea, uma vez que escapam das células através das áreas danosas na membrana plasmática (Kanel, 2017; Diallo et al., 2014). Três das quatro diferentes doses de BGE (100 e 200 mg/kg e 200 D mg/kg) diminuíram os níveis de ALT no presente estudo. É conhecido que o estresse oxidativo possui a capacidade de modular os níveis de ALT e AST em decorrência do estresse tecidual. Entretanto em nosso estudo, a composição de flavonoides de BGE parece exercer forte influência sobre a enzima ALT. Um estudo anterior aponta que os polifenóis de origem herbal possuem a capacidade de inibir a saída de ALT através das membranas das células hepáticas (Diab et al., 2020). Resultados semelhantes foram observados em camundongos tratados com *Capparis spinosa*, cujos níveis hepáticos de ALT foram diminuídos (Kalantari et al., 2018) e também em ratos tiveram diminuição de ALT quando receberam tratamento com compostos derivados de óleos essenciais (Vetvicka e Vetvickova, 2016). No presente estudo, apesar de haver alterações no status oxidativo e em parte da bioquímica hepática, os níveis de AST não foram alterados.

Neste estudo, houve diminuição de glicogênio hepático após a exposição ao extrato de *P. glomerata* em todas as doses testadas. Esta diminuição pode ser atribuída à ativação da gliconeogênese para manutenção da reserva energética hepática na presença do estresse oxidativo e também aos possíveis danos nas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos provocado por BGE (Ibrahim et al., 2019; Qiu et al., 2019). Os radicais livres atuantes no tecido possuem a capacidade de desestabilizar diversas proteínas essenciais ao metabolismo. A glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) é uma proteína envolvida em diversos processos como progressão do ciclo celular, apoptose e também a regulação da glicogênio sintase (GS). Estudos anteriores apontam que o estresse oxidativo é capaz modular a expressão de GSK-3. Uma vez desregulada, a expressão dessa proteína pode levar a alterações patológicas (Shinohara et al., 2010), estresse em retículo endoplasmático e ativar vias apoptóticas (Schönthal et al., 2012), o que leva a sugerir que devido à ação tóxica de BGE, a síntese de glicogênio foi diminuída por uma possível diminuição nos níveis de GST em detrimento da desregulação de GSK-3.

As alterações morfológicas teciduais são consequência da ativação de uma cascata de radicais livres e dos mecanismos de inflamação que ocorrem no tecido em detrimento do estresse oxidativo (Souza et al., 2018), e estas alterações podem culminar no desenvolvimento de patologias hepáticas. No presente trabalho o percentual de colágeno diminuiu nos grupos BGE 100, 400 mg/kg e 200 D mg/kg. Esta diminuição pode indicar que o extrato de BGE não foi capaz de promover fibrose hepática. Outra justificativa para estes resultados está na geração de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, cujo aumento provoca a degradação de colágeno nas lâminas basais das células (Sun et al., 2018).

Os capilares sinusoides são um sistema de intercâmbio molecular entre o sangue e os hepatócitos. Em um fígado em equilíbrio homeostático, os níveis de ON são adequados para suportar a perfusão dos capilares sinusoides. Entretanto, sob influência do estresse oxidativo tecidual e da quantidade de radicais livres gerados, o ON passa a ter ação citotóxica, desestabilizando a perfusão dos capilares e induzindo a congestão sinusoidal (Gazdic et al., 2018; Shah e Kamath, 2003). Desta maneira, este mecanismo pode estar atrelado aos achados histopatológicos do presente estudo, no qual se observou um quadro de congestão sinusoidal após tratamento com o extrato de BGE todas as doses, especialmente em BGE 200, 400 mg/kg e BGE D 200 mg/kg. Em um trabalho anterior, o ON também influenciou o surgimento

de lesões morfológicas em testículo de camundongos expostos ao extrato de *P. glomerata* (Dias et al., 2019).

O tratamento com o extrato de *Pfaffia glomerata* BGE nas doses de 200 mg/kg e 200 D mg/kg causou diminuição do peso do fígado impactando diretamente na diminuição do peso corporal e volume do hepáticos, sendo que estes resultados podem estar associados à diminuição de colágeno constatada neste estudo. Além disso, a diminuição do peso do fígado pode ser atribuída aos efeitos nocivos de substâncias tóxicas e drogas (Kane et al., 2019). De maneira similar, modelos murinos alimentados com *Cassia occidentalis* tiveram diminuição no peso corporal, a qual se relacionou com danos hepáticos (Panigrahi et al., 2014).

O índice hepatossomático (IHS) é um parâmetro que visa quantificar o percentual de massa corporal alocada em tecido hepático. A redução deste parâmetro no grupo BGE D 200 mg/kg pode ser indicativa de comprometimento do tecido hepático, que pode ser associado à forma de administração descontínua de BGE, que neste estudo pode ter influenciado na diminuição deste parâmetro neste mesmo grupo. De maneira similar, camundongos tratados com extrato aquoso de *Radix salviae miltiorrhizae* apresentaram diminuição do IHS e peso do fígado (Hong et al., 2017). Há uma estreita relação entre os marcadores de dano oxidativo e alterações morfológicas no parênquima hepático. A diminuição do percentual de citoplasma dos hepatócitos de todos os grupos tratados com BGE, principalmente nas doses de 200 mg/kg e 200 D mg/kg, pode estar relacionada ao estresse do retículo endoplasmático rugoso e da mitocôndria provocados pelo estresse oxidativo (He et al., 2019). A diminuição do percentual de citoplasma também refletiu na redução do volume citoplasmático nos mesmos grupos. Ainda, provavelmente a diminuição deste parâmetro de forma mais significativa foi capaz de resultar na diminuição do percentual dos hepatócitos. Além disso, um dos mecanismos para explicar o aumento do percentual de núcleos após o tratamento com BGE é a tentativa de regeneração hepática como resposta à toxicidade do extrato com o objetivo de manter a o patrimônio genético das células. Tecidos que, tais como o fígado, apresentam alta taxa de síntese de proteínas, absorvem e incorporam toxinas de forma a manifestarem mais rapidamente respostas aos danos sofridos e desenvolverem lesões (Dara, Liu e Kaplowitz, 2016).

Neste estudo, todas as doses testadas de BGE foram capazes de aumentar o volume nuclear dos hepatócitos, o que refletiu na diminuição do volume citoplasmático destas células e conseqüentemente ter afetado na diminuição de seu volume. Alterações nucleares podem ser

evidências morfológicas que marcam aumento da atividade celular (Abdel-Hafez e Othman, 2013), o que pode ser uma resposta à injúria celular sofrida pelo tecido. Ainda, a relação nucleoplasmática (RNP) aumentou nos grupos tratados com as doses BGE 200, 400 mg/kg e 200 D mg/kg. Possivelmente a célula ativa mecanismos de proteção que são importantes para sobrevivência celular após injúrias. Outro achado encontrado em nosso estudo e que apoia esta alteração núcleo citoplasmática foi o aumento na produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória responsável pela ativação de vias de sobrevivência no interior das células.

Este trabalho avaliou ainda outros diferentes parâmetros hepáticos não apresentados em estudos anteriores. Análises volumétricas mostraram que houve diminuição do volume de citoplasma de hepatócitos após exposição ao BGE na dose de 200 mg/kg, o que pode estar relacionado com o estresse de organelas anteriormente discutido. O volume de hepatócitos por órgão, diminuiu nos grupos tratados com BGE 200, 400 mg/kg e 200 D mg/kg, o que pode estar diretamente relacionado com a diminuição de peso do fígado nos grupos que receberam as doses 200 mg/kg, sendo ou não o tratamento descontínuo.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que a GST foi a enzima antioxidante do fígado afetada após a exposição ao extrato de BGE, influenciando na detoxificação hepática. O esgotamento de GST se mostrou relacionado como consequência da atuação de radicais livres no fígado, o que refletiu no aumento de MDA e ON após o tratamento com o extrato. As alterações no status oxidativo podem estar relacionadas com a observação de congestão vascular e modulação da resposta inflamatória, o que influenciou no aumento na população de macrófagos e também na expressão de IL-10 em um dos grupos tratados, reforçando o papel da IL-10 no controle do mecanismo de inflamação, modulando assim os danos hepáticos. Portanto, exaustão enzimática é um fator chave que influencia a produção de radicais livres que atuam no estresse tecidual. Estes radicais, por sua vez, modulam o recrutamento de células inflamatórias para o tecido hepático, mostrando que as mesmas atuam na modulação da inflamação hepática e no consequente surgimento de lesões.

6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEZ, A. M. M; OTHMAN, M. A. Effect of sildenafil citrate on the structure of rat liver: a histological, histochemical and immunohistochemical study. **Egyptian Journal of Histology**, v. 36, n. 4, p. 991-1003, 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, p. 121-126, 1984.
- AHN, K. The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. **BMB Reports**, v. 50, n. 3, p. 111, 2017.
- ALBUQUERQUE, K. R. S.; PACHECO, M. N.; CASAO, L. R. T.; DE MELO, A. S. C. F.; NOVAES, D. R.; GONÇALVES, V. R. Applicability of plant extracts in preclinical studies of melanoma: A systematic review. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- AL-FARTUSIE, FALAH S.; MOHSSAN, S. N.; Essential trace elements and their vital roles in human body. **Indian Journal of Advanced Chemical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 127-136, 2017.
- ALMEIDA, I. V.; DÜSMAN.E.; MATTGE, G. I.; TOLEDO, F.; REUSING, A. F.; VICENTINI, V. E. P. In vivo antimutagenic activity of the medicinal plants *Pfaffia glomerata* (Brazilian ginseng) and *Ginkgo biloba*. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.
- AMADI, C. N.; ORISAKWE, O. E. Herb-induced liver injuries in developing nations: An update. **Toxics**, v. 6, n. 2, p. 24, 2018.
- AWASTHI, Y. *Toxicology of glutathione transferases*. New York: CRC Press, 2006.
- BAPTISTA, A.B.; SARANDY, M.M.; GONÇALVES, R.V.; NOVAES, R.D.; GONÇALVES, C. C.; LEITE, J.P.V.; PELUZIO, M.D.C.G.; Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Anacardium occidentale* L. and *Anacardium microcarpum* D. Extracts on the Liver of IL-10 Knockout Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.
- BHIKHA, R.; GLYNN, J. The Pharmacological Action of Common Herbal Remedies. **American Journal of Internal Medicine**, v. 6, n. 5, p. 99-107, 2018.

- BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1-894, 2011.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURIANI, A.; FORTINGUERRA, S.; CARRARA, M.; PELKONEN, O.; DUEZ, P.; VUORELA, P. M.; VUORELA, H. Toxicology of Herbal Products. Gewerbestrasse: Springer, 2017.
- BURT, A. D.; FERRELL, L. D.; HUBSCHER, S. G. MacSween's Pathology of the Liver E-Book. Filadélfia: Elsevier Health Sciences, 2017.
- BYEON, J. H.; KIL, J. H.; AHN, Y. C.; SON, C. G. Systematic review of published data on herb induced liver injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 190-196, 2019.
- CALEFFI, E. R.; KRAUSOVÁ, G.; HYRŠLOVÁ, I.; PAREDES, L. L. R.; DOS SANTOS, M. M.; SASSAKI, G. L.; GONÇALVES, R. A. C.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 392-399, 2015.
- CAO, Y.G.; JING, S.; LI, L.; GAO, J.Q.; SHEN, Z.Y.; LIU, Y.; XING, Y.; WU, M.L.; WANG, Y.; XU, C.Q. Antiarrhythmic effects and ionic mechanisms of oxymatrine from *Sophora flavescens*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 12, p. 1844-1849, 2010.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 395-433, 1987.
- CASAO, T. D. R. L.; PINHEIRO, C. G.; SARANDY, M. M.; ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; LEITE, J. P. V. Croton urucurana Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113042, 2020.
- CORRÊA, J.P.O.; VITAL, C.E.; PINHEIRO, M.V.M.; BATISTA, S. D; AZEVEDO, L.F.J.; SALDANHA, W. C; DA CRUZ, F. C. A.; DA MATTA, M. F.; OTONI, C. W.

- In vitro photoautotrophic potential and ex vitro photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 121, n. 2, p. 289-300, 2015.
- CUPERTINO, Marli C.; COSTA, K. L. C.; SANTOS, D. C. M.; NOVAES, R. D.; CONDESSA, S. S.; NEVES, A. C.; OLIVEIRA, J. A.; MATTA, S. L. P. Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 5, p. 343-351, 2013.
 - DESTRO, A.L. F.; SILVA; S. B.; GREGÓRIO; P. K.; DE OLIVEIRA, M. J.; LOZI; A. A.; ZUANON; S. A. J.; SALARO, L. A.; DA MATTA, P. L. S.; GONÇALVES, V. R.; FREITAS, B.M. "Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the neotropical fish *Astyanax altiparanae*." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 208 (2021): 111601.
 - DIAB, K. A.; FAHMY, M. A.; HASSAN, E. M.; HASSAN, Z. M.; OMARA, E. A.; ABDEL-SAMIE, N. S. Inhibitory activity of black mulberry (*Morus nigra*) extract against testicular, liver and kidney toxicity induced by paracetamol in mice. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 3, p. 1733-1749, 2020.
 - DIALLO, A.; EKLUGA-DEGBE, K.; AMEGBOR, K.; AGBONON, A.; AKLIKOKOU, K.; CREPPY, E.; GBEASSOR, M. In vivo and in vitro toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1214-1218, 2014.
 - DIAS, F. C. R.; MARTINS, A. L. P.; DE MELO, F. C. S. A.; CUPERTINO, M. C.; GOMES, M. DE L. M.; DE OLIVEIRA, J. M.; DAMASCENO, E.M., SILVA, J.; OTONI, W.C.; DA MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 179-189, 2019.
 - DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; & PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.

- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, jan. 2002.
- EGHTEHAD, S.; POUSTCHI, H.; MALEKZADEH, R. Malnutrition in liver cirrhosis: the influence of protein and sodium. **Middle East Journal of Digestive Diseases**, v. 5, n. 2, p. 65, 2013.
- FELIPE, D. F.; BRAMBILLA, L. Z., PORTO, C., PILAU, E. J., & CORTEZ, D. A. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESIMS/MS. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15720-15734, 2014.
- FRAGA, C. G.; MARTINO, V. S.; FERRARO, G. E.; COUSSIO, J. D.; BOVERIS. Flavonoids as antioxidants evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 5, p. 717-720, 1987.
- FREITAS, R. B.; NOVAES, R. D.; GONÇALVES. R.V; MENDONÇA, B.G.; SANTOS, E.C.; RIBEIRO, A.Q.; LIMA, L.M.; FIETTO, L.G.; PELUZIO, M.C.G.; LEITE, J.P.V.; *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- FU, Y.; WANG, X.; KONG, W. Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 8, p. 1173-1189, 2018.
- GALATI, S.; BONI, C.; GERRA, C. M.; LAZZARETTI, M.; BUSCHINI, A. Autophagy: a player in response to oxidative stress and DNA damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- GAVIN, R. S.; REISDORFER, E.; DA SILVA GHERARDI-DONATO, E. C.; DOS REIS, L. N.; ZANETTI, A. C. G. Associação entre depressão, estresse, ansiedade e uso de álcool entre servidores públicos. **Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas**, v. 11, n. 1, p. 2-9, 2015.
- GAZDIC, M.; SIMOVIC MARKOVIC, B.; VUCICEVIC, L.; NIKOLIC, T.; DJONOV, V.; ARSENIJEVIC, N.; TRAJKOVIC, V.; LUKIC, M.L.; VOLAREVIC,

- V. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver natural killer T cells in an inducible nitric oxide synthase- and indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent manner. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 2, p. e1173-e1185, 2018.
- GONÇALVES, R. V.; COSTA, A.; GRZESKOWIAK, L. Oxidative Stress and Tissue Repair: Mechanism, Biomarkers, and Therapeutics. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.
 - GONÇALVES, R.V.; NOVAES, R.D.; DO CARMO C. M.; MORAES, B.; LEITE, V. J. P.; DO CARMO, M. G. P.; DE MELLO, P. V. M.; DA MATTA, P. L. S. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 383-390, 2013.
 - GULDIKEN, B.; OZKAN, G.; CATALKAYA, G.; CEYLAN, F. D.; YALCINKAYA, I. E.; CAPANOGLU, E. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 37-49, 2018.
 - HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
 - HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S. Assay of 14 C-labeled Glycogen. **Method in Enzymology**, v. 3, p. 37, 1957.
 - HE, S.; ZHANG, C.; ZHOU, P.; ZHANG, X.; YE, T.; WANG, R.; SUN, G., SUN, X. Phylogenetic relationship, structure-toxicity relationship, and herb-ingredient network analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3633, 2019.
 - HONG, M.; LI, S.; WANG, N.; TAN, H. Y.; CHEUNG, F.; FENG, Y. A biomedical investigation of the hepatoprotective effect of *Radix salviae miltiorrhizae* and network pharmacology-based prediction of the active compounds and molecular targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 620, 2017.

- IBRAHIM, A. T. Biochemical and histopathological response of *Oreochromis niloticus* to malathion hepatotoxicity. *Journal of Royal Science*, v. 1, n. 1, p. 10-15, 2019;
- KALANTARI, H.; FORUOZANDEH, H.; KHODAYAR, M. J.; SIAHPOOSH, A.; SAKI, N.; KHERADMAND, P. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Capparis spinosa* L. fractions and Quercetin on tert-butyl hydroperoxide-induced acute liver damage in mice. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 8, n. 1, p. 120-127, 2018.
- KANE, N. F.; KYAMA, M. C.; NGANGA, J. K.; HASSANALI, A.; DIALLO, M.; KIMANI, F. T. Acute Toxicity Effect of *Artemisia afra* Plant Extracts on the Liver, Kidney, Spleen and in Vivo Antimalarial Assay on Swiss Albino Mice. **Advances in Bioscience and Bioengineering**, v. 7, n. 4, p. 64, 2019.
- KANEL, G. C. Pathology of liver diseases. Los Angeles: John Wiley & Sons, 384 p., 2017.
- KWON, H.; LEE, S. H.; KIM, S. E.; LEE, J. H.; JEE, Y. K.; KANG, H. R.; PARK, B. J.; PARK, J. W.; HONG, C. S. Spontaneously reported hepatic adverse drug events in Korea: multicenter study. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 3, p. 268, 2012.
- LADEIRA, L. C. M.; DOS SANTOS, E. C.; VALENTE, G. E.; DA SILVA, J., SANTOS, T. A.; MALDONADO, I. R. D. S. C. Could biological tissue preservation methods change chemical elements proportion measured by energy dispersive X-ray spectroscopy? **Biological Trace Element Research**, v. 196, n. 1, p. 168-172, 2020.
- LEE, S. R. Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. **Oxidative medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- LI, L.; YANG, X. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

- LI, S.; TAN, H. Y.; WANG, N.; CHEUNG, F.; HONG, M.; FENG, Y. The potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- LI, S.; WANG, N.; FENG, Y. G.; LI, H. Y. Antioxidants in the Prevention and Treatment of Liver Diseases. **Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives**, p. 467-491, 2017.
- LU, H.; ZHANG, L.; GU, L.L.; HOU, B.Y.; DU, G.H. Oxymatrine Induces Liver Injury through JNK Signalling Pathway Mediated by TNF-alpha In Vivo. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 119, n. 4, p. 405-411, 2016.
- MATTA, A. P. L.F; LEITE, J. P. V.; GOMES, M. L.; MORAIS, D. B.; CARVALHO, F. A.; OTONI, W. C.; MATTA, S. L. Deleterious effects of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen hydroalcoholic extract on the seminiferous epithelium of adult Balb/c mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 5, p. 183-191, 2020.
- NOVAES, R. D; GONÇALVES, R. V.; MARQUES, D. C. S., CUPERTINO, M. D. C.; PELUZIO, M. D. C. G.; LEITE, J. P. V.; MALDONADO, I. R. D. S. C. Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 1, p. 62-70, 2012.
- OSREDKAR, J.; SUSTAR, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 3, n. 2161, p. 0495, 2011.
- PANIGRAHI, G.K.; YADAV, A.; YADAV, A.; ANSARI, K.M.; CHATURVEDI, R.K.; VASHISTHA, V.M.; RAISUDDIN, S.; DAS, M. Hepatic transcriptional analysis in rats treated with *Cassia occidentalis* seed: Involvement of oxidative stress and impairment in xenobiotic metabolism as a putative mechanism of toxicity. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 1, p. 273-283, 2014.
- PEÁLEZ, D. G.; FERNÁNDEZ, H. M.; REGINO, W. O. Emerging Concepts: Herb-Induced Liver Injury (HILI). **Revista Colombiana de Gastroenterología**, v. 34, n.1, p. 56-62, 2019.

- PERL, D. P.; LITTLE, B. W. Acridine orange-nucleic acid fluorescence: Its use in routine diagnostic muscle biopsies. **Archives of Neurology**, v. 37, n. 10, p. 641- 644, 1980.
- POIVRE, M.; DUEZ, P. Biological activity and toxicity of the Chinese herb *Magnolia officinalis* Rehder & E. Wilson (Houpo) and its constituents. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 18, n. 3, p. 194-214, 2017.
- PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. Biomarkers in Liver Disease. 1 ed. Londres: Springer; 2017.
- QIU, L., JIA, K., HUANG, L., LIAO, X., GUO, X., & LU, H. Hepatotoxicity of tricyclazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 232, p. 171-179, 2019.
- QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; DA MATTA, C. B. B.; SILVA, L. H. A. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DE ARAÚJO, G. B.; MOURA, F. B. P.; ALEXANDRE MOREIRA, M. S. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic in northeastern Brazil. Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-9, 2014.
- RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-92, 2002.
- REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 375-392, 1998.
- RICART-JANE, D.; LLOBERA, M.; LOPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**, v. 6, n. 2, p. 178-185, mar. 2002.
- ROWE, I. A. Lessons from epidemiology: the burden of liver disease. **Digestive Diseases**, v. 35, n. 4, p. 304-309, 2017.

- SANTOS, J. A. A.; DOS SANTOS, E. C. B.; MAGNATA, S. D. S. L. P.; GARCIA, J. E.; MARTINS, R. D. Diagnóstico e educação em saúde no uso de plantas medicinais: relato de experiência. **Revista Ciência em Extensão**, v. 12, n. 4, p. 183- 196, 2016.
- SANTOS, J. A. A.; DOS SANTOS, E. C. B.; MAGNATA, S. D. S. L. P.; GARCIA, J. E.; MARTINS, R. D. Diagnóstico e educação em saúde no uso de plantas medicinais: relato de experiência. **Revista Ciência em Extensão**, v. 12, n. 4, p. 183-196, 2016.
- SCHÖNTHAL, A. H. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- SEKHON-LOODU, S.; CATALLI, A.; KULKA, M.; WANG, Y.; SHAHIDI, F.; RUPASINGHE, H. V. Apple flavonols and n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fish oil lowers blood C-reactive protein in rats with hypercholesterolemia and acute inflammation. **Nutrition Research**, v. 34, n. 6, p. 535-543, 2014.
- SHAH, V.; KAMATH, P. S. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. **Liver Transplantation**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2003.
- SHINOHARA, S.; YBANEZ, M. D.; WIN, S.; AUNGTHAN, TIN.; JAIN, S.; SOUZA, A. C. F.; MARCHESI, S. C.; DE ALMEIDA LIMA, G. D.; MACHADO-NEVES, M. Effects of arsenic compounds on microminerals content and antioxidant enzyme activities in rat liver. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 2, p. 305-313, 2018.
- SILVA, T. C.; COGLIATI, B.; DA SILVA, A. P.; FUKUMASU, H.; AKISUE, G.; NAGAMINE, M. K.; MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, M. L.; DAGLI, M. L. Z. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) roots decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine hepatocarcinogenesis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 2, p.145-155, 2010.
- SOUZA, A. F.; MARCHESI, S.C.; LIMA, G.D.A; Effects of arsenic compounds on microminerals content and antioxidant enzyme activities in rat liver. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 2, p. 305-313, 2018.

- SUN L.; YU, YU. ; TAO, H . ; NA, P.; YU, D.; YU, Z.; LI, H.; SHENG, H.; CAI, LU.; XUE, J.; JING, M.; LI, Y.; LIN, X.; WANG, F. Associations between ionic profile and metabolic abnormalities in human population. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e38845, 2012.
- SUN, M. S.; JIN, H.; SUN, X.; HUANG, S.; ZHANG, F. L.; GUO, N. Z.; YANG, Y. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- TOLEDO, M. R. S.; SILVA, C. C. A.; ANTONELLO, D.; PIMENTA, K. R.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M.; HEREDIA, N. A. Z.; SCALON, S. P. Q.; BAZZANO, T. S.C. Extratos aquosos de *Pfaffia glomerata* (Spreng) e seu efeito tóxico em ratas prenhes, **Revista Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 493-498, 2004.
- VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. Essential oils from Thyme (*Thymus vulgaris*): chemical composition and biological effects in mouse model. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 12, p. 1180-1187, 2016.
- WANG, D.; PEI, X. Y.; ZHAO, W. L.; ZHAO, X. F. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes higher calcium mobilization to induce apoptosis. **Cell Calcium**, v. 60, n. 1, p. 1-12, 2016.
- WANG, Y.; HAN, T.; XUE, L.M.; HAN, P.; ZHANG, Q.Y.; HUANG, B.K.; ZHANG, H.; MING, Q.L.; PENG, W.; QIN, L.P. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice. **Die Pharmazie- An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 6, p. 445-449, 2011.
- WENG, T. I.; CHEN, H. J.; LU, C. W.; HO, Y. C.; WU, J. L.; LIU, S. H.; HSIAO, J. K. Exposure of macrophages to low-dose gadolinium-based contrast medium: impact on oxidative stress and cytokines production. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 2018, n. p. 2-10, 2018.
- YU, L.; LIOU, I. W.; BIGGINS, S. W.; YEH, M.; JALIKIS, F.; CHAN, L. N., BURKHEAD, J. Copper deficiency in liver diseases: A case series and

pathophysiological considerations. **Hepatology Communications**, v. 3, n. 8, p. 1159-1165, 2019.

- ZHANG, C., WANG, N., XU, Y., TAN, H. Y., LI, S., & FENG, Y. Molecular mechanisms involved in oxidative stress-associated liver injury induced by Chinese herbal medicine: An experimental evidence-based literature review and network pharmacology study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2745, 2018.
- ZHANG, R.; LIUB, Y.; XINGB, L.; ZHAOB, N.; ZHENG, Q.; , LIB, J.; BAOA, JUN. The protective role of selenium against cadmium-induced hepatotoxicity in laying hens: expression of Hsps and inflammation-related genes and modulation of elements homeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 159, p. 205-212, 2018.
- ZHENG, J.; YU, L.; CHEN, W.; LU, X.; FAN, X. Circulating exosomal microRNAs reveal the mechanism of *Fructus meliae* Toosendan-induced liver injury in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.

7. ANEXOS

Tabela 1. Efeitos de diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro - BGE) sobre parâmetros biométricos e hepáticos de camundongos adultos.

	Controle	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE D 200mg/kg
Peso Corporal (g)	40,45±1,46 ^ε	42,04±1,63 ^a	37,78± 4,18 ^b	38,47±0,58 ^a	35,32±0,86 ^b
Peso fígado (g)	2,20±0,03 ^ε	2,29±0,14 ^a	2,02± 0,24 ^b	1,75±0,90 ^a	1,63±0,21 ^b
Volume do Fígado (mL)	1,91±0,02 ^ε	1,95±0,18 ^a	1,67±0,03 ^b	1,81±0,11 ^a	1,42± 0,16 ^b
IHS (%)	5,44±0,17 ^ε	5,44±0,17 ^a	5,36±0,37 ^a	5,42± 0,64 ^a	3,89±0,49 ^b
Componente de água (mL/g)	33,85±2,27 ^ε	39,05±7,91 ^a	34,10±2,95 ^a	33,16±1,56 ^a	40,60±2,66 ^a

IHS: Índice Hepatossomático. Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d).

Tabela 2. Morfometria hepática de animais expostos a diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro - BGE).

	Controle	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kg D
% Citoplasma	77,48±2,70 ^a	66,72±3,03 ^b	63,81±3,57 ^b	65,58±2,95 ^b	64,30±5,26 ^b
% Núcleos	5,76±0,41 ^a	7,97±0,43 ^b	11,01±0,51 ^b	9,71±1,77 ^b	11,61±3,18 ^b
% Hepatócitos	83,24±2,68 ^a	74,69±3,10 ^b	74,82±3,36 ^b	75,29±1,46 ^b	75,91±7,29 ^b
% Hepatócitos binucleados	1,05±0,37 ^a	1,74±0,85 ^a	1,67±0,47 ^a	1,66±0,30 ^a	1,35±0,32 ^a
% Capilares sinusoides	9,27±1,76 ^a	12,27±4,62 ^a	15,34±6,64 ^a	13,87±1,60 ^a	13,45±1,18 ^a
% Gotículas lipídicas	4,21±2,57 ^a	5,12±3,01 ^a	3,76±1,07 ^a	5,05±1,91 ^a	6,36±4,07 ^a
% Vasos sanguíneos	0,31±0,19 ^a	0,39±0,24 ^a	0,19±0,14 ^a	0,55±0,36 ^a	0,41±0,67 ^a
% Macrófagos	1,97±0,54 ^a	2,56±0,61 ^a	3,59±0,49 ^b	2,76±0,53 ^a	5,12±1,26 ^b
Volume Citoplasma	1,48±0,04 ^a	1,30±0,16 ^b	1,06±0,07 ^b	1,18±0,08 ^b	0,91±0,08 ^b
Volume Nuclear	0,11±0,01 ^a	0,16±0,02 ^b	0,18±0,01 ^b	0,18±0,04 ^b	0,16±0,03 ^b
Volume Hepatócito	1,59±0,04 ^a	1,46±0,17 ^b	1,25±0,06 ^b	1,36±0,08 ^b	1,07±0,09 ^b
Volume Capilares sinusoides	0,18±0,04 ^a	0,24±0,10 ^a	0,26±0,11 ^a	0,25±0,02 ^a	0,19±0,03 ^a
Volume Vasos sanguíneos	0,006±0,004 ^a	0,008±0,005 ^a	0,003±0,002 ^a	0,010±0,006 ^a	0,006±0,011 ^a
Volume Macrófagos	0,042±0,001 ^a	0,044±0,007 ^a	0,032±0,001 ^b	0,038±0,005 ^a	0,023±0,005 ^b

Controle: (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontínuas de BGE 3-3d).

Tabela 3. Estereologia hepática de animais expostos a diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro - BGE).

	Controle	BGE 100mg/kg	BGE 200mg/kg	BGE 400mg/kg	BGE 200mg/kg D
Diâmetro de hepatócito	7,13±0,48 ^a	7,73±0,79 ^a	7,70±0,30 ^a	8,28±1,27 ^a	8,39±0,41 ^a
Volume núcleo de hepatócito (µm³)	191,57±40,05 ^a	247,65±76,53 ^a	239,80±27,34 ^a	315,29±150,10 ^a	310,32±43,94 ^a
Volume citoplasma de hepatócito (µm³)	2574,38±504,47 ^a	2101,47±739,99 ^a	1395,86±221,98 ^b	2116,50±794,30 ^a	1773,09±354,25 ^a
Volume hepatócito (µm³)	2765,94±542,04 ^a	2349,12±815,79 ^a	1635,66±244,58 ^a	2431,79±920,85 ^a	2083,41±369,51 ^a
Volume hepatócito / órgão	0,030±0,001 ^a	0,029±0,006 ^a	0,021±0,001 ^b	0,025±0,003 ^b	0,015±0,003 ^b
RNP	0,56±0,08 ^a	1,44±0,19 ^a	3,02±0,56 ^b	2,32±0,94 ^b	3,39±1,73 ^b
Número de hepatócito/ órgão	11,3±1,8 ^a	13,5±5,5 ^a	12,9±1,5 ^a	11,4±4,4 ^a	7,58±2,18 ^a

Relação nucleocitoplasmática (RPN). Controle (Água); BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), BGE 200mg/kg D (doses descontinuas de BGE 3-3d).

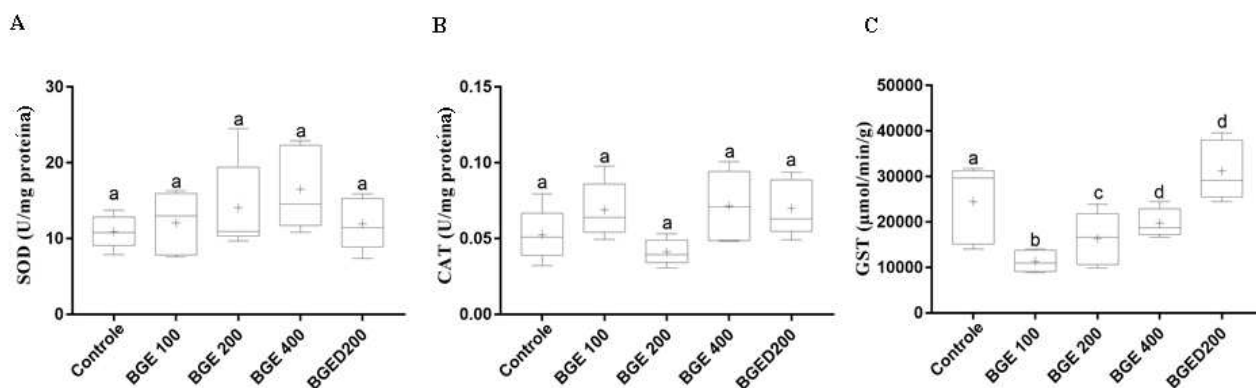


Figura 1. Efeitos de diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro - BGE) sobre enzimas antioxidantes do fígado. Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathiona S-transferase (GST). Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias.

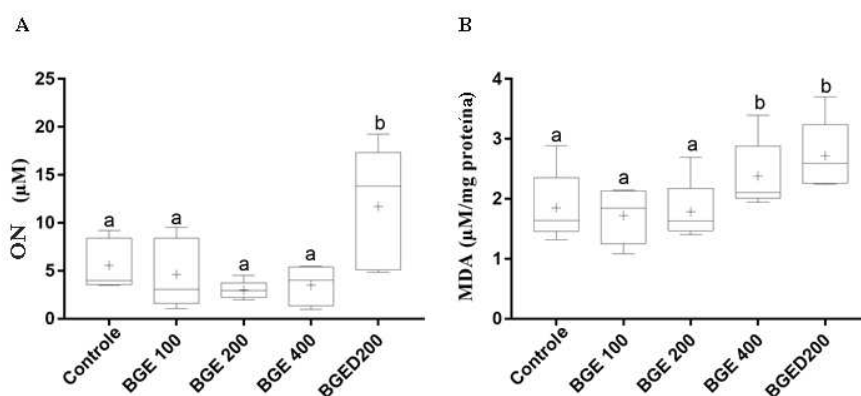


Figura 2. Efeitos de diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro -BGE) BGE sobre marcadores de estresse oxidativo do fígado. Óxido nítrico (ON), Malondialdeído (MDA). Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias.

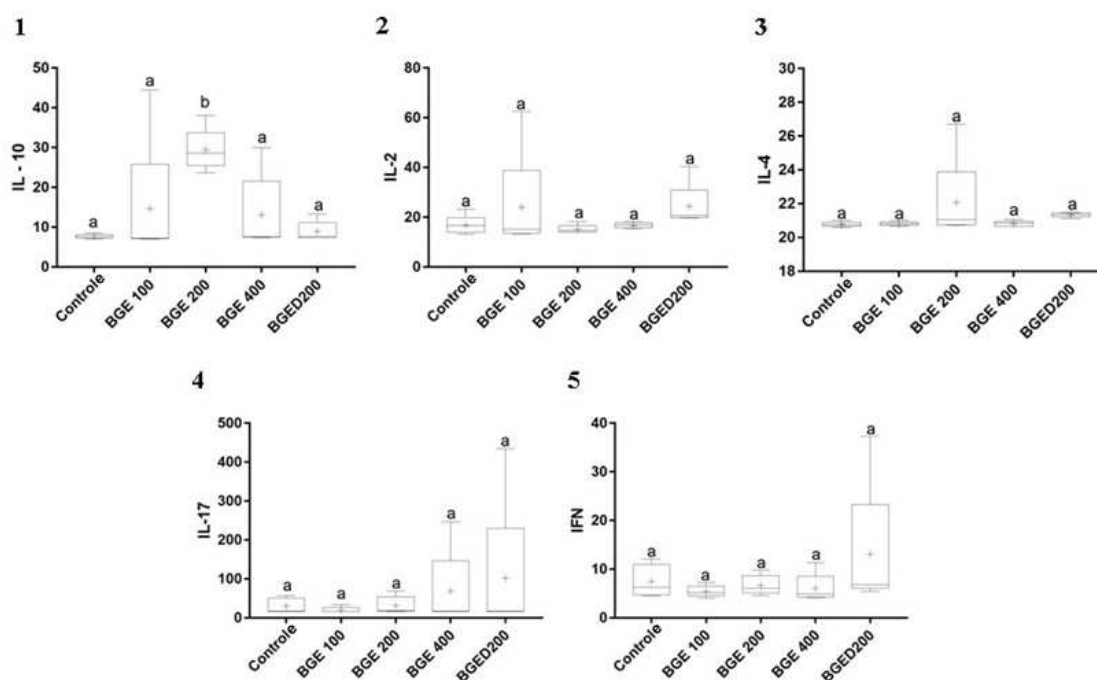


Figura 3. Efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* (extrato de ginseng brasileiro - BGE) sobre a concentração das citocinas inflamatórias (pg/ml) no tecido hepático de camundongos adultos. Interleucinas (IL), Interferon (IFN). Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias.

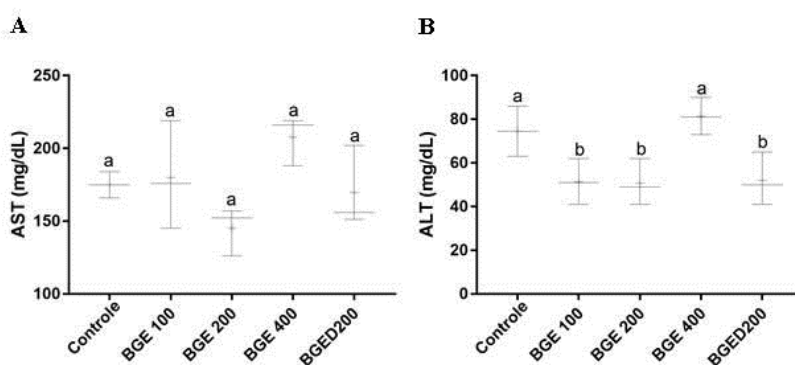


Figura 4. Efeitos de diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de ginseng brasileiro - BGE) sobre proteínas hepáticas. Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias. Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT).

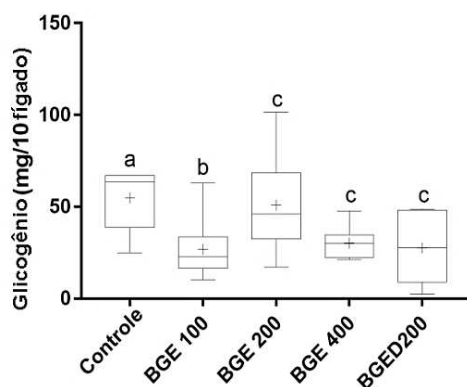


Figura 5. Efeitos de diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro - BGE) sobre os níveis de glicogênio hepático tecidual. Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias.

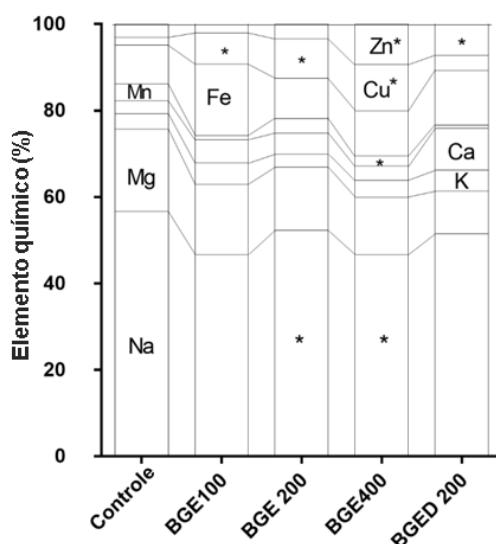


Figura 6. Proporções de minerais no fígado após tratamento extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro - BGE). Sódio (Na), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Ferro (Fe), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Potássio (K), Cálcio (Ca). Asterisco (*) indica diferença significativa $p < 0,05$ entre grupos tratados em relação ao controle. Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias.

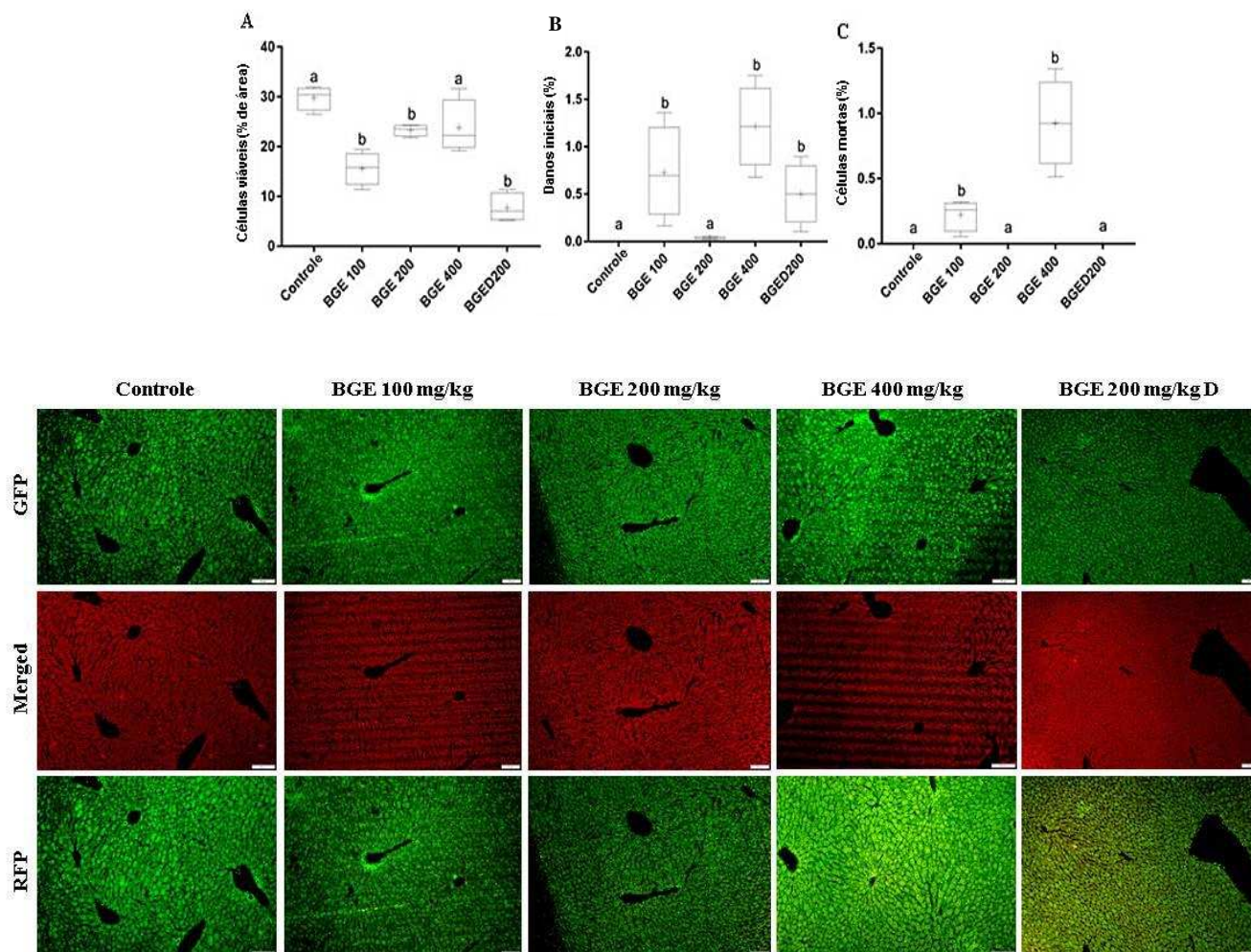


Figura 7. Viabilidade celular hepática após tratamento com extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (extrato de *ginseng* brasileiro BGE). **A e GFP:** Células viáveis; **B e Merged (Sobreposição das imagens):** Células com lesões membranares iniciais; **C e RFP.** Células em processo de morte celular por apoptose (alteração irreversível). Controle: água; tratados: doses diárias de BGE 100, 200 e 400 m/kg, respectivamente; BGED 200: dose descontínua de 200 mg/kg em intervalos de 3 dias. Filtro GFP (50 nm); Filtro RFP (580nm); Merged; Núcleos verdes - Células viáveis; Núcleos amarelos - células com processo inicial de morte; Núcleos vermelhos - Células mortas. Barra=50 μ m.

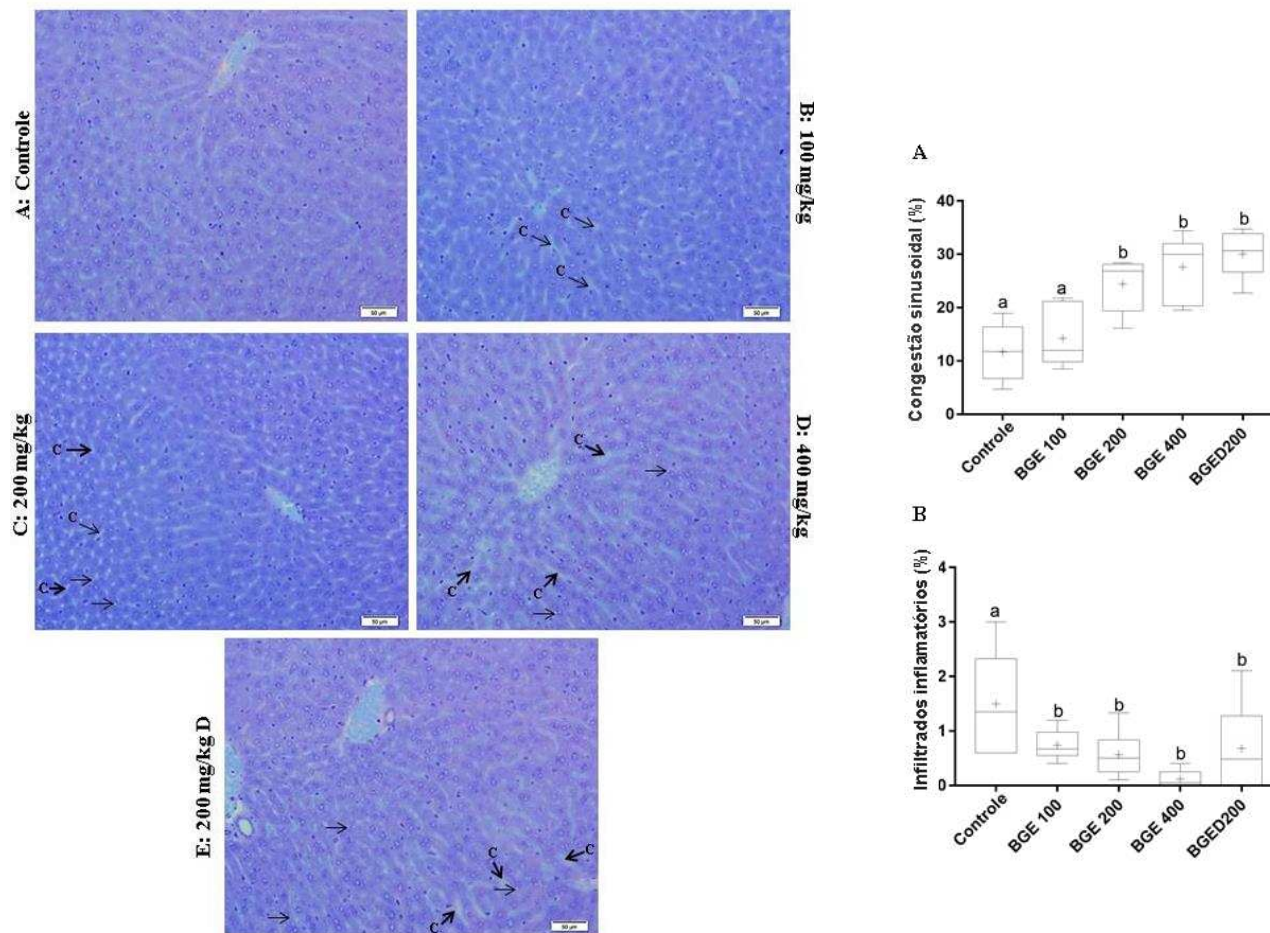


Figura 9 (À direita). Fotomicrografias hepáticas identificando patologias encontradas após exposição a diferentes doses do extrato de *Pfaffia glomerata* (extrato de ginseng brasileiro - BGE). Gotículas lipídicas (setas finas), congestão dos capilares sinusoides (cabeças de seta grossas). A: Controle (Água); B, C e D respectivamente: BGE 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias de BGE), E: BGE 200 D mg/kg (doses descontinuas de BGE 3- 3d). Comprimento das barras: 50µm. Aumento: 20 x.