

ESTUDO DA AÇÃO HEPATOPROTETORA DO LYCOPODIUM CLAVATUM 30 CH EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA POR PARACETAMOL EM RATOS

Matheus Arnosti Landi
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Centro de Ciências da Vida
matheus.al@puccampinas.edu.br

Gustavo Henrique da Silva
Obtenção e aplicações de insumos de origem vegetal e animais em alimentos, fitoterápicos e cosméticos
Centro do Ciências da Vida
gustavohs@puc-campinas.edu.br

Resumo: a patogênese de *Lycopodium* descreve ação insuficiência hepática e litíase biliar, sendo considerado um medicamento eficaz para o tratamento de alterações hepáticas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de *Lycopodium clavatum* 30CH (Lyc) como um hepatoprotetor em lesão hepática induzida experimentalmente por Paracetamol (PCT) em ratos Wistar. Para a realização do experimento, 30 animais foram utilizados, subdivididos em 02 grupos, sendo que os animais do grupo "tratado", foram submetidos a 08 dias de pré-tratamento com *Lycopodium* 30 CH (5 gotas / dia) e no dia 8 sofreu intoxicação com altas doses de Pct (3g/kg). Após 24 horas e 72 horas, os animais foram eutanasiados para a coleta de amostras de tecido e sangue. Posteriormente, a dosagem sérica de enzimas indicativas de lesão hepática (AST e ALT) e da análise histológica e morfométrica do fígado foram realizadas. A dosagem das enzimas hepáticas revelou que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de ALT no grupo de 24 horas em relação ao grupo de controle não sendo as diferenças observadas em AST. As análises morfométricas mostraram que LYC houve diminuição significativa do número de zonas acinares 1 afetados, pela presença de infiltração inflamatória e necrose, inibiu a depleção de 1,2-glicóis (glicogênio) causadas pelo super-dosagem de PCT em 80% na zona 3 dos animais do grupo de 72h. Concluiu-se que o pré-tratamento com Lyc apresenta ação hepatoprotetora minimizando a lesões hepáticas causadas por doses elevadas de Pct, no entanto, é provável que, com a administração durante períodos mais longos, melhores resultados podem ser obtidos.

Palavras-chave: paracetamol, hepatoprotetora, *Lycopodium*

Área do Conhecimento: Farmácia

1. INTRODUÇÃO

Define-se hepatite tóxica como a lesão hepática causada por inalação, ingestão ou administração paren-

térica de agentes farmacológicos ou químicos. É um problema relevante na prática clínica atual, correspondendo a cerca de 0,2% de todas as internações hospitalares e a 2 a 3% de internações por efeitos adversos de [15].

Para a lesão celular metabólica dos hepatócitos, vários são os mecanismos de agressão: ligação covalente a estruturas celulares, peroxidação lipídica, reações de oxidação, depleção de glutatión, sendo que estas agressões celulares podem resultar alterações mitocondriais, alterações no citoesqueleto celular ou alterações da homeostase iônica. Dependendo da extensão do envolvimento mitocondrial e do balanço de fatores ativadores/inibidores de vias intracelulares de sinalização, o destino da célula poderá ser a necrose ou a apoptose, sendo a primeira situação geradora de mecanismos inflamatórios. Como continuidade do processo, os hepatócitos lesados podem liberar produtos de peroxidação lipídica, intermediários reativos de oxigênio e IL 8, ativando por estes meios as células de Kupffer. Estas liberam diversas citocinas tais como TNF, IL 1, IL 8 e incremento na quantidade de intermediários reativos de oxigênio, que podem lesar diretamente os hepatócitos e ativar outras células como as células de Ito, responsáveis pelo início da fibrose hepática, e as células endoteliais dos vasos sanguíneos, que favorecem o recrutamento e ativação de polimorfonucleares. Sequencialmente pode ocorrer à ativação de mecanismos imunes devido à formação de metabolitos tóxicos que pode conduzir a ligações covalentes com estruturas celulares, formando um hapteno, que é apresentado pelas células macrofágicas aos linfócitos. Estes desencadeiam uma resposta imune direcionada quer aos haptenos (auto-modificados) quer mesmo a estruturas celulares íntegras, tendo-se verificado experimentalmente respostas tão seletivas como a produção de auto-anticorpos contra isoenzimas do Citocromo P450 que dão origem ao metabolito [17, 05, 13].

O Paracetamol, acetaminofeno (como é designado nos EUA) ou N-acetil-p-aminofenol é um metabólito ativo da fenacetina, analgésico derivado do alcatrão e um dos fármacos mais extensamente utilizados como analgésico e antipirético. Nos EUA e Reino Unido o paracetamol é a principal causa de falência hepática fulminante, principalmente na superdosagem acidental e intencional, sendo também o principal medicamento implicado e óbitos relatados nos centros de intoxicação nos modelos experimentais que utilizam intoxicação por paracetamol tem sido amplamente utilizados para avaliar hepatoproteção de drogas e compostos vegetais: Oyagbemi e Odetola [18] verificaram a atividade do extrato de *Cnidocolusaconifolius*, Acharya e Lau-cam [01] realizaram estudo comparativo entre a ação da N-Acetilcisteína, Hipotaurina e Taurina, Jambaz e colaboradores [12] investigaram ação da rutina, Echard e colaboradores [09] avaliaram a ação de um grupo de ervas medicinais, entre outros.

O tratamento homeopático pode ser utilizado nos mais variados tipos de doenças, sendo que nas últimas décadas, experimentos em modelos animais são realizados visando sistematização da terapia e comprovação de sua ação em tipos específicos de alterações orgânicas. Na hepatologia, os primeiros estudos neste sentido foram realizados por Bildet et al,[03], verificando a ação positiva do Phosphorus 7CH e 15CH sobre a hepatite tóxica induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos. Moncorvo e colaboradores[16] realizaram estudo semelhante em coelhos, verificando melhora significativa dos animais intoxicados para dinamização 30CH de CCl₄, porém sem efetividade para o Phosphorus 30CH.

O *Lycopodium clavatum* é um polícresto, ou seja, apresentam ampla indicação em vários tipos de doença, inclusive em alterações hepáticas, teve sua experimentação patogênica realizada pelo próprio Hahnemann em 1828, sendo que as partes utilizadas para o preparo da tintura-mãe são os esporos secos ou mesmo pólen seco do vegetal. Dada a sua importância a patogênese desse medicamento foi descrita em inúmeras matérias medicas homeopáticas [21].

O medicamento *Lycopodium Segundo Cairo*[06] o *Lycopodium* tem ação no fígado preguiçoso nas veias congestões hepáticas sendo muito útil nas moléstias do fígado, cirrose atrofica do fígado com ascite hidropisias e icterícia. Cornillot [08] atribui ao *Lycopodium* uma ação hepatobiliar devido a seu tropismo hepático.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a efetividade do *Lycopodium clavatum* 30 CH como hepatoprotetor em lesão hepática produzida experimentalmente pelo Paracetamol em ratos Wistar, analisando as alterações histológicas, morfométricas e enzimáticas no fígado.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, não isogênicos, fornecidos pós-desmame com 50 dias de idade pelo Biotério do Campus II da PUC Campinas.

Os animais foram alojados no Biotério e/ou no Laboratório Técnica Operatória e Cirurgia Experimental no Centro de Ciências da Vida, PUC-Campinas, com luz e ventilação controladas, com fornecimento de ração sólida Nuvilab e água sem restrição até atingirem a idade de 60 dias.

Em todo o período do experimento os animais não foram submetidos a condições de estresse ou qualquer tipo de sofrimento. Não houve restrição de água ou alimento. Foram observados e cumpridos os “Princípios éticos para uso de laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (disponível em www.cobea.org.br).

3.2 Organização dos grupos experimentais

O experimento foi conduzido dividindo-se os animais em 06 grupos. Todos os grupos foram compostos por 05 animais, escolhidos de forma aleatória, e em seguida pesados para cálculo do volume de paracetamol administrado. Os grupos estão descritos abaixo:

Subgrupo *Lycopodium*+paracetamol 24 h (LyP24): receberam o preparado de *Lycopodium* 30ch uma vez ao dia por 8 dias sendo que no 8 dia foi administrado paracetamol na dose de 3g/Kg, e eutanasiados após 24 horas.

Subgrupo *Lycopodium*+paracetamol 72 h (LyP72): receberam o preparado de *Lycopodium* 30ch uma vez ao dia por 8 dias sendo que no 8 dia foi administrado paracetamol na dose de 3g/Kg, e eutanasiados após 72 horas.

Subgrupo controle negativo 24 h (CN24): receberam solução salina por 8 dias e eutanasiados após 24 horas.

Subgrupo controle negativo 72 h (CN72): receberam solução salina uma vez ao dia por 8 dias e eutanasiados após 72 horas.

Subgrupo controle positivo 24 h (CP24): receberam solução salina uma vez ao dia por 8 dias, sendo que no 8 dia foi administrado paracetamol na dose de 3g/kg, e eutanasiados após 24 horas.

Subgrupo controle positivo 72 h (CP72): receberam solução salina uma vez ao dia por 8 dias, sendo que no 8 dia foi administrado paracetamol na dose de 3g/kg, e eutanasiados após 72 horas.

A dose de Paracetamol foi estabelecida conforme protocolo de OYAGBEMI e ODETOLA (2010). Todos os animais receberam gavagem intragástrica por meio de uma seringa e uma cânula adaptada.

3.3 Eutanásia dos animais e coleta do material biológico

Passados os períodos conforme descrito acima, os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (sedativo) e xilazina (relaxante muscular). Após a sedação de cada animal, era realizada incisão na região torácica para acesso ao ventrículo cardíaco esquerdo e era feita uma punção do coração para coleta do sangue, sendo retirado 2 fragmentos de fígado. O sangue era armazenado, por pelo menos 2 horas, e centrifugado, para obtenção do soro, utilizado para análise bioquímica de fosfatase alcalina, transaminases (ALT e AST), e Gama glutamyltransferase (GGT). Os fragmentos extraídos foram fixados em formol a 10% para fins de análise histológicas e morfométricas.

3.4 Processamento Histológico

Para análise histológica e morfométrica, todos os fragmentos de fígado foram submetidos ao processamento histológico padrão para obtenção de cortes de 7 micrômetros de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina, Sirius Red e Ácido Periódico de Schiff. As lâminas histológicas confeccionadas foram examinadas ao microscópio de luz e suas imagens capturadas digitalmente. Para cada um dos grupos foi avaliado o tipo e a intensidade das lesões hepáticas, observando-se a presença de esteatose, fibrose e necrose.

3.5 Dosagem das Transaminases Hepáticas, Fosfatase Alcalina e Gama Glutamil Transferase

Após a coleta do sangue, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, separando-se então o soro dos demais componentes. Partindo do

soro, foram quantificados as enzimas Alanina-Aminotransferase (ALT) e Aspartato-Aminotransferase, Fosfatase Alcalina (FALc) e Gama Glutamil Transferase (GGT) uma vez que estas são indicadoras de dano hepatocelular. A análise foi realizada por método cinético-colorimétrico com leitura em espectrofotômetro UV, conforme as especificações contidas nos kits enzimáticos.

3.6 Análise dos resultados

Para a avaliação da necrose, houve determinação do número de veias centrolobulares (vcl) e espaços porta (ep) afetadas pela lesão nas lâminas coradas em HE. Para avaliação de fibrose, 20 micrografias de região centrolobular e 20 micrografias de região portal das lâminas coradas em Sirius Red foram analisadas utilizando-se o software AreaMed, mensurando-se a área comprometida por fibrose. Para avaliação da distribuição do glicogênio e outros 1,2-glicóis, realizou-se uma avaliação qualitativa das lâminas coradas em PAS, comparando-se os animais tratados com os grupos controles negativo e positivo.

A análise estatística das avaliações quantitativas foi realizada no programa Prisma 3.0. A diferença entre os grupos foi comparada por ANOVA seguido do teste de Bonferroni, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Os resultados foram tabulados usando-se o software Microsoft Excel 7.0 e analisados estatisticamente no programa Prisma 3.0. A diferença entre os grupos também foi comparada por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A coloração por Hematoxilina-Eosina permitiu a identificação de estruturas tissulares, células, inclusões e alterações histopatológicas. Após a observação das amostras do Grupo CP foi verificado que não havia incidência de esteatose, mas fibrose e necrose com infiltração de polimorfonucleados. A necrose foi observada predominantemente na região centrolobular, sobretudo, nos animais de 72 h. Esta constatação direcionou para a quantificação dos focos inflamatórios/necróticos nesta região.

Nas lâminas coradas em Sirius Red, foi verificado que o colágeno estava mais presente nas zonas acinares 1 e 3, e desta forma a quantificação foi realizada nestas regiões. Em todos os grupos a deposição

de colágeno foi bastante discreta, inclusive bastante próxima aos animais do grupo CN.

Tabela 1: Resultados da dosagem sérica das transaminases, fosfatase alcalina e γ -Glutamyltransferase. Valores expressos em U/L \pm erro padrão (n=4). ANOVA seguido do teste de Bonferroni, * p<0,001 em relação aos respectivos grupos CP.

GRUPOS	24h	72h
AST		
Controle Negativo	89,2 \pm 7,6	88,5 \pm 5,3
Lycopodium-Paracetamol	1123,2 \pm 272,9	312,01 \pm 132,3
Controle Paracetamol	1449,2 \pm 306,9	179,6 \pm 34,3
ALT		
Controle Negativo	39,3 \pm 2,3	51,8 \pm 5,5
Lycopodium-Paracetamol	901,0 \pm 92,0	112,0 \pm 56,7
Controle Paracetamol	1866,2 \pm 585,4	194,7 \pm 56,0
Fosfatase Alcalina		
Controle Negativo	65,7 \pm 5,3	82,9 \pm 19,6
Lycopodium-Paracetamol	58,6 \pm 4,0	64,7 \pm 6,2
Controle Paracetamol	83,6 \pm 9,1	34,5 \pm 2,7
GGT		
Controle Negativo	5,4 \pm 1,8	5,3 \pm 0,3
Lycopodium-Paracetamol	15,4 \pm 7,4	5,35 \pm 0,6
Controle Paracetamol	5,5 \pm 0,9	4,6 \pm 0,8

Ao analisar as secções coradas em PAS, pode-se verificar que os animais tratados somente com paracetamol apresentaram uma deposição discreta ou intensa nas inclusões PAS positivas na região na zona acinar 01 (espaço porta) e depleção deste nas zonas 03 conforme pode ser observado na figura 06. Verificou-se que nos grupos de Lycopodium+Paracetamol houve a preservação na distribuição da coloração PAS positivas, obtendo assim 80% de redução de lesão no grupo de 72h, indicando então a atividade hepatoprotetora do Lycopodium neste parâmetro.

Com relação aos parâmetros bioquímicos, o pré-tratamento com Lycopodium clavatum 30 CH apresentou ação mais efetiva em ALT 24 horas. Na figura observa-se uma diminuição dos níveis séricos de

AST em LYP 24h e aumento em LyP 72 em comparando-se à CP 24h, porém a diferença não é estatisticamente significativa. Na Tabela 01, pode-se verificar que há diminuição significativa da enzima quando se compara LyP a CP, sobretudo no grupo de 24 horas.

Não houve alterações significativas na fosfatase alcalina e no GGT, principalmente tendo-se em vista que os grupos CP não sofreram alterações do valor normal destas enzimas.

5. DISCUSSÃO

A análise histológica foi realizada com três principais focos:

O primeiro parâmetro mostrou que o Paracetamol, na dose utilizada, provocou necrose e infiltração inflamatória hepática em todos os animais dos grupos 24 h e 72 h, porém neste último as lesões foram mais intensas. O pré-tratamento com Lycopodium clavatum 30 CH diminuiu as ações lesivas no fígado, sendo significativo em 72 horas. Esses resultados corroboram com os obtidos por Sur et al.[22] em que houve diminuição de área e número de células envolvidos em necrose dos animais tratados com Lycopodium 200 CH submetidos a intoxicação experimental com C-Cl4.

As secções coradas com Sirius Red possibilitaram a realização da quantificação das fibras colágenas na perspectiva de identificação de fibrose. Após análise computacional das imagens verificou-se que não havia diferença significativa entre os grupos, seja na zona 01 ou 03 acinares. Este resultado se justifica devido à baixa intensidade de fibras colágenas observadas e mensuradas no grupo controle positivo, o que corrobora com muitos relatos na literatura científica, que não descrevem presença de fibrose na hepatite tóxica por Paracetamol [01, 25, 02, 15]. O terceiro parâmetro histológico avaliado mostrou que os animais intoxicados com elevada dose de Paracetamol apresentaram um aumento das inclusões PAS positivas na região portal e diminuição destas na região centro-lobular quando comparados com o grupo controle negativo. A diminuição de glicogênio hepático pelo Paracetamol foi relatada por Itinose, Sakuno e Bracht [11] e está relacionada à sua ligação irreversível a um metabólito reativo ou da inibição do metabolismo energético mitocondrial. Na análise semi-quantitativa, foi possível observar que o pré-tratamento com Lycopodium clavatum 30 CH promoveu distribuição homogênea de glicogênio, em 72 horas como observado na figura 06. De certa maneira

ra a redução do glicogênio em zona 01 acinar era esperada, uma vez que nessa região se encontra em maior quantidade as enzimas do complexo P450 e conseqüentemente onde ocorrem as lesões histopatológicas relacionadas ao paracetamol.

Com relação às transaminases hepáticas, o *Lycopodium clavatum* 30 CH demonstrou baixo potencial hepatoprotetor, havendo redução significativa da ALT em Lyp 24h em relação ao grupo paracetamol 24 horas. Com relação à AST, o pré-tratamento com *Lycopodium* não produziu diminuição dos valores nos grupos LyP, como observado na. Resultados semelhantes foram obtidos por Sur et al.[22] que verificaram ausência de diminuição de AST e ALT em animais intoxicados por uma única injeção de CCl4 e duas doses de *Lycopodium* 200 CH. Entretanto verificaram que para os grupos que receberam 6 doses de tetracloreto de carbono e receberam tratamento com *Lycopodium* 200 CH por uma semana ocorreu redução significativa das transaminases.

No presente estudo, não foi verificado elevação da concentração sanguínea de fosfatase alcalina e de gama-glutamyltransferase em nenhum dos grupos, incluindo-se aqui o grupo controle positivo. A ausência de elevação de FAalc e de GGT no grupo controle positivo (e nos demais) está de acordo com os achados histológicos uma vez que não foram observadas alterações em ductos biliares na microscopia de luz, indicando assim que a hepatotoxicidade por Paracetamol seja citolítica e não colestática, conforme Matos e Martins[15].

Outros estudos também obtiveram resultados positivos para a utilização da homeopatia, e alguns mais precisamente do *Lycopodium*, em distúrbios hepáticos. Foi verificado que o *Lycopodium* 200 CH, em lesão induzida pelo tetracloreto de carbono, apresentou ação hepatoprotetora. Mais recentemente, foi observada inibição da carcinogênese, induzida por corante azo no fígado de ratos, pela administração de *Chelidonium* e *Lycopodium* [22, 04, 19].

Picciotto et al [20]descreve um caso de hepatite aguda ocasionada por *Lycopodium serratum*, com características que se assemelham bastante a hepatite fulminante induzida pelo paracetamol, ou seja elevação de transaminases hepáticas, hepatite com infiltração linfoplasmocitária moderada na região portal e fibrose portal progredindo para septos interportais. Frazier e Krueger [10] e Chitturi e Farrell [07] descrevem que há na intoxicação por esta planta a ocorrência de hepatite aguda e crônica com fibrose esteatose. Com base nestes relatos, aplicando-se a “Lei dos Semelhantes”, verifica-se que o *Lycopodium* em do-

ses diluídas apresente atividade hepatoprotetora para esta hepatotoxicose, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o *Lycopodium clavatum* 30 CH apresentou ação hepatoprotetora na intoxicação aguda por Paracetamol, evidenciada pela diminuição histológica de necrose e focos inflamatórios, preservação de glicogênio e outros 1,2 – glicóis na zona 3 em 72 horas e na redução dos níveis séricos de ALT em 24 horas.

REFERÊNCIAS

- [01] Acharya M, Lau-Cam CA. (2010) *Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat*. Journal of Biomedical Science, 17(1):S35. 3-11.
- [02] Belardinelli MC, et al. (2008) *Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats*. Toxicology, 247(1):1-5.
- [03] Bildet J, Guere JM, Saurel J, Demarque D, et al. (1984) *Etude de l'action de différentes dilutions de Phosphorussur l' hépatique toxique durat*. Homéopathie Française, 72(3-4): 199-204.
- [04] Biswas SJ, Khuda-Bukhsh A. (2004) *Evaluation of protective potentials of a potentized homeopathic drug Chelidonium majus during azo dye induced hepatocarcinogenesis in mice*. Ind J ExpBiol, 42: 698-714.
- [05] Browning DJ, Horton JD. (2004) *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J Clin Invest, 114: 147-52.
- [06] Cairo N. (2007) *Guia de medicina homeopática*. 24ª ed. São Paulo: Livraria Teixeira.
- [07] Chitturi S, Farrell GC. (2008) *Hepatotoxic slimming aids and other herbal hepatotoxins*. Gastroenterology and Hepatology Unit, Canberra, 23: 366-373.
- [08] Cornillot P. (2005) *Tratado de homeopatia*. Porto Alegre: Artmed.
- [09] Echard, BW, Talpur, NA, Fan, AY, Bagchi, D, Preuss, HG. (2001) *Hepatoprotective abil-*

- ity of a novel botanical formulation on mild liver injury in rats produced by acute acetaminophen and / or alcohol ingestion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*, 110 (1-2): 289-93.
- [10] Frazier TH, Krueger KJ. (2009) *Hepatotoxic Herbs: Will Injury Mechanisms Guide Treatment Strategies?*. Division of Gastroenterology and Hepatology, Louisville, 11: 317-324.
- [11] Itinose AM, Sakuno M.L, Bracht A. (1989) *Metabolic effects of acetaminophen. Studies in the isolated perfused rat liver.* 7(4):263-73.
- [12] Jambaz KH, Sheikh AS, Anwar HG. (2002) *Protective effect of rutin of paracetamol and CCl4 induced hepatotoxicity in rodents.* *Fito-terapia*, 73(7-8): 557-63.
- [13] Liu ZX, Kaplowitz N. (2002) *Immune-mediated drug-induced liver disease.* *Clin Liver Dis*, 6(3):467-86.
- [14] Maria VA, Victorino RM. (1994) *Hepatites medicamentosas por hipersensibilidade.* *Revista Port. Imunoalergol*, 2(3):151-8.
- [15] Matos LC, Martins B. (2005) *Hepatites tóxicas: revisão da literatura.* *Medicina Interna*, 12(4): 239-58.
- [16] Moncorvo MCR, Silva CF, Santos STA, El-Warrak AO, Sebalhos S. (1998) *Tratamento homeopático da hepatotoxicose aguda induzida por tetracloreto de carbono em coelhos.* *Ciência Rural*, Santa Maria, 28(3): 405-9.
- [17] Neil K. (2002) *Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury.* *Sem Liver Dis*, 22(2):137-44.
- [18] Oyagbemi AA, Odetola AA. (2010) *Hepatoprotective effects of ethanolic extract of *Cnidioscolusaconitifolius* on paracetamol-induced hepatic damage in rats.* *Pak J Biol Sci.*, 13(4):164-9.
- [19] Pathak S, Das JK, Biswas SJ, et al. (2006) *Protective potentials of a potentized homeopathic drug *Lycopodium-30*, in ameliorating azo dye induced hepatocarcinogenesis in mice.* *Mol Cell Biochem*, 285, 121-31.
- [20] Picciotto A, Campo N, Brizzolara R, Giusto R, Guido G, Sinelli N, Lapertosa G, Celle G. (1998) *Chronic hepatitis induced by *Jin Bu Huan*.* *Hepatology*, Munksgaard, 28:165-167.
- [21] Soares AAD. (2005) *Dicionário de medicamentos homeopáticos.* São Paulo: Santos.
- [22] Sur RK, Samajdar K, Mitra S, et al. (1990) *Hepatoprotective action of potentized *Lycopodium clavatum*.* *Br Homeopath J.* 79, 152-6.
- [23] Vannier L, Poirier J. (1997) *Tratado de Matéria Médica Homeopática.* 9ª Ed. São Paulo: Andrei.