

## ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DE TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* MILL (FABACEAE)

Tainá Maria Santos da Silva<sup>1</sup>; Sônia Pereira Leite<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas- CCB – UFPE; E-mail: taina\_mariaa@hotmail.com; <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Histologia e Embriologia– CCB – UFPE. E-mail: spleite6@hotmail.com

**Sumário:** *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos. O objetivo deste trabalho foi investigar a histomorfometria dos núcleos dos hepatócitos de camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento sub-crônico com extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*. Camundongos, machos, adultos-jovens, 60 dias de idade, pesando em média 30 a 40g, foram divididos em três grupos de seis animais: G1- paracetamol (500 mg/kg), G2 - silimarina (25 mg/kg) e G3 - tratados com extrato metanólico (50 mg/kg). Durante o tratamento, os animais foram pesados, e no oitavo dia foram eutanasiados por deslocamento cervical e fragmentos de tecidos hepático dos grupos foram fixados em álcool 70% e corados através da técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.). A observação histológica das preparações e obtenção das fotomicrografias (aumento final 790 $\mu$ m) foi realizada através do microscópio óptico com câmera acoplada. A análise histomorfométrica das áreas e perímetros dos núcleos dos hepatócitos foi realizada usando o software IMAGEJ. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,001$ ), dados foram representados pela média e desvio padrão. A análise histomorfométrica apresentou o seguinte resultado: grupo controle positivo G2-silimarina ( $0,094 \pm 0,027$  e  $1,02 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) quando comparado com G3-extrato ( $0,106 \pm 0,025$  e  $1,145 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) não mostraram diferença estatística significativa. Por outro lado o grupo negativo G1/paracetamol ( $0,249 \pm 0,205$  e  $1,650 \pm 0,670 \mu\text{m}$ ) quando comparado com G2-silimarina ( $0,094 \pm 0,027$  e  $1,02 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) e G3-extrato ( $0,106 \pm 0,025$  e  $1,145 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) apresentaram diferença estatística significativa. Os resultados mostraram que após o tratamento sub-crônico com o extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* na dose de 50 mg/kg (ip) não mostrou alteração da arquitetura do tecido hepático o que sugere seu uso como uma agente hepatoprotetor alternativo.

**Palavras-chave:** *Indigofera suffruticosa*; Hepatócitos; Fígado.

### INTRODUÇÃO

A *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos, sem relatos de efeitos colaterais nocivos ao ser humano. Os estudos farmacológicos mostraram que extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* apresentam atividades: antiinflamatória (LEITE et al., 2003), antiparasitaria (LEITE et al, 2003), embriotóxica (LEITE et al, 2004) antimicrobiana (LEITE et al, 2006), antitumoral (VIEIRA et al, 2007), citotóxica (VIEIRA et al, 2007) embriotóxica sobre ovos e larvas de *Aedes egypti* (VIEIRA et al, 2011), repelente nos mosquitos de *Aedes egypti* (VIEIRA et al, 2011). Estudo farmacognóstica com a mesma espécie Vieira (2011) identificou, isolou e quantificou três Alcaloides Bis – indólicos; Indican, índigo e indirubina que estão sendo submetidas a testes farmacológicos (embriotoxicidade e oviposição). Recentemente foram realizados estudo com a mesma espécie na atividade hepatoprotetora em camundongos portadores de sarcoma 180

submetido ao tratamento sub-cronico com Indican composto isolado (LIMA et al, 2014), resposta hepática em camundongos portadores de sarcoma 180 submetido ao tratamento sub-cronico com extrato obtido por infusão e maceração (SILVA et al, 2014) e Analise histomorfometrica dos tecidos renais de camundongos submetidos a tratamento com extrato metanolico *Indigofera suffruticosa* (SANTANA et al, 2015). A proposta deste trabalho foi investigar o tecido hepático de camundongos submetido ao tratamento sub-cronico com o extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*, dando assim maior embasamento científico à sua utilização.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Dezoito camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), machos, adulto-jovens, 60 dias de idade, pesando em média 30 a 40g, foram divididos em 3 grupos de 6 animais: G1- controle negativo/paracetamol (500 mg/kg), G2 - controle positivo/silimarina (25 mg/kg), e G3 tratados com extrato metanolico de folhas de *I. suffruticosa* (50 mg/kg). Durante o tratamento, os animais foram pesados, e no oitavo dia foram eutanasiados por deslocamento cervical e fragmentos dos tecidos hepático dos grupos analisados foram fixados em álcool 70% e corados através da técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.). A observação histológica das preparações e a obtenção das fotomicrografias foram realizadas através do microscópio óptico com câmera acoplada. As imagens foram projetadas e ampliadas apresentando um aumento final de 790µm. A análise histomorfométrica das áreas e perímetros dos núcleos dos hepatócitos foi realizada usando o software IMAGEJ. Para as análises estatísticas foi aplicado o teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,001$ ), e os dados foram representados pela média e desvio padrão. Os experimentos foram realizados com a aprovação do comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), processo No 500/12, processo n° 23076.025195/2012-64 de 2012.

### RESULTADOS

Análises histomorfométrica das áreas e perímetros dos núcleos dos hepatócitos dos grupos tratados e controles negativo e positivo estão representados na Figura 1. O grupo positivo G2/silimarina ( $0,094 \pm 0,027$  e  $1,02 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) quando comparado com G3/extrato ( $0,106 \pm 0,025$  e  $1,145 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) não mostrou diferença estatística significativa. Por outro lado o grupo negativo G1/paracetamol ( $0,249 \pm 0,205$  e  $1,650 \pm 0,670 \mu\text{m}$ ) quando comparados com G2/silimarina ( $0,094 \pm 0,027$  e  $1,02 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) e G3/extrato ( $0,106 \pm 0,025$  e  $1,145 \pm 0,150 \mu\text{m}$ ) mostraram diferença estatística significativa.

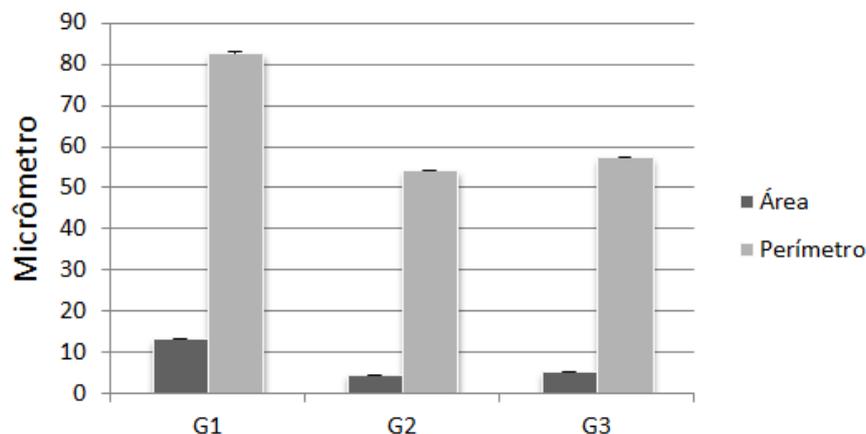


Figura 1. Histomorfometria das áreas e perímetros dos núcleos de hepatócitos de camundongos. G1/ paracetamol (500 mg/kg i.p); G2/silimarina (25 mg/kg i.p.); G3/extrato (50 mg/kg i.p.) Os dados estão expressos em média e desvio padrão e foram analisados através do Kruskal-Wallis ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

Observações histológicas são importantes ferramentas para detectar alterações morfológicas no fígado causado por compostos bioativos. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram potente ação hepatoprotetora do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*. O extrato detém a mesma intensidade da ação da silimarina. A histomorfometria das áreas e perímetros dos núcleos dos hepatócitos de camundongos após o tratamento sub-crônico com extrato metanólico foi similar quando comparado com a silimarina. O extrato e a silimarina não apresentou diferença estatística significativa. Nesse estudo o efeito protetor do tecido hepático de camundongos submetido ao tratamento com extrato foi dose (50 mg/kg i.p) dependente e semelhante aquela promovida pela silimarina droga padrão utilizada na dose (25 mg/kg i.p) esse resultado corrobora com o encontrado por Leite et. al, (2003) que demonstrou que o extrato aquoso de *I. suffruticosa* é similar ao observado com administração de ácido acetil salicílico, droga padrão utilizada na atividade antiinflamatória. Os núcleos dos hepatócitos após o tratamento sub-crônico com o extrato e a silimarina mostraram uma diferença significativa quando comparado com o paracetamol. A propriedade hepatoprotetora resultante desta pesquisa é similar a encontrados por Silva et al (2014) que demonstrou que o extrato de *I. suffruticosa* após o tratamento sub-crônico preserva a estrutura do tecido hepático. Estudos com a mesma espécie demonstraram atividade hepatoprotetora em camundongos portadores de sarcoma 180 submetido ao tratamento sub-crônico com Indican composto isolado (LIMA et al, 2014). Trabalho descrito por Leite et al (2003) que utilizou o mesma espécie demonstrou que extrato aquoso de folhas *I. suffruticosa* possui baixa ordem de toxicidade. Na atividade toxicológica a DL<sub>50</sub> não foi determinada, e o extrato pode ser considerado praticamente atóxico. O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nas diferentes doses de 300 a 2.000 mg/kg i.p. não provocou índice de mortalidade durante as 72 horas de observação no ensaio preliminar. Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato metanólico obtido por infusão não induz nenhuma alteração nos tecido hepático de camundongos sugerindo uma baixa ordem de efeito tóxico. Esta condição sugere estudos adicionais na investigação de compostos químicos isolados da espécie na avaliação de tratamento de outros tecidos e órgãos.

## CONCLUSÃO

O tratamento sub-crônico com o extrato metanólico obtido por infusão de folhas de *I. suffruticosa* na dose de 50 mg / kg (ip) não mostrou alterações histológicas nos núcleos dos hepatócitos dos camundongos.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

LIMA, I. R.; VIEIRA, J. R. C.; SILVA, I. B.; Leite, R.M.P.; Leite, Sônia Pereira. Indican from Anil (*Indigofera suffruticosa* Miller): An herbal protective agent in liver. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 36, p. 23-28, 2014.

LEITE, S.P; VIEIRA, J.R.C; LEITE, R.M.P. “Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 261–265. 2006.

Leite, S. P.; Lima, E. O.; Lima, V.M.L ; SILVA, E. C.; MEDEIROS, P. L. Embryotoxicity in vitro extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.), **Reproductive Toxicology**, v. 18, n.05, p. 701-702, 2004.

Leite, S. P.; SILVA, L. L. S. Anti-inflammatory Activity of *Indigofera suffruticosa* Extract. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Paraíba, v. 7, p. 47-52, 2003.

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

LEITE, P.L.; SILVA, L.L.S.; CATANHO, M.T.J.A.; LIMA, E.O.; LIMA, V.L.M. Atividade Antiinflamatória do Extrato de *Indigofera suffruticosa*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.7, n.1, p.45-52, 2003.

LEITE, S.P; MEDEIRO, P.L.; SILVA, E.C.; MAIA, M.B.S.; LIMA, V.L.M.; SAUL, D.E. Estudo Embriotoxicidade de *Indigofera suffruticosa* Miller em Camundongos Albinos suíços. XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Cuiabá, Resumo MT. FT, 226, 2002.

LEITE, S.P.; SILVA, E.C.; CASSILHAS, A.P.P.; TORQUATO, G.N.; SILVA, L.L.S.; MEDEIROS, P.L.; ANDRADE, C. R.; ANDRADE, P.P. Atividade Antiparasitária de Frações Aquosas de *Lonchocarpus araripenses* (Papilionaceae) e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). 55ª Reunião Anual da SBPC – Resumo 4694 C 13.4 Recife, 2003.

SANTANA, M.A.N.; SILVA, I. B.; LIMA, I. R.; VIEIRA, J. R. C.; Leite, R.M.P.; Leite, S. P. . Histomorphometric analysis in kidney tissue of mice treated with *Indigofera suffruticosa mill*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 12-18, 2015.

SILVA, I.B.; LIMA, I.R.; SANTANA, M.A.N.; Leite, R.M.P.; Leite, S. P. *Indigofera suffruticosa Mill* (fabaceae): hepatic responses on mice bearing Sarcoma 180. **International Journal of Morphology (Online)**, v. 01, p. 01-10, 2014.

VIEIRA, J.R.C.; SOUZA, I.A.; NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. **eCAM**, p.1-5. 2007.

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

VIEIRA, J.R.C., SOUZA, I.A.; NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P.; Antitumoractivity of *Indigofera suffruticosa* An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb., Recife, v.52 (2), 2007 – 113.

VIEIRA, J.R.C.; Leite R.M.P.; LIMA, I.R I.A.; NAVARRO, D.A.F.; BIANCO, E.M. NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P. Oviposition and Embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on Early Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2012, Article ID 741638, 6 pages.