Vânius Vinícius Dipe

Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos *Wistar*: estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual

São Paulo

2013

Vânius Vinícius Dipe

Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos *Wistar*: estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Silvana Lima Górniak

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2875
FMVZ

Dipe, Vânius Vinícius
Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos Wistar: estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual. / Vânius Vinícius Dipe. -- 2013.
110 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górniak.

1. Leucaena leucocephala. 2. Mimosina. 3. Toxicidade. 4. Ratos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos machos (Wistar) nos estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e do comportamento sexual", protocolado sob o nº 2452/2011, utilizando 120 (cento e vinte) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Silvana Lima Górniak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Evaluation of possible mimosine toxic effects in male Wistar rats in immunotoxicity, endocrine disruption and sexual behavior", protocol number 2452/2011, utilizing 120 (one hundred twenty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górniak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 30 de janeiro de 2012.

Denise Fantoni

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DIPE, Vânius Vinícius
Título: **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos *Wistar*:** estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual

.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao Deus bondoso, amantíssimo e não punitivo que me deu a vida e a alegria de viver;

Aos meus pais Elias Dipe Neto e Ana Maria Borges Dipe pelo amor incondicional;

Com muito amor e carinho ao meu filho Otávio que me alegra pelo fato de existir;

À minha mentora científica e amiga Prof.ª Dra. Silvana Lima Górniak que me proporcionou ensinamentos imensuráveis.

AGRADECIMENTOS

- À minha família: minha mãe Ana, meu pai Elias, irmã Vanessa, irmã Valéria, cunhados Chicão e Túlio, tia Amália, tia Regina, tia Lena.
- À Luciana Araújo que é um presente de Deus. Obrigado por todo o carinho, amor e compreensão.
- Ao pessoal do CEPTOX, essenciais para a realização desta tese: Adilson, André, Elaine, Ester, Estevão, Marquinhos, Paulo César (PC) e Solange.
- Aos meus irmãos científicos: Luciana Lippi, Luciana Cunha, Fabiana Elias, Andréia Latorre, Hamasato, Wanderley, Beatriz Coniceiro e Clairton Marcolongo.
- À Prof.ª Dra. Lílian Rose Marques de Sá pelas análises histopatológicas e pela amizade.
- Aos professores: Dra. Helenice de Sousa Spinosa, Dr. Luciano Freitas Felício, Dra. Célia Aparecida Paulino, Dra. Isis Machado Hueza e Dr. Heidge Fukumasu pelas sugestões de grande valor.
- À Prof.ª Dra. Cristina Massoco pelas análises de Citometria de Fluxo.
- À Dra. Mitsue Haraguchi e à Dra. Daiane Hansen pelos auxílios iniciais para a validação do protocolo para extração e isolamento da mimosina.
- A todos do *Poisonous Plant Research Laboratory* do United States Department of Agriculture, especialmente: aos pesquisadores Dr. James Alan Pfister que praticamente me “adotou” nos EUA, Edward (Ed) (pela companhia e auxílio nos experimentos); Bryan Stegelmeier, Kip Panter, Dale Gardner (pela realização dos testes para verificar o grau de pureza da mimosina),

Kermit Price, Daniel Cook, Terrie Wierenga (pelo auxílio na preparação das soluções), Jason, Joseph (pela confecção de lâminas histológicas) e Spencer.

- Ao pessoal do VPT: Cris (secretária de pós-graduação do VPT que me auxiliou muito), Herculano (laboratório), Cláudia (biotério), Nicole (laboratório).
- Aos funcionários da biblioteca pelo auxílio na finalização desta tese.
- À CAPES pelo apoio financeiro.
- A todos que ajudaram, de alguma maneira, para que esta tese fosse concluída com êxito. Obrigado, sozinho eu jamais conseguiria.

RESUMO

DIPE, V. V. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos *Wistar*:** estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual**.** [Evaluation of possible toxic effects of mimosine in Wistar rats: immunotoxicity, endocrine disruption and sexual behavior]. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A *Leucaena leucocephala*, popularmente conhecida no nosso país como leucena, é uma planta difundida por todo o mundo e utilizada como forrageira por apresentar vários nutrientes; no entanto, seu uso é limitado, uma vez que possui uma fitotoxina cuja natureza química é de um aminoácido não proteico denominado de mimosina. Em ruminantes, principalmente em bovinos, esta substância causa efeitos tóxicos como alopecia, anorexia, redução no ganho de peso ou perda de peso, salivação excessiva, lesões esofágicas, aumento da tireoide e queda nas concentrações de hormônios tireoidianos. Em monogástricos também tem sido descrita toxicidade evidenciada por alterações como alopecia e diminuição do ganho de peso; porém, os efeitos sobre estes animais ainda não foram bem estudados. Assim, nesta pesquisa objetivou-se inicialmente desenvolver procedimentos químicos para a extração de mimosina das sementes da *L.leucocephala* e, a partir disto, realizar estudos biológicos, em ratos, para avaliar a toxicidade geral desse aminoácido bem como seus efeitos nos sistemas imune, endócrino e reprodutor. Na extração da mimosina, obteve-se o rendimento de 2,3%. Realizou-se a administração da fitotoxina, por via oral, a ratos *Wistar* adultos, nas doses de 25, 40 e 60mg/Kg p.v./dia, durante um período de 28 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: ganho de peso, consumo de ração, bioquímica sérica, histopatologia (fígado, rins, tireoide, timo e baço), peso relativo de órgãos (rins, fígado, timo, baço e testículos), imunidade celular por meio da atividade de macrófagos intraperitoneais, imunidade humoral por meio do título de anticorpos anti-SRBC e "*plaque forming cell*", dosagem de hormônios séricos (testosterona, corticosterona, T3 e T4) e comportamento sexual. Os dados obtidos no presente estudo revelaram que, embora não fossem detectadas alterações clínicas que indicassem toxicidade, e/ou diminuição no consumo de ração e do ganho de peso, nos animais expostos às diferentes doses

de mimosina, estes apresentaram lesões consistentes na tireoide. Além disto, observou-se diminuição da testosterona sérica dos ratos que receberam 60mg/Kg de mimosina. Ainda, nas doses de 40 e 60mg/Kg, verificou-se, por meio da avaliação do comportamento sexual, a diminuição no número de montas, bem como o aumento do intervalo entre elas; e nestas maiores doses os ratos também apresentaram aumento da intensidade de fagocitose de macrófagos intraperitoneais. Portanto, os estudos aqui realizados permitem sugerir que a mimosina, nas baixas doses aqui empregadas, não possui efeitos imunotóxicos; porém apresenta potencial bociogênico em ratos e provavelmente atua como desregulador endócrino.

Palavras-chave*: Leucaena leucocephala.* Mimosina. Toxicidade. Ratos.

ABSTRACT

DIPE, V. V. **Evaluation of possible toxic effects of mimosine in Wistar rats: immunotoxicity, endocrine disruption and sexual behavior.** [Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos *Wistar*: estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual]. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Leucaena leucocephala is a worldwide plant used as forage; however its use in animal production has been limited since it has a phytotoxin denominated mimosine. It is known that this substance cause toxicity as alopecia, anorexia, reduced weight gain or weight loss, excessive salivation, esophageal lesions, thyroid enlargement and low thyroid hormones in ruminants, mainly in bovines. On the other hand, toxic effects of mimosine have not well studied in monogastric, but alopecia and low weight gain already was also reported. Thus, this study aimed to evaluate in rats the general toxicity of this amino acid as well as its effects on immune, endocrine and reproductive systems. In the first step of the study, it was extracted from seeds of *L.leucocephala* 2.3% of mimosine that was administrated orally to adult Wistar rats at different doses of 25, 40 and 60mg/kg body weight/ day, for 28 days. It was evaluated the following parameters: weight gain, feed intake, serum enzymes, histopathology (liver, kidney, thyroid, thymus and spleen), relative organs weight (kidney, liver, thymus, spleen and testicles), cellular and humoral immunity, serum hormones (testosterone, corticosterone, T3 and T4) and sexual behavior. No clinical sings of toxicity was observed in animals, but histopathology reveled consistent lesions in the thyroids. Additionally, rats that received 60mg/kg of mimosine presented low serum levels of testosterone, and in rats treated with both doses of mimosine, 40 and 60mg/Kg, it was verified increase in phagocytosis intensity of intraperitoneal macrophages, decrease mounts number and increase in mounts interval. Therefore, our study permits to suggest that although low doses of mimosine does not have immunotoxic effects in rats, it has goitrogenic potential and probably acts as an endocrine disrupter.

Keywords: *Leucaena leucocephala.* Mimosine. Toxicity. Rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ganho de peso total, consumo de ração total, hemograma e bioquímica sérica dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 15 mg/kg (MI15), 25 mg/kg (MI25) e 40 mg/kg (MI40) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos 60

Tabela 2 – Ganho de peso total, consumo de ração total, hemograma e bioquímica sérica dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para os dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos 64

Tabela 3 – Avaliação histopatológica da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentados os números de animais com as lesões. O número de animais analisados (n) está entre parênteses. 65

Tabela 4 – Ganho de peso total, consumo de ração total, atividade de macrófagos intraperitoneais: porcentagem de macrófagos com fagocitose; intensidade de fagocitose (número de *S. aureus* fagocitadas por macrófagos) e *"burst"* oxidativo (produção de água oxigenada basal ou induzida por PMA) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet..... 73

Tabela 5 – Ganho de peso total, consumo de ração total, peso relativo de timo, peso relativo de baço, celularidade de medula óssea, celularidade de baço, imunidade humoral (título de anticorpos e PFC) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. 75

Tabela 6 – Hormônios séricos (testosterona, corticosterona, T3 e T4) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para os dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos 76

Tabela 7 – Peso corporal ao final do tratamento, ganho de peso total, consumo de ração total, pesos relativos (rins, fígado, testículos e baço) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. 79

Tabela 8 – Comportamento sexual dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para os dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos; [b]Teste Exato de Fisher para análise de contingência. 80

Tabela 9 – Avaliação de parâmetros de atividade locomotora, avaliada no campo aberto, dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina, São apresentadas as médias e os erros-padrões, ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. 84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *L. leucocephala* localizada no campus da USP em Pirassununga-SP: A- árvores, B- inflorescência globosa, C- vagens, D- semente. Fotos de Vânius Vinícius Dipe 24

Figura 2 – Estrutura química da mimosina.....26

Figura 3 – Principais etapas do processo de extração e purificação da mimosina. A- coluna com resina de troca iônica; B- eluição da mimosina; C-rotaevaporação do extrato; D- coleta do extrato logo após rotaevaporação; E- ajuste do pH para 4,5; F- mimosina precipitada após redução do pH para 4,5; G- liofilização da suspensão de mimosina congelada; H-mimosina liofilizada para a preparação das suspensões a serem administradas nos ratos 40

Figura 4 – Identificação da mimosina por cromatografia de camada delgada que indica a presença de mimosina nos extratos; A- extração teste com filme de PVC (controle negativo) indicando um Rf (fator de retenção) menor do que a mimosina padrão Sigma® mostrada em D; B e C- indicam os extratos, sendo que o Rf é igual ao da mimosina padrão Sigma® (Rf=0,1). Rf=dc/de, sendo dc= distância percorrida pelos componentes da mistura e de= distância percorrida pelo eluente (mimosina).....56

Figura 5 – Comparação dos cromatogramas obtidos pela técnica de HPLC. A- mimosina padrão Sigma®; B- mistura das extrações 1 e 2 (frasco 1); C- mistura das extrações 3, 4, 5 e 6 (frasco 2) 57

Figura 6 – Histopatologia da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. A- animal CO com folículos tireoidianos normais na região medular e periférica, e epitélio cuboide característico (H.E. 100x). B, C e D– animais dos grupos MI60, MI40 e MI25, respectivamente, notam-se folículos tireoidianos medulares dilatados com grande quantidade de colóide e células epiteliais achatadas (H.E. 100x) 66

Figura 7 – Histopatologia da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. A- animal do grupo CO que apresenta folículos tireoidianos medulares com epitélio cuboide característico (H.E. 400x). B, C e D – animais dos grupos MI60,

MI40 e MI25, respectivamente, notam-se epitélios achatados na região tireoidiana medular e as setas indicam necrose (H.E. 400x) 67

Figura 8 – Histopatologia da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. A- animal do grupo CO que apresenta folículos tireoidianos periféricos com epitélio cuboide característico (H.E. 400x). B, C e D – animais dos grupos MI60, MI40 e MI25, respectivamente, notam-se epitélios achatados na região tireoidiana periférica (H.E. 400x) 68

Figura 9 – Histopatologia renal dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. A- animal do grupo CO que apresenta túbulos renais com pouca deposição de material hialino no lúmen, B- animal do grupo MI60 que apresenta maior quantidade de material hialino no lúmen dos túbulos renais (H.E. 400x). As setas indicam o material hialino 69

Figura 10 – Esquema da seleção das populações de macrófagos intraperitoneais avaliados por citometria de fluxo nos experimentos de fagocitose de SAPI e "*burst*" oxidativo. A- histograma que ilustra a análise do "*burst*" oxidativo; B- histograma que ilustra a análise da fagocitose. A seta indica o fluxo de análise dos dados obtidos 72

Figura 11 – Intensidade de fagocitose (número de *S. aureus* fagocitadas por macrófagos) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet 73

Figura 12 – Nível sérico de testosterona (ng/dl) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn 77

Figura 13 – A- número de montas até a ejaculação; B- Intervalo entre montas dos ratos que foram tratados durante 28 dias com as doses de 25mg/Kg (grupo MI25), 40mg/Kg (grupo MI40) e 60mg/Kg (grupo MI60) de mimosina em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas H2O destilada (CO). São apresentadas as médias e os erros-padrões. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl ..... microlitro

ALT..... alanina aminotransferase

ANOVA..... análise de variância

AST ..... aspartato aminotransferase

C.H.C.M..... concentração de hemoglobina corpuscular média

CEPTOX..... Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária

dl ..... decilitro

FMVZ ..... Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g ..... grama

GGT ..... gama glutamil transferase

H.C.M ..... hemoglobina corpuscular média

H_2O_2 ..... peróxido de hidrogênio

ip ..... intraperitoneal

Kg..... kilograma

mg ..... miligrama

mL ..... mililitro

mm ..... milímetro

NaCl ..... cloreto de sódio

NaOH ..... hidróxido de sódio

nMol ..... nanomols

PBS ..... *phosphate buffer solution*

PFC ..... *plaque forming cell*

pg ..... picograma

PMA ..... miristato acetado de phorbol

RPM ..... rotações por minuto

SRBC ..... *sheep red blood cell* (eritrócitos de carneiro)

USP ..... Universidade de São Paulo

V.C.M ..... volume corpuscular médio

VPT ..... Departamento de Patologia Veterinária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

1.1 SOBRE A *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit 23

1.2 SOBRE A IMUNOTOXICOLOGIA 29

1.3 SOBRE OS DESREGULADORES ENDÓCRINOS 30

2 OBJETIVOS 33

2.1 OBJETIVO GERAL 33

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

3 MATERIAL E MÉTODOS 35

3.1 ANIMAIS 35

3.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS 36

3.3 MATÉRIA VEGETAL 37

3.4 PROCEDIMENTOS 37

3.4.1 **Extração da mimosina de *L. leucocephala*** 37

3.4.2 **Administração da mimosina** 41

3.4.3 **Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração** 41

3.4.4 **Avaliação dos parâmetros hematológicos** 42

3.4.5 **Análise bioquímica** 42

3.4.6 **Dosagens hormonais** 43

3.4.7 **Viabilidade celular e contagem de células** 44

3.4.8 **Necropsia e coleta de material para avaliação histopatológica** 44

3.4.9 **Avaliação do peso relativo de timo, baço, rins, fígado e testículos** 45

3.4.10 **Avaliação global de células da medula óssea** 45

3.4.11 **Avaliação da atividade de macrófagos intraperitoneais por medida do *burst* oxidativo e fagocitose por meio de citometria de fluxo** 46
3.4.12 **Avaliação da resposta imune humoral** 47
3.4.12.1 A sensibilização 47
3.4.12.2 Avaliação dos títulos de anticorpos anti-SRBC 47
3.4.12.3 Avaliação do PFC para quantificação de plasmócitos produtores de anticorpos anti-SRBC no baço 48
3.4.12.3.1 *O ensaio do PFC* 48
3.4.12.3.2 *O plaqueamento* 49
3.4.13 **Avaliação do comportamento de ratos no campo aberto** 51
3.4.14 **Avaliação do comportamento sexual de ratos machos** 51
3.4.15 **Análise estatística** 53
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 55
4.1 EXTRAÇÃO DA MIMOSINA DE *L. LEUCOCEPHALA* 55
4.2 EXPERIMENTO 1: PROSPECÇÃO DE DOSES PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MIMOSINA ADMINISTRADA EM DOSES REPETIDAS, POR VIA ORAL, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS MACHOS 58
4.2.1 **Delineamento experimental** 58
4.2.2 **Resultados** 58
4.3 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÕES DA TOXICIDADE DA MIMOSINA ADMINISTRADA EM DOSES REPETIDAS, POR VIA ORAL, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS MACHOS 61
4.3.1 **Delineamento experimental** 61
4.3.2 **Resultados** 61

4.4 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR PELA OBSERVAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS, POR CITOMETRIA DE FLUXO, DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 28 DIAS 70
4.4.1 **Delineamento experimental** 70
4.4.2 **Resultados** 70
4.5 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL PELA OBSERVAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE A FORMAÇÃO DOS PFCS POR PLASMÓCITOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-SRBC NO BAÇO E PELA ANÁLISE DO TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-SRBC DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 28 DIAS 74
4.5.1 **Delineamento experimental** 74
4.5.2 **Resultados** 74
4.6 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE OS HORMÔNIOS SÉRICOS DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS 75
4.6.1 **Delineamento experimental** 75
4.6.2 **Resultados** 76
4.7 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS 77
4.7.1 **Delineamento experimental** 77
4.7.2 **Resultados** 78

4.8 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO NO CAMPO ABERTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS MACHOS EXPOSTOS ÀS DIFERENTES DOSES DE MIMOSONIA DURANTE 28 DIAS.....82
4.8.1 **Delineamento experimental** 82
4.8.2 **Resultados** 82
5 DISCUSSÃO 86
6 CONCLUSÕES 96
REFERÊNCIAS 98

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as plantas tóxicas têm provocado problemas que vêm sendo relatados desde os primórdios da colonização, quando os portugueses trouxeram cabeças de gado e iniciaram a prática pecuária para a produção de carne, leite e couro (HOEHNE, 1939). Desde então, já se passaram mais de quinhentos anos e ainda não existem estudos consistentes que mostram a real dimensão dos impactos negativos das intoxicações animais por plantas tóxicas, que são muitas vezes subestimadas e afetam tanto a economia do país como representam grande risco à saúde pública (HARAGUCHI; GÓRNIAK, 2008), uma vez que produtos de origem animal, principalmente, leite, carne e seus derivados, podem veicular fitotoxinas (PANTER; JAMES, 1990; MEDEIROS; GÓRNIAK; GUERRA, 1999).

Os prejuízos econômicos causados pelas plantas tóxicas são, entre outros fatores, devido às mortes dos animais. Assim, estima-se que, aproximadamente, 1.200.000/ano de gado bovino venham a óbito no nosso país devido a este tipo de intoxicação. No entanto, imagina-se que essas perdas econômicas possam ser bem maiores, haja vista que esses dados são baseados em estudos realizados no sul do Brasil, onde há o menor índice de mortalidade e intoxicações, no entanto, se sabe que a grande maioria de mortes ocorre na região norte do Brasil, seguida pela nordeste e centro-oeste (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001).

As plantas que causam morte súbita, como a *Palicourea marcgravii*, são as que mais provocam apreensão ao produtor, pois normalmente são intoxicações nas quais, de maneira geral, há muitos animais mortos em um curto período, o que facilita a associação entre as mortes e a ingestão de uma planta tóxica (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002).

Por outro lado, as plantas que causam mortes esporádicas e com evolução sintomática lenta, como a *Pteridium aquilinum,* de maneira errônea, não são muito consideradas pelos produtores que possuem a falsa sensação de uma pequena perda econômica; porém, deve-se considerar que ao longo do tempo as mortes ou morbidades irão promover aumento de custos de produção e diminuição da lucratividade com a pecuária (HARAGUCHI; GÓRNIAK, 2008).

Outra maneira pela qual há prejuízos econômicos por plantas tóxicas é quando estas promovem alterações subclínicas, com a queda no desempenho dos

animais. Além disto, devem-se acrescentar aos custos, os honorários veterinários, a compra de medicamentos, entre outros. Esse tipo de intoxicação é a que provoca a mais devastadora perda econômica, porém raramente é diagnosticada corretamente devido às alterações sutis, mas não menos importantes, e que “silenciosamente” aumentam os custos da produção, pois os animais normalmente ficam mais susceptíveis às doenças com consequente queda no rendimento, que é evidenciado com a perda de peso ou diminuição na produção de carne, leite, ovos etc. De maneira geral, não há morte diretamente relacionada a essa intoxicação (JAMES; NIELSEN; PANTER, 1992). Muitas plantas presentes em nosso país se encaixam nesse grupo, como a *Lantana camara,* a *Senna occidentalis*, a *Ipomoea carnea* bem como a *L. leucocephala* (GÓRNIAK; 2008).

1.1 SOBRE A *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* (LAM.) DE WIT

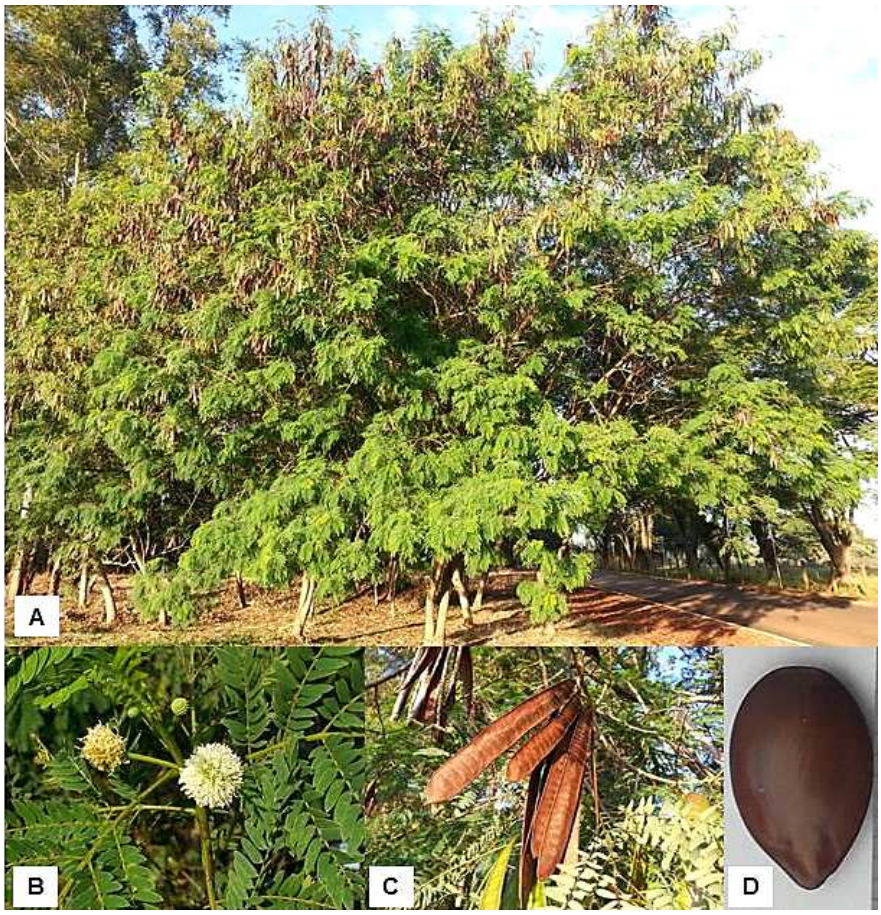
Espécies arbóreas e arbustivas do gênero *Leucaena sp*. são plantas que possuem alta adaptabilidade ambiental (FERIA et al., 2011) como a *L. leucocephala*, com nome popular de leucena, que é uma leguminosa originária da América Central; porém, atualmente encontra-se difundida por todo o mundo (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2000, TOKARNIA et al., 2000), pois apresenta uma característica invasora (SMITH, 1985; WAGNER; HERBST; SOHMER, 1999; SCHERER et al., 2005), que levou à sua inclusão, numa lista elaborada pela União Mundial para a Conservação da Natureza, como uma das 100 espécies de seres vivos mais invasoras do mundo (LOWE et al., 2000).

Em relação às características botânicas, Skerman (1977) e Bogdan (1977) descrevem:

> [...] a *L.leucocephala* apresenta um sistema radicular profundo e poucas raízes laterais, próximas à superfície do solo, com nódulos de bactérias fixadoras do nitrogênio, folhas bipinadas, com 15 a 20 cm de comprimento, apresentando quatro a dez pares de pinas, cada uma com cinco a vinte pares de folíolos em cada pina. Cada folíolo apresenta 7 a 15 cm de comprimento e 3 a 4 mm de largura. Também possui uma inflorescência globosa e solitária com numerosas flores brancas e redondas que, após a autopolinização, resultam em

cachos de vagens que são estreitas e achatadas, com 20 cm de comprimento e 2 cm de largura, portando 13 a 20 sementes elípticas, comprimidas e de cor marrom (Figura 1).

Figura 1 – *L. leucocephala* localizada no *campus* da USP em Pirassununga-SP*:* A- árvores, B- inflorescência globosa, C- vagens, D- semente



Fotos: Vânius Vinícius Dipe (2013).

A leucena pode ser aproveitada de diversas maneiras, tais como em programas de reflorestamento, haja vista que apresenta grande velocidade de crescimento; para gerar sombra em outras culturas; objetivando-se a proteção contra erosão eólica; como fornecedora de madeira para construção e produção de carvão para geração de energia; na fabricação de papel e celulose e como adorno em cerimônias (POTTINGER; HUGHES, 1995; GOEL; BEHL, 2002; MALIK et al., 2004; PRASAD et al., 2011).

Além disto, a *L. leucocephala* é bastante utilizada em dietas de ruminantes, principalmente, em sistemas de baixo investimento (POTTINGER; HUGHES, 1995; PEREIRA et al., 2002); pois, além de ser uma boa opção de alimento na estação seca, esta planta é altamente nutritiva, apresentando boa palatabilidade e digestibilidade para ruminantes (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2000). Ainda, sabe-se que a *L.leucocephala* é rica em proteínas, minerais e β- caroteno (AKBAR; GUPTA, 1985).

Embora a *L.leucocephala* reúna múltiplas qualidades para ser empregada amplamente como forrageira na criação animal, vários estudos, vêm inequivocamente mostrando que esta planta pode causar efeitos tóxicos nos animais, sobretudo quando é consumida em grandes quantidades (HEGARTY; SCHINCKEL; COURT, 1964; JONES et al. 1976; QUIRK et al., 1988; ALLISON et al., 1992; HAMMOND, 1995; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2000; TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; DALZELL et al., 2012).

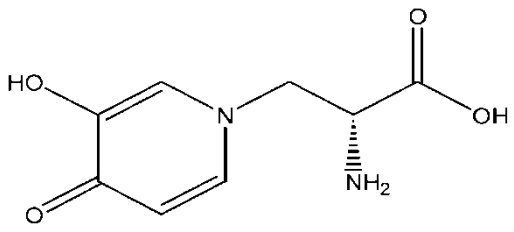
Entre os sinais típicos da intoxicação produzida pela leucena em ruminantes citam-se: alopecia, anorexia, redução no ganho de peso ou perda de peso, salivação excessiva, lesões esofágicas, aumento da tireoide e queda nas concentrações de hormônios tireoidianos (JONES, 1985). Além disso, descrevem-se ainda, mortalidade embrionária e abortamentos (HOLMES, 1980). Em animais monogástricos, embora sejam poucos os dados, tanto experimentais como observações ao nível de campo, referentes à toxicidade da planta, foi relatado, com base em observações em coelhos, suínos e equinos, que a *L.leucocephala* deva ser usada com cautela na dieta, já que foi verificado, nestes animais, alterações como alopecia e diminuição do ganho de peso (MTENGA; LASWAI, 1994; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2009). Também é relatada a redução no ganho de peso de galinhas alimentadas com *L. leucocephala* (D'MELLO; ACAMOVIC, 1989).

Um dos parcos estudos experimentais, encontrados na literatura, no qual se objetivou avaliar a toxicidade da *L.leucocephala* em animais monogástricos, verificou-se que ratos recém-desmamados, tratados com uma dieta contendo 25% de folhas e sementes da planta, apresentaram alterações como retardo no crescimento, alopecia, paralisia de membros pélvicos e catarata (EL-HARITH; SCHART; MEULEN, 1979).

Em relação ao princípio ativo tóxico da *L.leucocephala*, este já está bem caracterizado. É um aminoácido não proteico (ácido (S)-amino-β-[1-(3-hydroxi-4-

oxipiridina] propiônico), denominado de mimosina (Figura 2) sendo sinônimos deste composto: leucenol, leucenine e leucaenine.

Figura 2 – Estrutura química da mimosina



Fonte: (XUAN; TAWATA; KHANH, 2013).

A mimosina foi primeiramente isolada da *Mimosa pudica* (RENZ, 1936), porém este autor não a definiu como um aminoácido. No ano seguinte, MASCRÉ (1937) extraiu um composto opticamente inativo de *Leucaena glauca* e denominou-o leucenol. Dez anos mais tarde, Wilbaut e Klipool (1947) isolaram a mimosina da *L. leucocephala*. Um estudo conduzido por Franzolin Neto e Velloso (1987), revelou que a concentração de mimosina na matéria seca de *L. leucocephala* encontrava-se ao redor de 10% na ponta de broto, 4% nas folhas jovens, 2% nas folhas maduras, 4% nas flores, 4,5 % nas vagens jovens, 1% nos caules, 0,5% nas raízes e 12% nas sementes. Assim, verifica-se que este aminoácido pode ser encontrado em grande quantidade nas folhas e sementes da planta (XUAN et al., 2006).

Os efeitos adversos da mimosina em ruminantes são atribuídos também aos metabólitos desta toxina após sua degradação ruminal, sendo a forma mais tóxica o metabólito denominado de 3,4-diidroxi piridina (3,4-DHP), o qual se atribui o efeito bociogênico (HEGARTY et al., 1964; JONES, 1985; FENG; ATREJA, 1998; GUPTA; ATREJA 1998), e a menos tóxica o composto 2,3-diidroxi piridina (2,3-DHP) (JONES; HEGARTY, 1984; D'MELLO, 1992).

Estudos observacionais relataram, há anos, que em algumas regiões do mundo, como no Havaí, a maioria dos ruminantes não apresentava toxicidade quando da ingestão de *L.leucocephala*, mesmo em grandes quantidades (JONES;

MEGARRITY, 1984). Pesquisas posteriores correlacionaram a presença de uma bactéria, *Synergistes jonesii*, no rúmem, com a ausência de toxicidade (JONES; MEGARRITY, 1986; HAMMOND et al., 1989). A seguir, verificou-se que, de fato, essa bactéria é a principal responsável pela degradação do metabólito 3,4-DHP, fazendo com que haja minimização ou eliminação da intoxicação pela mimosina (ALLISON et al., 1992; PALMER et al., 2010).

Por outro lado, deve-se considerar que nem toda mimosina ingerida por bovinos é biotransformada em 3,4-DHP ou 2,3-DHP; neste sentido, verificou-se que parte da toxina é absorvida pela mucosa ruminal (MCDONALD et al., 1995; GHOSH et al., 2007), outra parte alcança o intestino delgado e é absorvida, podendo ser biotransformada no fígado e, tanto este aminoácido como os seus metabólitos podem ser excretados na urina e no leite. Pela possibilidade de a mimosina e/ou seus metabólitos poderem ser excretados no leite, Ghosh et al. (2007) propõem que estas substâncias devam ser monitoradas neste produto de origem animal, já que podem representar um potencial risco à saúde humana.

Além da importância como agente tóxico na criação animal e da possibilidade da mimosina causar danos à saúde do homem, já que pode ser veiculada em produtos de origem animal, há outros motivos para que se verticalizem as pesquisas sobre este aminoácido, pois plantas ricas em mimosina têm sido usadas na medicina popular. Por exemplo, a *Mimosa pudica*, uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como “dormideira”, “dorme-dorme”, “não me toque”, “sensitiva” ou “erva viva” é usada pela população na medicina tradicional, principalmente para o tratamento de hemorróidas. Na Índia, as mulheres com gravidez indesejada fazem um suco de *Mimosa pudica* com a finalidade de abortar (VIDYASAGAR; PRASHANTKUMAR, 2007). Por outro lado, não há nenhum estudo que avalie a toxicidade da mimosina quando usada com estas finalidades terapêuticas.

Alguns estudos têm apontado para outros usos da mimosina que possui atividade antimicrobiana (EBUENGA et al., 1979; SERRANO; ILAG; MENDOZA, 1983) atribuída ao fato de que esse aminoácido não proteico possa substituir a tirosina durante a formação de proteínas devido à similaridade química entre estes dois aminoácidos (KALEJTA; HAMLIN, 1997).

A analogia da estrutura química da mimosina também se estende aos neurotransmissores derivados da tirosina: a dopamina e a norepinefrina. No entanto,

não há estudos que possam indicar que a mimosina possua efeitos agonistas ou antagonistas desses neurotransmissores (D'MELLO, 2003).

A molécula de mimosina também contém um domínio responsável por quelar metais, mais especificamente aqueles de transição como o Fe^{3+} (LINN et al*.,* 1996) e uma possível estrutura do complexo *Fe^{3+}mimosina* foi proposto (TSAI; LING, 1973). Assim, esta fitotoxina pode diminuir a utilização de folato por alguns tecidos animais, já que os quelantes de ferro possuem essa característica (CHANARIN; ROTHMAN; BERRY, 1965). No entanto, outra pesquisa afirma que a diminuição da utilização do folato por tecidos animais é pela atividade antagonista da mimosina com o ácido fólico (OPPENHEIM et al., 2000).

Mais recentemente, pesquisas vêm mostrando o potencial uso da mimosina como substância antitumoral, já que este aminoácido possui ação antimitótica e depilatória (HEGARTY et al., 1964), além de inibir reversivelmente a fase G1 do ciclo celular (LALANDE; HANAUSKE-ABEL 1990). Assim, estudos *in vitro* mostraram que a mimosina inibe o crescimento de células tumorais uterinas de humanos (ZALATNAI, 2005), bem como bloqueia a replicação do DNA de células cancerosas de ovários de hamster (MOSCA; DIJKWEL; HAMLIN*,* 1992). Ainda, uma pesquisa, *in vivo*, em camundongos, realizada por este grupo de pesquisa, reitera o potencial efeito antitumoral da mimosina que apresentou efeito sinérgico com a ciclofosfamida na inibição do desenvolvimento do tumor ascítico de Erlich (DIPE et al., 2012). Neste contexto, pode-se assumir que esse aminoácido possa ser apontado como um potencial candidato para o tratamento de alguns tipos de cânceres. No entanto, novamente deve-se ressaltar a escassez, na literatura, de estudos que avaliam a toxicidade na exposição, aguda ou prolongada, a esta fitotoxina, principalmente em monogástricos.

Portanto, é essencial que se deva investigar os efeitos da mimosina em outros sistemas, como o imune e o reprodutor, haja vista o potencial impacto negativo desta fitotoxina na criação animal e possivelmente na saúde do ser humano, já que, como dito, este princípio ativo tóxico pode ser veiculado em produtos de origem animal; além de estar sendo estudado como medicamento antitumoral. Também, deve-se considerar a inexistência de pesquisas sobre o mecanismo de ação da mimosina e seus efeitos na exposição prolongada, em baixas doses. Assim, a pesquisa aqui apresentada objetivou verificar os potenciais

efeitos desta fitotoxina, empregando-se protocolos de imunotoxicologia, endocrinotoxicologia e toxicologia comportamental.

1.2 SOBRE A IMUNOTOXICOLOGIA

As funções essenciais do sistema imune são o de combater patógenos e xenobióticos que possam causar doenças, a morte do hospedeiro e impedir o desenvolvimento de células neoplásicas. Portanto, esse sistema é de fundamental importância para a homeostasia que pode ser susceptível a diferentes insultos (NAGARKATTI; NAGARKATTI, 1987).

As injúrias no sistema imune decorrentes da exposição a agentes tóxicos são objeto de estudo de um ramo recente da toxicologia, a imunotoxicologia, que pode ser definida como o estudo dos efeitos adversos no sistema imune resultantes da exposição (ambiental, ocupacional, terapêutica e abusiva) às substâncias químicas, físicas e material biológico (KAMINSKI; KAPLAN; HOLSAPPLE, 2008).

As interações de xenobióticos com componentes do sistema imunológico podem decorrer em efeitos adversos que incluem danos estruturais e/ou funcionais como: alteração da celularidade do timo, baço, medula óssea e linfonodos; proliferação anormal de células progenitoras na medula óssea; alteração na maturação e funções das células imunológicas que podem afetar as respostas humoral e/ou celulares (LUSTER et al., 1992).

Muitas pesquisas mostram claramente que a exposição a diminutas concentrações, a vários agentes tóxicos, causam injúrias ao sistema imune antes de comprometer o normal funcionamento de diversos órgãos. Essa toxicidade no sistema imune pode se manifestar ou por uma exacerbação das reações imunológicas e desencadear o surgimento de alergias e doenças autoimunes, ou causando uma depressão neste sistema, aumentando, assim, a susceptibilidade do indivíduo às infecções por patógenos oportunistas e ao câncer (KAMINSKI; KAPLAN; HOLSAPPLE, 2008).

Neste contexto, as agências internacionais mais rigorosas na avaliação de risco de xenobióticos, como a norte americana “*United States Food and Drug Administration* (US-FDA)”, a européia “*European Medicines Agency* (EMEA)” e a

japonesa "*Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare* (MHLW)", reconhecem a imunotoxicologia como ferramenta essencial para avaliação de xenobióticos. Neste contexto, a obrigatoriedade dos testes varia entre essas agências em relação ao tipo de agente tóxico e podem ser baseados nos resultados dos estudos clássicos de toxicidade realizados em etapas de avaliações pré-clínicas anteriores (VAN DER LAAN; VAN LOVEREN, 2005).

As alterações no sistema imune podem, inclusive, direcionar e acrescentar avaliações de xenobióticos em outros sistemas. Neste sentido, estudos recentes demonstram de maneira evidente que o sistema imune está fortemente relacionado ao sistema nervoso e endócrino (AKMAEV; GRINEVICH, 2001; THYAGARAJAN; PRIYANKA, 2012). De fato, diversos estímulos provenientes do sistema nervoso central são capazes de modular as respostas imunes, e o sistema endócrino faz elos entre esses dois sistemas (ALVES; PALERMO-NETO, 2010). A mais conhecida dessas interações são o estresse, em que o sistema nervoso estimula a produção de corticosteroides e esses diminuem a resposta imune, que podem ou não desencadear ou serem desencadeados por mudanças comportamentais (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

1.3 SOBRE OS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

O programa internacional em segurança química (IPCS) da Organização Mundial da Saúde (WHO), que trabalha para estabelecer a base científica para a gestão dos produtos químicos, e de reforçar as capacidades para a segurança química, define os desreguladores endócrinos (DE) como substâncias exógenas ou mistura dessas que alteram as funções do sistema endócrino (MANNING, 2005) e consequentemente causam efeitos adversos em organismos intactos, ou em seus descendentes (ANWAY; SKINNER, 2006). De acordo com a agência norte americana de proteção ambiental (US-EPA), os DE podem interferir na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação com receptores ou eliminação de hormônios responsáveis pela homeostasia, reprodução e desenvolvimento (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Estas substâncias que têm potencial para perturbar o sistema endócrino, podem interferir no funcionamento do sistema hormonal de três formas: substituindo os hormônios naturais, bloqueando a ação hormonal e, ainda, podem aumentar ou diminuir os níveis de hormônios naturais (CREWS; WILLINGHAM; SKIPPER, 2000).

Agências internacionais que avaliam os riscos dos xenobióticos, como a "*United States Food and Drug Administration* (US-FDA)" e a "*U.S. Environmental Protection Agency* (US-EPA)", exigem testes pré-clínicos que avaliam o potencial efeito desregulador endócrino de substâncias presentes em produtos químicos, poluentes ambientais e medicamentos (TONG et al., 2002). A *"Organisation for Economic Co-operation and Development"* (OECD), agência mundial que, entre outras funções, propõe protocolos para avaliar a segurança de xenobióticos, lançou uma diretriz, o *"guideline nº150"* para avaliar possíveis desreguladores endócrinos (OECD, 2012). A interferência nos hormônios está altamente correlacionada com alterações comportamentais; assim, já é bem estabelecido que o estrógeno, a testosterona, a corticosterona e os hormônios hipofisários podem estar envolvidos nestas alterações (FAHLBUSCH; BAROCKA, 1995). O comportamento sexual de animais domésticos e do ser humano, por exemplo, é alterado por uma diminuição nos níveis séricos de testosterona, e isso diminui a libido desses indivíduos. Desta maneira, a avaliação do comportamento sexual de ratos tem sido realizada paralelamente às avaliações hormonais com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação de xenobióticos e suas consequências sobre o comportamento (ÅGMO, 1997; WU; GORE, 2010).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos machos, em doses baixas e repetidas, durante 28 dias, avaliando-se a toxicidade geral e sua possível ação nos sistemas imune, endócrino e reprodutor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a metodologia para extração e quantificação da mimosina a partir das sementes de *L. leucocephala;*
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos machos, em doses baixas e repetidas, durante 28 dias, avaliando-se os seguintes parâmetros:

- ganho de peso e consumo de ração total;
-bioquímica sérica: uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alaninoaminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), glicose, triglicerídeos, colesterol total, proteínas totais e albumina;
- histopatologia de fígado, rins, tireoide, timo e baço;
- peso relativo de rins, fígado, timo, baço e testículos;
- imunidade celular por meio da atividade de macrófagos intraperitoneais;
- imunidade humoral por meio do título de anticorpos anti-SRBC e "*plaque forming cell*";
- dosagem de hormônios séricos: testosterona, corticosterona, tiroxina (T3) e tetraiodotironina (T4);
- comportamento sexual.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

São descritos abaixo os diferentes materiais e métodos empregados na realização deste trabalho, sendo os mesmos aprovados pela comissão de bioética da FMVZ/USP, protocolado com o número 2452/2011.

3.1 ANIMAIS

Nos experimentos realizados nas instalações do Centro de Pesquisas em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Campus Administrativo de Pirassununga, foram empregados ratos *Wistar*, machos, com pesos entre 200 e 220g. Estes animais ficaram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20cm. Estas caixas foram armazenadas em estantes climatizadas, com temperatura e umidade relativa constante (21-24°C e 65 – 70%, respectivamente). Cada caixa continha dois animais, os quais foram separados por uma divisória central metálica, em forma de grade, que permitia que tivessem contato visual. Os animais receberam água e ração comercial para roedores (Nuvilab Nuvital-CR1®) *ad libitum*. A iluminação da sala foi mantida em um ciclo de noite/dia de 12 horas, sendo a fase clara iniciada às 7 horas.

Para os experimentos realizados no *Poisonous Plant Reserach Laboratory-United States Department of Agriculture* (PPRL-USDA), nos Estados Unidos, foram empregados ratos *Wistar*, machos (com pesos entre 200 e 220g) e fêmeas (com pesos entre 190 e 210g), provenientes da empresa norte americana Simonsen Laboratories®. Os animais foram alojados, em salas climatizadas, com temperatura e umidade relativa constante (21-24° C e 65 – 70%, respectivamente) e mantidos em caixas de acrílico transparente com tampas metálicas, sem divisórias internas; assim, cada par de ratos machos ocupava o espaço de 49x34x16cm e cada quatro fêmeas ocupavam uma caixa com essas mesmas dimensões. Os animais receberam água e ração comercial para roedores (Purina *Laboratory Rodent Diet*

5001®) *ad libitum* e foram mantidos em ciclo de luz invertido de 12 horas, sendo a fase clara iniciada às 22 horas.

3.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- ácido clorídrico (2N) - (Synth®)
- álcool etílico 70° (Archote®)
- amido de milho (Maizena®);
- auto Gamma Counter Packard cobra 5000 Series®;
- banho maria laboratorial;
- centrífuga;
- cloreto de sódio (Nuclear®)
- cloreto de sódio (Nuclear®)
- dietilaminoetil (DAE)-dextrano;
- estufa para cultura de placas.
- etilenodiamino-tetracético-dissódico (EDTA) (Synth®)
- FACScalibur Immunocytometry®;
- lâminas e lamínulas (Glasstechica®)
- leitor de Elisa (Labsystens®)
- meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®)
- meio tioglicolato – Brewer (Bibco®)
- microscópio de contraste de fase (Nikon®);
- microscópio óptico (Nikon®)
- mimosina padrão (Sigma-Aldrich®);
- miristato acetato de forbol (PMA) (INC®)
- papel celofane;
- peróxido de hidrogênio (Merck®);
- resina de troca iônica Amberlite IR 120B®;
- sementes de *L. leucocephala*;
- seringas descartáveis de 0,5mL, 1,0mL e de 10mL (Rynco®);
- soluções de etanol 70°, 80° e 90°;

- solução de bacto ágar a 0,5%;
- solução de HCl 2N e 4N;
- solução de hidróxido de amônio 2N;
- solução de NaOH 2N;
- solução salina 0,2% e 1,6%;
- solução tampão de fosfato (PBS);
- soro bovino fetal (Gibco®);
- *tripan-blue* 4% (Gibco);
- tubos de citometria;
- Zymosan-A (Sigma®).

3.3 MATÉRIA VEGETAL

Foram coletadas sementes de *L. leucocephala,* durante os meses de janeiro e fevereiro do ano de 2012, no C*ampus* da USP em Pirassununga-SP, sendo a localização da plantação 21°57’28.849" sul, 47°27’34.849" oeste. As sementes foram então congeladas a -20ºC até o momento de início dos procedimentos de extração da mimosina.

3.4 PROCEDIMENTOS

São apresentados os diferentes procedimentos realizados, separados em tópicos, para melhor compreensão.

3.4.1 **Extração da mimosina das sementes de *L. leucocephala***

Os procedimentos de extração da mimosina foram realizados a partir da metodologia proposta por Hegarty e Court (1964), com modificações.

Para a extração da mimosina das sementes da *L. leucocephala* foi utilizada a resina de troca iônica, catiônica, Amberlite IR 120B®. Previamente a extração, a resina foi preparada da seguinte forma: após sua colocação em uma coluna de vidro (1m de comprimento x 5cm de diâmetro) a mesma foi equilibrada com uma solução HCl 4N, *overnight* (100 ml de HCl 4N para cada 110 mL de resina). Em seguida, a resina catiônica foi convertida na forma Na^+ utilizando-se uma solução de NaOH 2N, seguida de uma solução HCl 2N, ambas soluções na proporção de 100 mL para cada 110 mL de resina. Após estes procedimentos a resina foi lavada com H_2O destilada em abundância (aproximadamente 1,2 L para cada 110 g de resina), até que o pH da água estivesse entre 6,0 e 7,0, estando assim a resina pronta para a utilização.

Foram utilizados 880 mL da resina previamente preparada e 800 g de sementes da planta. Assim, a resina foi dividida em oito partes iguais (110 mL) e colocada em sacos de papel celofane para diálise (25X25 cm) acrescentando-se, em cada saco, 6g de amido de milho (Maizena®). Em um recipiente foi preparada uma solução de 9,6 litros de H_2O destilada e 800g de pó de sementes de *L. leucocefala* previamente moídas em moinho industrial até a consistência de um pó fino. Após o preparo desta solução, quatro sacos de celofane com a resina foram imersos nesta mistura e permaneceram durante 24 h sob agitação com o auxílio de em um agitador magnético. Passadas as 24 h, os quatro sacos de celofane empregados na diálise foram retirados da mistura e substituídos pelos outros quatro restantes, sendo que estes últimos permaneceram inseridos no recipiente sob agitação por 36 h trinta e seis horas.

Decorrido este período, a resina de todos os sacos foram reunidas e transferidas novamente para a coluna e lavadas com oito litros de H_2O destilada. Na sequência, a resina foi lavada com 1,6 litros de solução etanol 80º, para retirada do excesso de amido de milho, e posteriormente com 16 litros de H_2O destilada. A mimosina foi então eluída da resina aplicando-se solução de hidróxido de amônio 2N em quantidade suficiente para a eluição total. Sendo esta observada pela mudança da coloração do eluído (de amarelado para transparente). O eluido foi coletado e armazenado em frasco ambar e posteriormente concentrado em rotaevaporador a temperatura de 40ºC.

Após a rotaevaporação, o precipitado foi dissolvido em H_2O destilada (50mL) e o pH ajustado para 4,5 – 5,0 (com solução de HCl 4N). Nesta etapa, observou-se a precipitação de grande parte da mimosina extraída e a formação de uma suspensão com duas fases. A suspensão foi então homogeneizada e distribuída em tudos falcon de 50mL. Em seguida, os tubos foram colocados em centrífuga durante 10 minutos a 4000rpm e o sobrenadante retirado e adicionado o mesmo volume de H_2O destilada, na seguência, uma nova centrifugação foi realizada também durante 10 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então congeladas e liofilizadas para obtenção da mimosina na forma de pó (Figura 3).

Em seguida, as amostras foram submetidas à análise em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel F254 Merck® de vidro. A fase móvel utilizada foi a solução de butanol, ácido acético e água (BAW) na proporção de 12:3:5, respectivamente. A placa foi revelada com solução de cloreto férrico a 10% e uma amostra de mimosina comercial Sigma-Aldrich® (catálogo #M0253) com pureza superior a 98%, foi aplicada como padrão. Posteriormente, foi realizado o teste para a verificação do grau de pureza da mimosina extraída. Essa análise foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção ultravioleta (UV) a 280nm e foi usada como padrão a mimosina da Sigma-Aldrich® (catálogo #M0253) com pureza superior a 98%. O procedimento de HPLC foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

1- A mimosina padrão foi diluída (1mg/ml) em HCL 1N. Dessa solução, alíquotas de 50, 40, 30, 20 e 10µl foram diluídos em 1 ml de uma solução de H_3PO_4 a 0,2%.

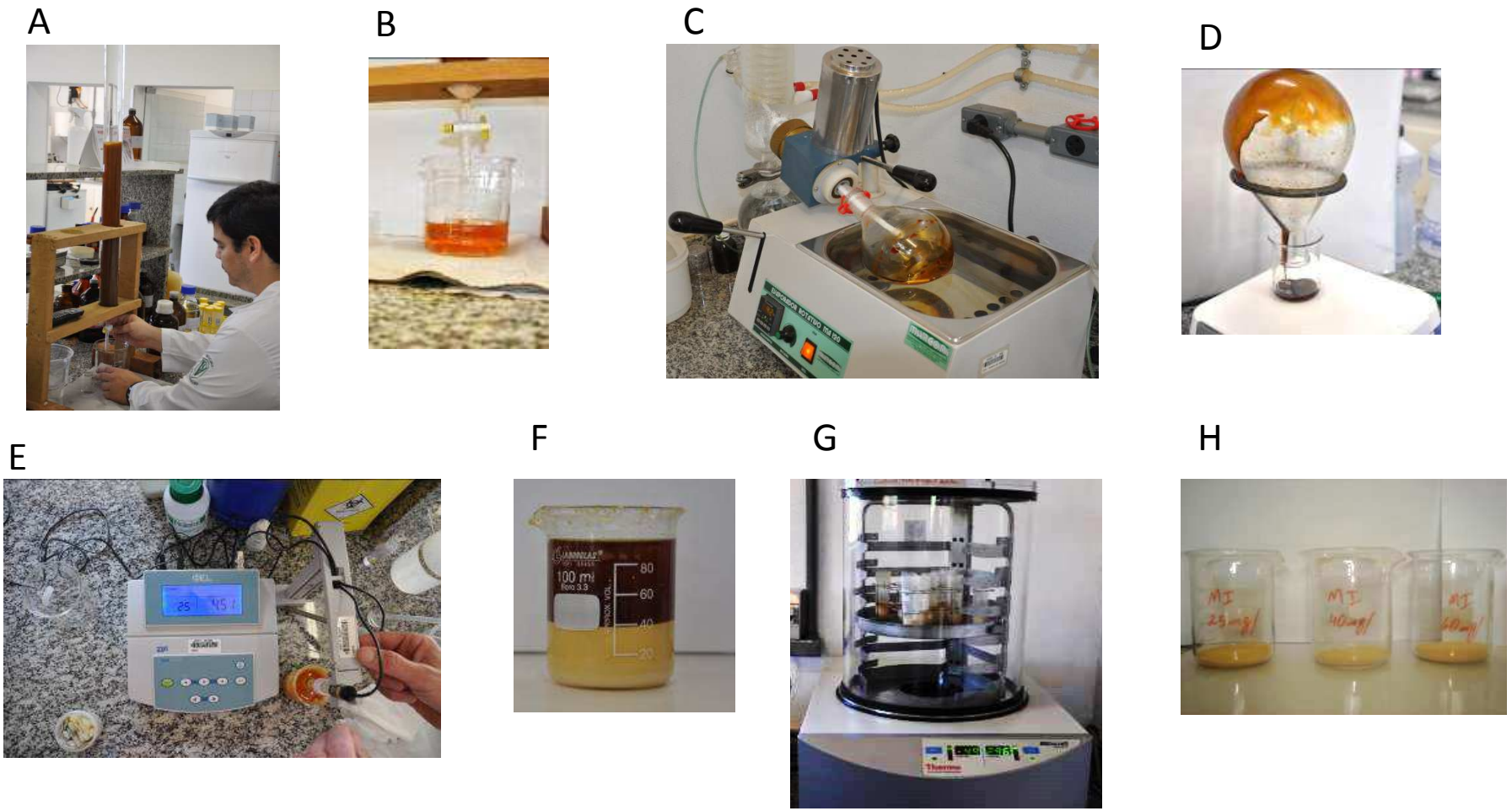
2- As amostras de mimosina foram preparadas da mesma maneira que a mimosina padrão, conforme descrito no item anterior.

3- As amostras (5µl) e a mimosina padrão (5µl) foram analisadas por HPLC-UV com uma coluna Hypercarb Thermo Scientific®. As áreas de pico foram mensuradas e gravadas pelo software do sistema HPLC. Em seguida, foi utilizado o software Microsoft Excel 2010® para a obtenção da comparação dos resultados das amostras com a mimosina padrão e estabelecer o grau de pureza em porcentagem.

Para a preparação das suspensões a serem administradas aos animais, foram adicionados em um béquer de 20ml: a mimosina e NaOH 2N, na proporção de 1:2. Em seguida foi adicionado HCl 4N até que o pH estivesse entre 7 e 7,5. Logo

após foi adicionado o volume de H_2O destilada necessário para atingir a concentração de mimosina desejada na suspensão.

Figura 3 - Principais etapas do processo de extração e purificação da mimosina



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- coluna com resina de troca iônica; B- eluição da mimosina; C-rotaevaporação do extrato; D- coleta do extrato logo após rotaevaporação; E- ajuste do pH para 4,5; F- mimosina precipitada após redução do pH para 4,5; G- liofilização da suspensão de mimosina congelada; H-mimosina liofilizada para a preparação das suspensões a serem administradas nos ratos.

3.4.2 **Administração da mimosina**

Foi realizado um experimento “piloto” para a prospecção de doses para avaliação da toxicidade da mimosina. Neste, foram empregadas as doses de 15, 25 e 45mg/Kg p.v./dia da fitotoxina nos ratos. Nos demais experimentos, após a observação dos resultados do procedimento “piloto”, as doses de mimosina utilizadas para a administração nos animais foram de 25, 40 e 60mg/Kg p.v.

Em todos os experimentos, a suspensão contendo a mimosina foi previamente agitada imediatamente antes de cada administração nos ratos. Os tratamentos foram realizados, em doses repetidas, durante 28 dias, por via oral (gavage), de acordo com os procedimentos contidos no protocolo 407 da “Organisation for Economic Co-operation and Development” (OECD, 2008).

3.4.3 **Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração**

Os ratos foram pesados antes do início da administração da mimosina de L. leucocephala para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. Posteriormente, o consumo de ração, bem como o peso dos animais, foram medidos a cada três dias, durante todo o período experimental. Tal procedimento foi necessário para realizar o ajuste da quantidade da suspensão de mimosina a ser administrada nos animais. Foram verificados também o ganho de peso e o consumo de ração total durante os 28 dias de período experimental.

3.4.4 **Avaliação dos parâmetros hematológicos**

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (5 e 50mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular) e, a seguir, submetidos à cirurgia para exposição da veia cava caudal que foi a via empregada para a coleta de sangue que foi colocado em tubos de 5mL com anticoagulante EDTA para a posterior avaliação do hemograma completo (série vermelha e branca). O hemograma foi realizado por meio de um sistema automatizado denominado Animal Blood Counter (Horiba®). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada segundo a técnica recomendada por Birgel (1982).

3.4.5 **Análise bioquímica**

Foram coletadas amostras de sangue, sem anticoagulante, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para a retração do coágulo e, posteriormente, submetidas à centrifugação (4000 rpm, 10 minutos) para a coleta de soro, o qual foi acondicionado em microtubos e imediatamente congelados a -20ºC, para então serem submetidos às diferentes determinações bioquímicas.

As avaliações dos níveis séricos de ALT, AST, FA, GGT, glicose, colesterol total, uréia, creatinina, albumina e proteínas totais foram realizadas de acordo com as especificações recomendadas pela fabricante dos kits comerciais, sendo esta a Laborlab®. Para tais análises, foi utilizado o equipamento da CELM® modelo SBA

200 que tem como princípio o teste UV otimizado de acordo com a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC).

3.4.6 **Dosagens hormonais**

A mensuração hormonal nos soros de ratos utilizados neste experimento foi realizada no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ-USP. As análises hormonais séricas foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio (RIE) utilizando kits COAT-A-COUNT® desenvolvidos para avaliação hormonal quantitativa. Os hormônios dosados foram: testosterona, tiroxina (T3), tetraiodotironina (T4) e corticosterona. Todos os kits foram específicos para as dosagens em ratos e o protocolo utilizado foi o apresentado pelo fabricante, sendo o aparelho utilizado o Cobra 5000 Series Auto Gamma Counter (Packard®).

O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio da corticosterona foi de 0,71% para o controle alto e de 3,21% para o controle baixo e a sensibilidade dos ensaios deste hormônio foi de 2,73 ng/ml. Para a testosterona, o CV intra-ensaio foi de 0,48% para o controle alto e de 0,79% para o controle baixo e a sensibilidade dos ensaios deste hormônio foi de 1,54 ng/dl. Para T3, o CV intra-ensaio foi de 1,17% para o controle alto e de 2,58% para o controle baixo e a sensibilidade dos ensaios deste hormônio foi de 3,85 ng/dl. Para T4, o CV intra-ensaio foi de 6,78% para o controle alto e de 5,60% para o controle baixo e a sensibilidade dos ensaios deste hormônio foi de 0,12 ng/ml.

3.4.7 **Viabilidade celular e contagem de células**

As células obtidas para a realização dos diferentes experimentos foram mantidas em banho de gelo, dentro de tubos tipo falcon ou microtubos até serem quantificadas em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade celular das mesma, observada pela coloração com azul de trypan – 0,1%, aceitando-se no mínimo 95% de viabilidade. As suspensões de células foram contadas e ajustadas de acordo com cada experimento e conservadas em banho de gelo até o seu uso.

3.4.8 **Necropsia e coleta de material para avaliação histopatológica**

Após a eutanásia dos animais pertencentes aos diferentes tratamentos, os mesmos foram avaliados macroscopicamente para detecção de possíveis lesões e procedeu-se a coleta de alguns tecidos (fígado, rim, tireoide, timo e baço) para análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em formol 10% tamponado, processados seguindo as técnicas de rotina, cortados a 5 micra e corados por hematoxilina e eosina. Em seguida, a avaliação histopatológica foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (aumentos de 100 e 400x).

3.4.9 **Avaliação do peso relativo de timo, baço, rins, fígado e testículo**

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com o uso de xilazina e quetamina (5 e 50mg/Kg p.v., respectivamente, por via intramuscular). Em seguida, foram aferidos os pesos corporais, coletados o timo, o baço, rins, fígado e testículos. Os órgãos coletados foram pesados e os seus pesos relativos foram obtidos pela divisão do peso de cada órgão pelo peso corporal.

3.4.10 **Avaliação global de células da medula óssea**

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral de cada animal, após a lavagem da mesma com 5,0mL de solução de RPMI, a 4ºC e pH 7,4. As células foram acondicionadas em tubos tipo falcon e dispersas com auxílio de pipeta tipo “pasteur” até obter-se uma suspensão celular homogênea. Em seguida, as suspensões celulares foram centrifugadas (15000rpm, 10 minutos, 4ºC), o sobrenadante retirado, e adicionada solução salina 0,2% a qual foi homogeneizada por 20 segundos com o pellet de células para promover a lise das células vermelhas. Imediatamente depois, foi adicionado o mesmo volume de uma solução salina a 1,6%. As células brancas foram contadas por um analisador automático (Animal Blood Counter - Horiba®).

3.4.11 **Avaliação da atividade de macrófagos intraperitoneais por medida do burst oxidativo e fagocitose por meio de citometria de fluxo**

Para avaliação da atividade de macrófagos intraperitoneais foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA) conectado a um computador (Macintosh Apple®, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Jose, CA, USA). Após a eutanásia dos animais por aprofundamento anestésico com o uso de xilazina e quetamina (5 e 50mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular), foram injetado 5mL de PBS a 4º na cavidade peritoneal dos ratos e após uma leve massagem abdominal foi retirado o maior volume possível do líquido intraperitoneal e colocados em tubos falcon previamente acondicionados em uma caixa de isopor com gelo. As células intraperitoneais viáveis foram contadas em câmara de Neubauer para avaliar a concentração celular e posterior retiradas de 2x105 células a serem utilizadas para cada avaliação do “burst” oxidativo e da fagocitose. Para cada animal foram identificados três tubos de citometria. Os três tubos tiveram uma concentração de 2x105 células/100µl e nos três tubos foram adicionados 200µl de 2'7'diacetato de diclorofluoresceína DCFH-DA responsável pela emissão de fluorescência verde após reagir com espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos. No primeiro tubo foi avaliado o “burst” oxidativo basal dos macrófagos. No segundo tubo foram adicionados 100µl de PMA para avaliação do “burst” oxidativo após estimulação com esta substância. No terceiro e último tubo foram adicionados 100µl de Staphylococcus aureus marcado com iodeto de propídio (SAPI) para avaliação da porcentagem de macrófagos que realizaram fagocitose e também a intensidade de fagocitose medida pelo número de SAPI fagocitadas pelos macrófagos.

A fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530±30 nm (detector FL1) e a fluorescência de cor vermelha da bactéria marcada com iodeto de propídeo (SAPI) foi mensurada a 585±42 nm (detector FL2). A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o “burst” oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de macrófagos que fagocitaram bactérias) foi calculada através do número de macrófagos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicado por 100. Já a intensidade de fagocitose foi determinada pela média do número de eventos com fluorescência (SAPI) no interior de cada célula. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de

fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos. Através do Cell Quest Pro® foi analisada a população de macrófagos, excluindo-se as demais populações celulares, por meio da análise dos “gates”. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco (sem estímulo algum) usado como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

3.4.12 **Avaliação da resposta imune humoral**

3.4.12.1 *A sensibilização*

Utilizou-se para a sensibilização dos ratos, eritrócitos de carneiro (SRBC “sheep red blood cell”). Previamente a utilização, os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina 0,9% (3000rpm, 15 min, a 10°C) e uma suspensão de células a 2,0x109 SRBC/ml foi preparada, em seguida cada rato recebeu 1mL dessa suspensão por via intraperitoneal.

3.4.12.2 *Avaliação dos títulos de anticorpos anti-SRBC*

A técnica utilizada para titulação de anticorpos anti-SRBC foi a proposta por Sharma et al. (1984), com modificações. Para tal, os eritrócitos de carneiro foram coletados assepticamente em tubo heparinizado de carneiro reprodutor adulto, sadio, pertencente à Prefeitura do campus de Pirassununga-SP da USP.

Sete dias após a sensibilização, foram coletados, por punção da veia cava inferior, amostras de sangue. O sangue foi mantido em temperatura ambiente por 45 minutos e submetido à centrifugação a 4000rpm, por 10 minutos. O soro foi então colocado em banho-maria a 56ºC, para a desnaturação das proteínas do sistema complemento e posteriormente congelado a -20ºC, até o momento da titulação.

Para a titulação, foi colocado no primeiro poço de uma placa de 96 poços de fundo em U, 30 µL de soro de rato sadio (fonte de sistema complemento) não sensibilizado com o SRBC e em cada poço subseqüente (linha) foram colocados 30 µL de solução salina a 0,9%. A seguir, foram então plaqueadas as amostras de soro coletadas dos ratos da seguinte forma: na primeira linha de poços, plaqueou-se 30 µL de soro de animal não sensibilizado no primeiro poço (controle negativo); deste, retirou-se 30 µL e adicionou-se no segundo poço e assim por diante, até o 12º poço (diluição seriada). Na seqüência de linhas, plaqueou-se o soro dos animais sensibilizados.

Após a diluição seriada do soro, foram adicionados a cada poço, 30 µL da suspensão de SRBC a 10%.

As placas foram mantidas em estufa a 37ºC, por uma hora, e após este período fez-se a leitura. Estabeleceu-se o título de anticorpos como sendo aquele em que o botão de eritrócitos formado (hemossedimentação) foi semelhante àquele do controle negativo, bem como semelhante às diluições subseqüentes; isto é, a partir do momento em que não mais foi observada a hemólise ocasionada pelos anticorpos anti-SRBC.

O título de anticorpos foi expresso de acordo com a graduação da diluição realizada nos poços da placa, sendo a primeira diluição (1/2) tida como título 1, e assim subsequentemente.

3.4.12.3 **Avaliação do PFC para quantificação de plasmócitos produtores de anticorpos anti-SRBC no baço**

3.4.12.3.1 *O ensaio do PFC*

Para a preparação do SRBC, utilizado para plaquear às amostras, os eritrócitos de carneiro foram lavados 3x em solução salina a 0,9% (3000rpm, 15 min, a 10°C), na última lavada, tirou-se o sobrenadante e homogeneizaram-se os eritrócitos no tubo (SRBC total). Desta solução de SRBC total, fez-se uma diluição

de 1:2 (p.ex. 0,5mL de SRBC total + 0,5mL de salina) e manteve-se em gelo até o momento de plaquear.

Após a eutanásia por aprofundamento anestésico (xilazina e quetamina) dos animais sensibilizados, o baço foi coletado e pesado. Logo após foi retirada e pesada uma porção desse órgão que foi macerado para obtenção dos esplenócitos. Em seguida os esplenócitos foram centrifugados (centrífuga 15000rpm, 10minutos, 4ºC), o sobrenadante retirado, e adicionada solução salina 0,2% a qual foi homogeneizada por 20 segundos com o “pellet” de células para promover a lise das células vermelhas e imediatamente depois foi adicionado o mesmo volume de uma solução salina a 1,6%. Os esplenócitos foram contados e foi preparada uma suspensão celular em meio RPMI-1640 com 12,0x106 células/ml.

Para a preparação da placa, foi feita uma solução de bacto ágar a 0,5% em RPMI. Esta solução foi colocada em homogeneizador magnético sob agitação e aquecimento até fervura. Após fervura, foi adicionado dietilaminoetil (DAE)-dextrano (1,6 ml de uma solução 0,05% de DAE-dextrano para cada 100ml de ágar). Enquanto isso, microtubos (1,5mL) foram colocados em banho-maria sob a temperatura de 46 a 48ºC, já com a identificação das amostras. Em cada microtubo, ainda no banho-maria, foram adicionadas 0,5mL da solução de bácto ágar com DAE-dextrano.

3.4.12.3.2 *O plaqueamento*

Para plaquear, adicionou-se em um microtubo de 0,5mL: 25µL da suspensão de SRBC (1:2) + 100µL da suspensão de esplenócitos (amostra de cada animal) e 70µL de soro de cobaia (sistema complemento). Após fazer esta mistura de suspensões celulares, transferiu-se 50µL desta suspensão para o microtubo com bácto ágar, o qual foi submetido ao vórtex por cinco vezes e em seguida foi plaqueado 100µL em lâmina de histologia, previamente limpa com álcool 70°. Cuidadosamente foi colocada uma lamínula (22x22mm) sobre a gota. Aguardou-se de 3 a 5 minutos e a lamínula foi selada com esmalte incolor. As placas foram levadas à estufa a 37ºC por 3 horas. Após este período, os halos de lise dos SRBC

foram contados em microscópio de contraste de fase Nikon® e representados com número de PFC/105 esplenócitos.

3.4.13 **Avaliação do comportamento de ratos no campo aberto**

O campo aberto utilizado foi é composto por uma arena quadrada com 100cm de largura, 100cm de comprimento e 35cm de altura. A arena ficou no solo e foi filmada por uma câmara fixada no teto e ligada em um notebook com o software Any-maze® que fez as análises comportamentais. O campo aberto foi virtualmente dividido em três regiões quadradas (1ª, 2ª e 3ªzona) para avaliações dos parâmetros como um todo e separadamente em cada zona. Cada rato foi previamente ambientado na sala do teste por um período mínimo de três horas. Em seguida, cada animal foi colocado no centro da arena para o início das análises e permaneceu no campo aberto durante dez minutos. Dessa maneira, foram mensurados os seguintes parâmetros: distância total percorrida (m), velocidade média (m/s), tempo em movimento (s), tempo imóvel (s), ângulo de curva (s), velocidade máxima (m/s), número de rotações corporais, número de entradas na 1ª zona, distância percorrida na 1ª zona (m), tempo de permanência na 1ª zona (s), distância média da zona inicial (m), número de entradas na 2ª zona, distância percorrida na 2ª zona, tempo de permanência na 2ª zona, distância média da 2ª zona (m), número de entradas na 3ª zona, distância percorrida na 3ª zona (m), tempo de permanência na 3ª zona (s), distância média da 3ª zona (m), distância média da borda da 3ª zona (m).

3.4.14 **Avaliação do comportamento sexual de ratos machos**

O comportamento sexual foi avaliado baseado nos métodos descritos por Ågmo (1997). Para tanto foi utilizado um cilindro de Plexiglas® medindo 60cm de diâmetro e 60cm de altura. O piso foi coberto com uma camada de aproximadamente três centímetros de serragem de maravalha. Para a avaliação da

atividade sexual dos machos foram utilizadas fêmeas (uma fêmea para cada dois machos), sexualmente receptivas, previamente submetidas à ovariectomia. Após Vinte dias após a cirurgia, as fêmeas ovariectomizadas receberam injeção de 50µg de 17β estradiol e 2,0 mg/Kg de progesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do contato com os ratos machos a serem sexualmente avaliados. Cerca de 20 minutos antes desta observação, a receptividade de cada fêmea foi testada colocando-se um macho experiente para a realização de algumas montas e observação da presença de lordose nas ratas, ou seja, a presença simultânea de flexão côncava do dorso, desvio lateral da cauda e extensão do pescoço (SODERTEN et al., 1986). Antes do início dos tratamentos com mimosina, todos os machos foram deixados por 15 minutos com uma fêmea receptiva para a aquisição de experiência sexual.

Após 28 dias de tratamento com mimosina ou com H2O destilada (grupo controle) cada rato macho foi retirado de sua gaiola e colocado individualmente na arena cilíndrica de observação. Então, foram aguardados cinco minutos e em seguida, uma fêmea, sexualmente receptiva, foi introduzida na arena cilíndrica, dando início à observação do comportamento sexual do macho, que foi filmado até a primeira monta após a ejaculação ou até o tempo máximo de 40 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados para cada rato:

- latência para primeira monta (min): tempo decorrido desde a introdução da fêmea na caixa de observação até a primeira monta com ou sem intromissão vaginal;

- latência para primeira intromissão (min): tempo decorrido desde a introdução da fêmea na caixa de observação até a primeira monta com intromissão vaginal. A intromissão foi inferida pela observação do padrão motor característico, isto é, monta com movimento profundo da pélvis e desmonta rápida, acompanhado de lordose da fêmea, e após a desmonta observa-se a autolimpeza genital do macho e este não monta em seguida;

- freqüência de montas até a primeira ejaculação (montas/minuto): é a razão entre o total de montas e o tempo entre a primeira monta e a primeira ejaculação;

- freqüência de intromissões até a primeira ejaculação (intromissões/minuto): é a razão entre o número de intromissões e a latência para a primeira ejaculação;

- latência para a primeira ejaculação (min): tempo decorrido desde a introdução da fêmea na caixa de observação até a ejaculação menos a LPI, ou seja,

é o intervalo entre a primeira intromissão e a primeira ejaculação. Considera- se ejaculação uma monta com duração superior a dois segundos, lordose da fêmea, levantar e balouçar do tronco pelo macho com leve abertura dos membros toráxicos (posição de cristo redentor), seguida de ausência de interesse sexual nos minutos seguintes (período refratário – duração normal entre 4 a 8 min);

-latência para primeira monta pós-ejaculação (min): tempo decorrido desde a primeira ejaculação até a primeira monta;

- total de montas: número de montas completas do início da avaliação até a primeira ejaculação inclusive;

- total de intromissões: montas com intromissão vaginal até a primeira ejaculação, incluindo a intromissão ejaculatória;

- número de animais que ejacularam em relação ao total de animais por grupo;

- Eficiência copulatória (%): é o número de intromissões dividido pelo número total de montas até a primeira ejaculação vezes 100;

- Taxa copulatória: é o número de montas mais o número de intromissões dividido pelo tempo entre a primeira monta até a ejaculação.

3.4.15 **Análise estatística**

Para a análise estatística das avaliações comportamentais no campo aberto foi utilizado o software ANY-maze, e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seus respectivos desvios-padrões. Já para os demais parâmetros foi utilizado o software Prisma 5.0, e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seus respectivos erros-padrões.

Foi empregado o teste estatístico de Bartlet, para se verificar a homocedasticidade dos dados (GAD; WEIL, 1989). Caso os dados fossem paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA (SNEDCOR, 1946) para comparação das médias entre os vários grupos. Para detecção das diferenças significantes entre os grupos, após a ANOVA, o teste de escolha foi o de Dunnett, uma vez que todos os grupos apresentavam número de observações (n) aproximadamente semelhantes (GAD; WEIL, 1989). Caso os dados não fossem

paramétricos foi realizado o teste de Kruskall Wallis seguido do teste de Dunn. Para as análises de contingência foi realizado o teste exato de Fisher. A probabilidade de $p<0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

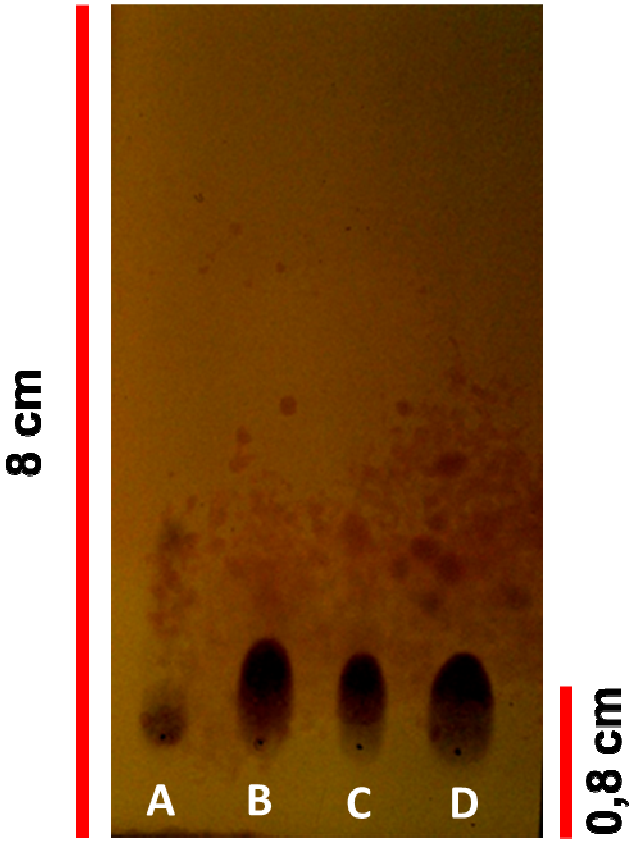
4.1 EXTRAÇÃO DA MIMOSINA DE L. leucocephala

Foram realizadas seis extrações e os extratos das duas primeiras extrações foram misturados e armazenados em um frasco de plástico translúcido. O mesmo procedimento foi realizado com os extratos obtidos das quatro últimas extrações, sendo, portanto, dois frascos com os extratos, ambos armazenados em um dessecador a vácuo, até as análises de identificação e quantificação da mimosina. Para cada 800g de pó de sementes de leucena, foram obtidos, em média, 20g de extrato em pó, portanto, o rendimento foi de 2,5% de extrato.

A identificação da mimosina foi realizada, em uma primeira análise, por cromatografia de camada delgada que revelou a presença do mesmo fator de retenção (Rf=0,1) dos extratos em relação à mimosina padrão Sigma® (Figura 4).

Em uma segunda análise, a mimosina foi identificada e quantificada pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Então, a mimosina padrão Sigma® apresentou um pico de 6,763 min, sendo considerado o seu grau de pureza acima de 98%. O extrato do primeiro frasco (mistura das extrações 1 e 2) apresentou um pico de 6,781 min e grau de pureza de 70%, o que representou o rendimento de 1,7% de mimosina pura para cada 800g de pó de semente. Já o extrato do segundo frasco (mistura das extrações 3, 4, 5 e 6) apresentou um pico de 6,756 min e grau de pureza de 92%, o que representou o rendimento de 2,3% de mimosina pura em 800g de pó de semente (Figura 5). Assim, considerando todas as seis extrações, foi possível extrair, aproximadamente, 101g de mimosina pura.

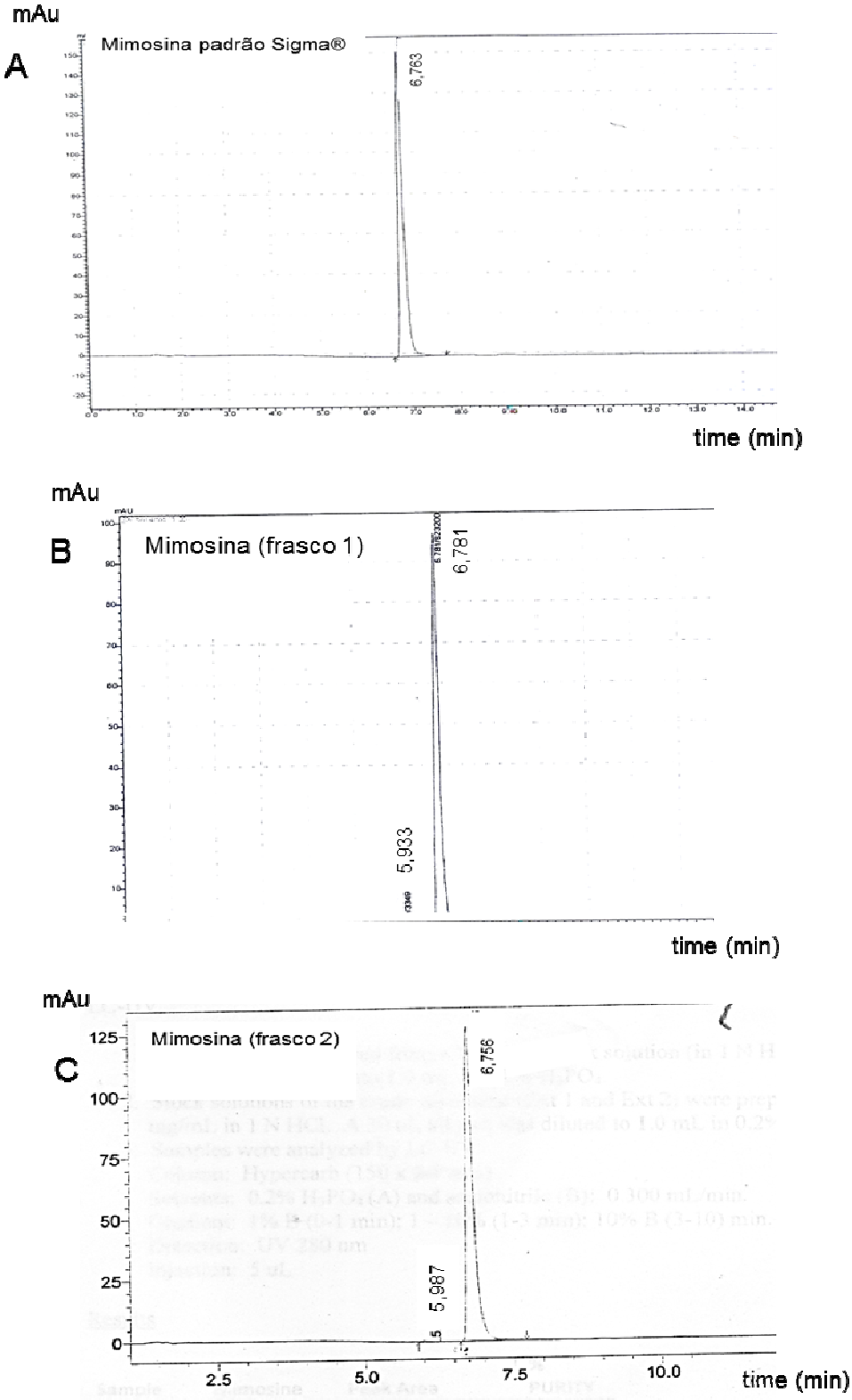
Figura 4 - Identificação da mimosina por cromatografia de camada delgada que indica a presença de mimosina nos extratos



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- extração teste com filme de PVC (controle negativo) indicando um Rf (fator de retenção) menor do que a mimosina padrão Sigma® mostrada em D; B e C- indicam os extratos, sendo que o Rf é igual ao da mimosina padrão Sigma® (Rf=0,1). Rf=dc/de, sendo dc= distância percorrida pelos componentes da mistura e de= distância percorrida pelo eluente (mimosina).

Figura 5 – Comparação dos cromatogramas obtidos pela técnica de HPLC



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- mimosina padrão Sigma®; B- mistura das extrações 1 e 2 (frasco 1); C- mistura das extrações 3, 4, 5 e 6 (frasco 2).

4.2 EXPERIMENTO 1: PROSPECÇÃO DE DOSES PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MIMOSINA ADMINISTRADA EM DOSES REPETIDAS, POR VIA ORAL, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS MACHOS

4.2.1 **Delineamento experimental**

Foram utilizados 26 ratos *Wistar*, machos, adultos, que foram separados em quatro grupos, os quais receberam, por gavage, durante 28 dias, as seguintes doses de mimosina: 0 (CO), 15mg/Kg (MI15), 25mg/Kg (MI25) e 45mg/Kg (MI45). O ganho de peso e o consumo de ração foram avaliados conforme item 3.4.3 e durante todo o período experimental, os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. No 29º dia de experimento, os animais foram anestesiados e coletou-se o sangue dos mesmos para avaliação hematológica e bioquímica, conforme itens 3.4.4 e 3.4.5. Após a coleta de sangue, os ratos foram submetidos à eutanásia. Procedeu-se então a avaliação macroscópica dos mesmos e a coleta de fragmentos de fígado, rins e a tireoide de dois animais de cada grupo, para avaliação histopatológica, conforme item 3.4.8.

4.2.2 **Resultados**

A tabela 1 mostra as avaliações do ganho de peso total, consumo de ração total, hemograma completo e dosagens bioquímicas séricas de ratos tratados com as diferentes doses de mimosina. Assim, em relação ao ganho de peso total e ao consumo de ração total, o teste estatístico de ANOVA não revelou haver diferenças significantes desses parâmetros entre os animais dos diferentes grupos. No entanto, esse mesmo teste mostrou haver diferenças das porcentagens de monócitos nos animais dos diferentes grupos ($p<0,05$; $F=2,620$; $df=25$) e o teste de Dunnet, subsequente, mostrou haver um aumento significante do número de monócitos dos animais do grupo MI25 em relação aos animais do grupo CO.

Por outro lado, a análise estatística de ANOVA realizada para as análises dos dados paramétricos, e o teste de Kruskal-Wallis para as análises dos dados não paramétricos, não mostraram haver diferenças significantes entre os animais dos diferentes grupos quando foram avaliados os demais parâmetros do hemograma (hematócrito, eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, plaquetas, VCM, HCM, CHCM, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos).

No entanto, ao serem analisados os parâmetros bioquímicos séricos, o teste de Kruskal-Wallis revelou haver diferenças da concentração de fosfatase alcalina entre os animais dos diferentes grupos ($p<0,05$) e o teste de Dunn, realizado na sequência, mostrou haver uma diminuição estatisticamente significante da enzima, nos animais dos grupos MI15 e MI25 em relação aos animais do grupo controle.

Em relação aos demais parâmetros bioquímicos séricos (uréia, creatinina, GGT, ALT, AST, proteínas totais, albumina, colesterol total e glicose) a ANOVA, realizada para os dados paramétricos, e o teste de Kruskal-Wallis, para os dados não paramétricos, não revelaram diferenças significantes entre os animais pertencentes aos grupos MI15, MI25 e MI45 em relação aos animais do grupo CO.

Na avaliação histopatológica, foram analisados os órgãos (fígado, rins e tireoide) de dois animais de cada grupo e observou-se que a tireoide dos animais do grupo CO estava dentro do padrão da normalidade, isto é, os folículos tireoidianos apresentavam epitélio cuboide normal e com maior quantidade de coloide nos folículos da periferia em relação àqueles da região medular, assim, o lúmen dos folículos da região medular era menor do que àqueles da periferia, e o epitélio glandular cuboide estava normal. No entanto, um entre dois ratos pertencentes aos grupos de animais tratados com mimosina, isto é, MI15, MI25 e MI45, apresentaram folículos dilatados com epitélio achatado na região medular e com grande quantidade de coloide, folículos dilatados com epitélio achatado na periferia e com grande quantidade de coloide, epitélio achatado na região medular e/ou periférica. Os ratos pertencentes ao grupo MI25 apresentaram alguns túbulos renais com material, possivelmente, hialino, já os animais do grupo MI45 apresentaram mais túbulos renais com essa alteração. Em contrapartida, os animais dos grupos CO e MI15 não apresentaram aquela deposição nos túbulos renais. O fígado dos animais dos diferentes grupos não apresentou nenhuma lesão digna de nota. Macroscopicamente, os órgãos dos animais dos diferentes grupos estavam normais.

Tabela 1 – Ganho de peso total, consumo de ração total, hemograma e bioquímica sérica dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 15 mg/kg (MI15), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões.

	CO n=6	MI15 n=6	MI25 n=7	MI45 n=7
Ganho de peso total	61,33±5,046	58,14±4,762	56,57±3,273	59,00±5,789
Consumo de ração total	657,3±12,89	651,4±18,12	653,0±12,16	661,5±7,912
Hemograma				
Hematócrito (%)	42,27±0,95	41,32±0,84	43,37±1,62	41,53±1,29
Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	7,763±0,2172	7,597±0,1595	7,903±0,3010	7,721±0,2336
Hemoglobina (g/dL)	15,62±0,3198	15,07±0,4104	15,61±0,5356	15,21±0,4026
VCM (μm^3)	54,67±0,4944	54,50±0,4282	54,86±0,4041	54,38±0,4605
HCM (pg)	20,15±0,1839	19,82±0,3736	19,77±0,1554	20,06±0,2419
CHCM (g/dl)	37,00±0,2394	36,47±0,7041	36,00±0,1589	36,41±0,2521
Leucócitos ($x10^3/mm^3$)	5,033±0,6391	4,500±0,3967	3,557±0,2399	4,100±0,3817
Neutrófilos (%)	23,33±1,820	28,67±6,103	22,57±3,046	22,43±3,015
[a]Eosinófilos (%)	0,1667±0,1667	0,3333±0,2108	2,286±0,6442	1,429±0,6117
[a]Basófilos (%)	0,6667±0,4944	0,1667±0,1667	2,286±0,6442	1,429±0,6117
Monócitos (%)	5,667±1,453	8,167±1,558	12,00±2,278*	7,143±1,164
Linfócitos (%)	70,17±2,023	62,67±5,678	62,71±2,504	69,00±2,600
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	550,5±102,4	605,5±36,20	589,6±83,02	480,3±109,7
Bioquímica sérica				
[a]Uréia (mg/dL)	49,17±2,469	56,50±3,731	53,43±3,854	46,00±0,7237
Creatinina (mg/dL)	0,5150±0,02320	0,5750±0,03766	0,5829±0,01936	0,5186±0,01010
[a]Fosfatase Alcalina (U/L)	283,0±36,40	232,3±17,04	146,0±9,53**	149,4±15,05*
[a]GGT (U/L)	1,717±0,312	0,617±0,168	0,900±0,1414	0,726±0,351
[a]AST (U/L)	224,7±37,06	195,3±25,85	204,7±9,383	285,7±15,24
ALT (U/L)	58,17±7,973	55,33±4,485	55,00±2,752	53,29±7,909
Proteínas totais (g/dl)	5,882±0,4094	6,218±0,3178	6,119±0,2014	6,011±0,4994
Albumina (g/dl)	2,233±0,06667	2,283±0,05426	2,329±0,04738	2,229±0,06442
[a]Colesterol total (mg/dL)	43,67±3,499	44,17±1,515	45,43±2,069	52,43±6,593
Glicose (mg/dL)	211,3±10,91	217,8±30,92	262,0±19,13	229,4±16,22

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos ;*p<0,05; **p<0,01 *versus* o grupo controle

4.3 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÕES DA TOXICIDADE DA MIMOSINA ADMINISTRADA EM DOSES REPETIDAS, POR VIA ORAL, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS MACHOS

4.3.1 **Delineamento experimental**

Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, adultos, que foram separados em quatro grupos, os quais receberam, por gavage, durante 28 dias, as seguintes doses de mimosina: 0 (CO), 25mg/Kg (MI25), 40mg/Kg (MI40) e 60mg/Kg (MI60). O ganho de peso e o consumo de ração foram avaliados conforme descrito no item 3.4.3 e durante todo o período experimental, os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. No 29º dia de experimento, que foi o final do período experimental, os animais foram anestesiados e coletou-se o sangue dos mesmos para avaliação hematológica e bioquímica, conforme descrito nos itens 3.4.4 e 3.4.5. Após a coleta de sangue, os ratos foram submetidos à eutanásia e procedeu-se a avaliação macroscópica dos mesmos, e logo em seguida, foram coletados fragmentos de fígado, rins e a tireoide para avaliação histopatológica conforme detalhado no item 3.4.8.

4.3.2 **Resultados**

A tabela 2 apresenta o ganho de peso total, consumo de ração total, hemograma completo e a bioquímica sérica dos ratos que foram tratados durante 28 dias com as diferentes doses de mimosina.

A análise estatística de ANOVA revelou haver diferenças significantes em relação à porcentagem de basófilos ($p<0,05$; $F=2,11$; $df=35$), de proteínas totais séricas ($p<0,0001$; $F=38,75$; $df=39$) e de albumina sérica ($p<0,0001$; $F=34,89$; $df=39$). A aplicação subsequente do teste de Dunnet mostrou uma diminuição significante da porcentagem de basófilos dos animais do grupo MI60, diminuição das

proteínas séricas totais e da albumina dos animais pertencentes aos grupos MI40 e MI60, em relação ao grupo CO.

Além disso, o teste de Kruskal-Wallis revelou haver diferenças significantes nos níveis de creatinina dos animais dos diferentes grupos ($p<0,0001$; número estatístico de Kruskal-Wallis=24,8). A aplicação posterior do teste de Dunn revelou haver um aumento significante desse parâmetro nos animais dos grupos MI40 ($p<0,01$) e MI60 ($p<0,05$) em relação àqueles do grupo CO.

Em relação aos demais parâmetros analisados (hematócrito, eritrócitos, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos, plaquetas, uréia, fosfatase alcalina, GGT, AST, ALT, colesterol total, triglicerídeos e glicose), a análise estatística ANOVA e o teste de Kruskal-Wallis não detectaram nenhuma diferença entre os animais dos grupos MI25, MI40 e MI60 em relação aos ratos do grupo CO.

Na avaliação histopatológica, foram analisados fragmentos de fígado, rim e tireoide dos animais de cada grupo e observou-se que a tireoide dos animais do grupo CO estava dentro do padrão da normalidade. No entanto, todos os animais tratados com mimosina, nas diferentes doses, isto é, 25, 40 e 60mg/Kg mostraram pelo menos uma das seguintes alterações na tireoide: folículos com necrose evidenciada por restos celulares e material hialino, folículos dilatados com epitélio achatado na região medular e com grande quantidade de coloide, folículos dilatados com epitélio achatado na periferia e com grande quantidade de coloide, epitélio achatado na região medular e/ou periférica e número aumentado de mastócitos (acima de quatro por campo) (Figuras 6, 7 e 8).

O teste Exato de Fisher revelou que os animais pertencentes aos grupos MI40 e MI60, mostravam aumento do número de folículos tireoidianos, quando comparado aos valores obtidos dos ratos do grupo controle; além disto, verificou-se que aqueles animais dos grupos tratados com as duas maiores doses de mimosina, apresentavam estes folículos necrosados, sendo que tal quadro não foi observado em nenhum animal do grupo controle. Esse mesmo teste estatístico mostrou que as tireoides dos animais dos três diferentes grupos tratados com a mimosina apresentaram aumento significante do número de mastócitos e de folículos dilatados com epitélio achatado que estavam presentes na região medular, quando comparados com os dados provenientes dos animais do grupo controle. Ainda, o teste exato de Fischer revelou que a tireoide dos animais dos grupos MI25 e MI60,

apresentaram aumento significante ($p<0,05$) de folículos dilatados com epitélio achatado que estavam presentes na região periférica, quando comparado com os ratos do grupo CO (Tabela 3).

Ao comparar os dados provenientes dos animais tratados com as diferentes doses de mimosina com aqueles do grupo CO, o teste Exato de Fisher não revelou haver diferenças significantes ($p>0,05$) no número de animais com material hialino nos túbulos renais (Tabela 3). A presença de material hialino nos túbulos renais está ilustrada pela figura 9. O fígado dos animais dos diferentes grupos, experimentais ou controle, não apresentou lesões, macro ou microscopicamente, dignas de nota.

Tabela 2 – Ganho de peso total, consumo de ração total, hemograma e bioquímica sérica dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões.

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
	n=10	n=10	n=10	n=10
Ganho de peso total	59,10 ± 5,09	52,40 ± 4,94	52,90 ± 6,81	52,40 ± 4,04
Consumo de ração total	641,6 ± 17,91	645,8 ± 24,10	636,5 ± 15,67	636,6 ± 29,39
Hemograma	n=9	n=9	n=8	n=10
Hematócrito (%)	41,03 ± 0,75	39,51 ± 1,21	39,49 ± 0,69	41,10 ± 0,41
Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	7,70 ± 0,1471	7,32 ± 0,23	7,28 ± 0,11	7,58 ± 0,07
[a]Hemoglobina (g/dL)	14,53 ± 0,24	13,96 ± 0,45	14,10 ± 0,22	14,58 ± 0,15
VCM (μm^3)	53,11 ± 0,35	54,00 ± 0,16	54,25 ± 0,41	54,10 ± 0,31
HCM (pg)	18,89 ± 0,17	19,03 ± 0,11	19,31 ± 0,16	19,23 ± 0,14
CHCM (g/dl)	35,43 ± 0,14	35,27 ± 0,21	35,66 ± 0,20	35,48 ± 0,10
Leucócitos ($x10^3/mm^3$)	3,37 ± 0,30	4,46 ± 0,41	2,93 ± 0,23	4,62 ± 0,38
Neutrófilos (%)	16,56 ± 2,36	20,67 ± 1,26	17,25 ± 1,74	21,00 ± 2,46
Eosinófilos (%)	1,20 ± 0,38	1,33 ± 0,44	0,75 ± 0,25	1,90 ± 0,45
Basófilos (%)	0,88 ± 0,38	0,44 ± 0,24	0,37 ± 0,26	0,00 ± 0,00 *
Monócitos (%)	6,44 ± 0,92	7,77 ± 0,99	5,37 ± 0,70	6,90 ± 0,93
Linfócitos (%)	74,78 ± 2,88	70,00 ± 1,55	76,25 ± 1,59	70,10 ± 2,38
[a]Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	633,8 ± 72,50	718,7 ± 46,94	653,0 ± 90,04	720,3 ± 23,02
Bioquímica sérica	n=10	n=10	n=10	n=10
Uréia (mg/dL)	53,40 ± 1,75	54,40 ± 2,33	52,00 ± 1,32	51,20 ± 1,66
[a]Creatinina (mg/dL)	0,62 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,82 ± 0,02 **	0,76 ± 0,03 *
Fosfatase Alcalina (U/L)	146,1 ± 7,29	146,2 ± 8,16	127,7 ± 7,07	139,7 ± 7,68
GGT (U/L)	0,96 ± 0,23	0,63 ± 0,29	0,50 ± 0,24	0,83 ± 0,21
AST (U/L)	153,9 ± 12,24	148,6 ± 15,73	147,1 ± 7,42	156,3 ± 15,22
ALT (U/L)	47,70 ± 2,59	46,10 ± 2,81	45,90 ± 2,39	51,10 ± 1,96
Proteínas totais (g/dl)	7,91 ± 0,12	8,06 ± 0,21	6,48 ± 0,10***	6,38 ± 0,11***
Albumina (g/dl)	4,04 ± 0,07	4,22 ± 0,09	3,42 ± 0,05***	3,39 ± 0,05***
Colesterol total (mg/dL)	65,80 ± 1,34	67,50 ± 2,63	70,30 ± 2,21	71,60 ± 2,34
Triglicerídeos (mg/dL)	85,50 ± 13,07	62,00 ± 7,76	62,40 ± 10,39	97,90 ± 12,96
Glicose (mg/dL)	289,0 ± 15,98	278,5 ± 11,83	305,5 ± 16,51	311,5 ± 12,60

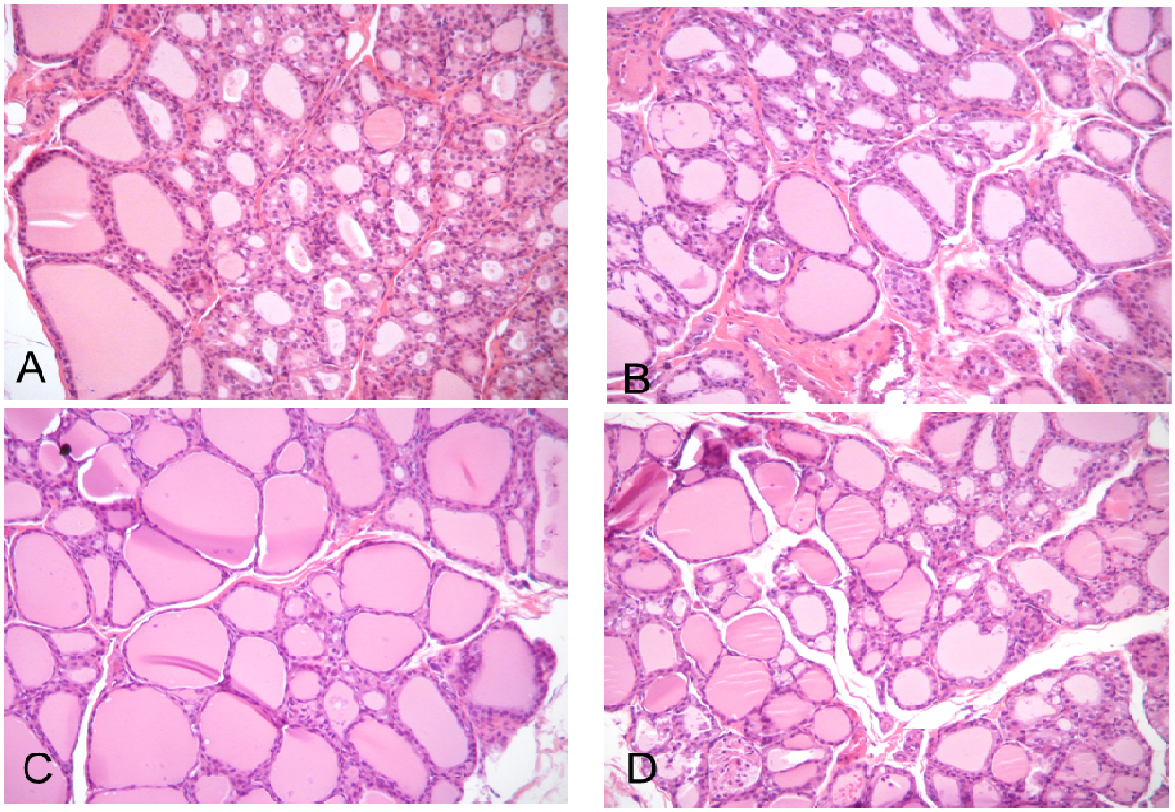
ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para os dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos,*p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001 *versus* o grupo controle.

Tabela 3 – Avaliação histopatológica da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentados o número de animais com as lesões. O número de animais analisados (n) está entre parênteses

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
Histopatologia				
Tireoide				
- Lesões histopatológicas	0 (10)	10 (10)*	10 (10)*	10 (10)*
- Necrose	0 (10)	3 (10)	4 (10)*	4 (9)*
- Medular: folículos dilatados com epitélio achatado	0 (10)	4 (10)*	3 (10)	6 (10)*
- Periferia: folículos dilatados e com epitélio achatado na periferia	0 (10)	5 (10)*	6 (10)*	7 (10)*
- Número aumentado de mastócitos	0 (10)	5 (10)*	5 (10)*	8 (10)*
Rim				
- Presença de material hialino nos túbulos	4(10)	6(10)	7(10)	7 (10)
- Quantidade de material hialino nos túbulos	+	++	++	++

*p<0,05; teste Exato de Fisher.
+ traços
++ pouco
+++médio
++++ muito

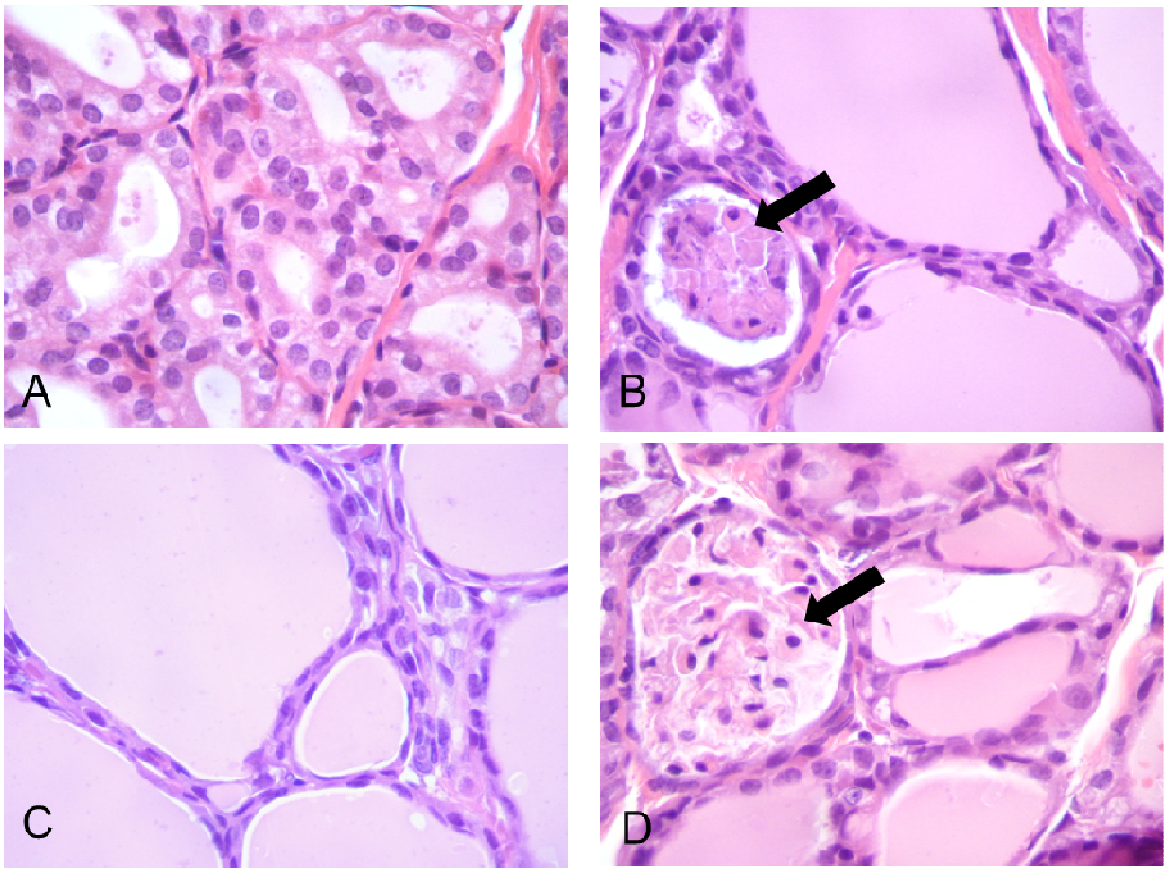
Figura 6 – Histopatologia da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- animal CO com folículos tireoidianos normais na região medular e periférica, e epitélio cuboide característico (H.E. 100x). B, C e D– animais dos grupos MI60, MI40 e MI25, respectivamente, notam-se folículos tireoidianos medulares dilatados com grande quantidade de colóide e células epiteliais achatadas (H.E. 100x).

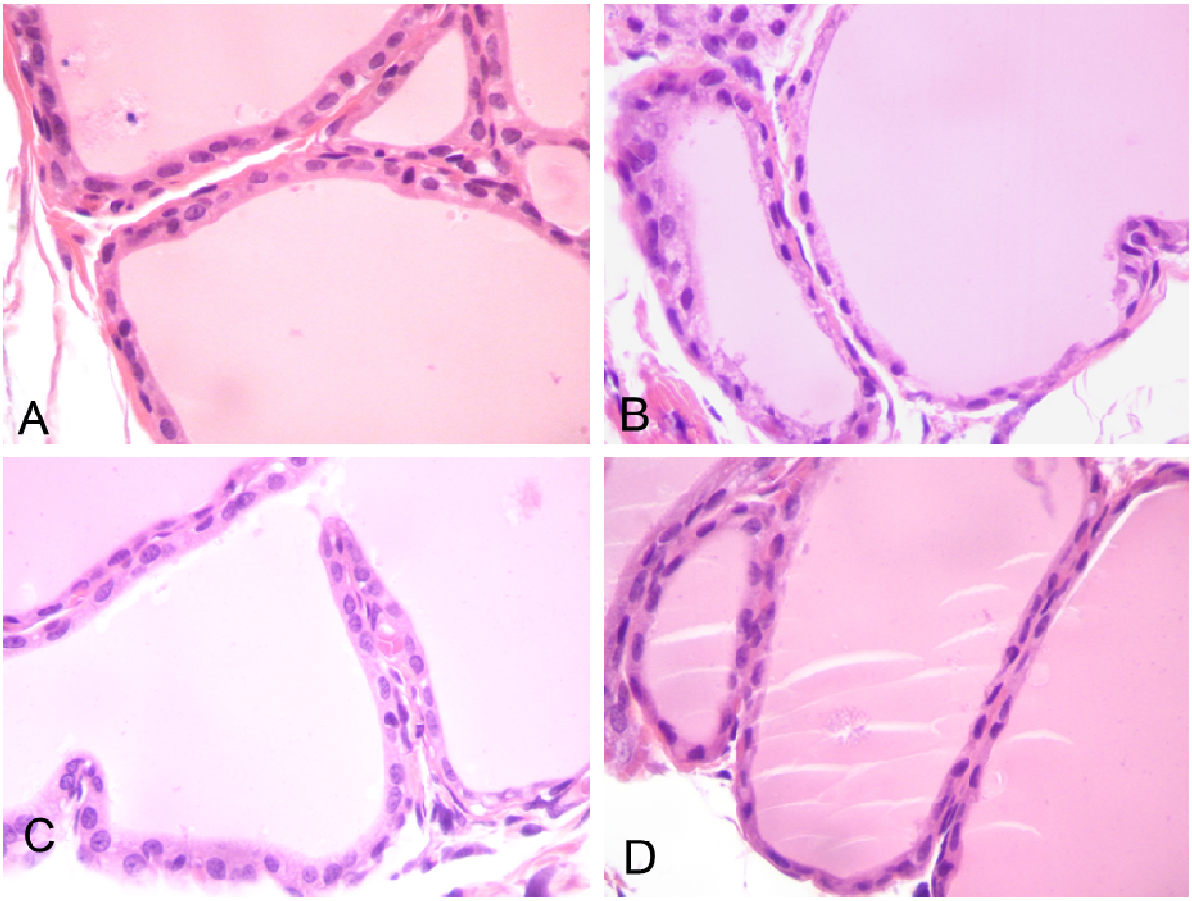
Figura 7 – Histopatologia da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- animal do grupo CO que apresenta folículos tireoidianos medulares com epitélio cuboide característico (H.E. 400x). B, C e D – animais dos grupos MI60, MI40 e MI25, respectivamente, notam-se epitélios achatados na região tireoidiana medular e as setas indicam necrose (H.E. 400x).

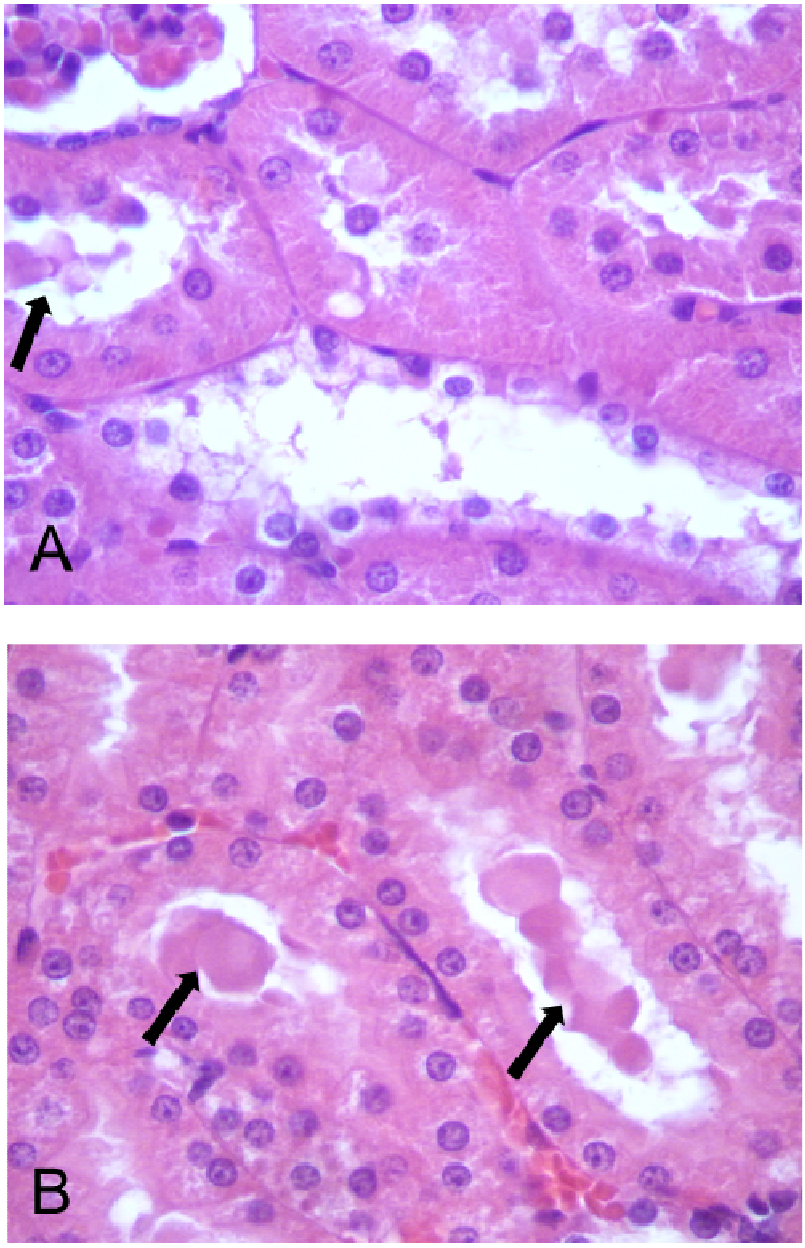
Figura 8 – Histopatologia da tireoide dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- animal do grupo CO que apresenta folículos tireoidianos periféricos com epitélio cuboide característico (H.E. 400x). B, C e D – animais dos grupos MI60, MI40 e MI25, respectivamente, notam-se epitélios achatados na região tireoidiana periférica (H.E. 400x).

Figura 9 – Histopatologia renal dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

Legenda: A- animal do grupo CO que apresenta túbulos renais com pouca deposição de material hialino no lúmen, B- animal do grupo MI60 que apresenta maior quantidade de material hialino no lúmen dos túbulos renais (H.E. 400x). As setas indicam o material hialino.

4.4 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR PELA OBSERVAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS, POR CITOMETRIA DE FLUXO, DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 28 DIAS

4.4.1 **Delineamento experimental**

Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, adultos, os quais foram separados em quatro grupos, nos quais os animais receberam, por gavage, durante 28 dias, as seguintes doses de mimosina: 0 (CO), 25mg/Kg (MI25), 40mg/Kg (MI40), 60mg/Kg (MI60). O ganho de peso e o consumo de ração foram avaliados conforme descrito no item 3.4.3 e, durante todo o período experimental, os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. No 29º dia de experimento, que foi o final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de macrófagos intraperitoneais e posterior avaliação da atividade de macrófagos intraperitoneais por meio da citometria de fluxo (conforme descrito no item 3.4.11). Além disso, foram coletados o timo e um fragmento do baço para avaliações histopatológicas.

4.4.2 **Resultados**

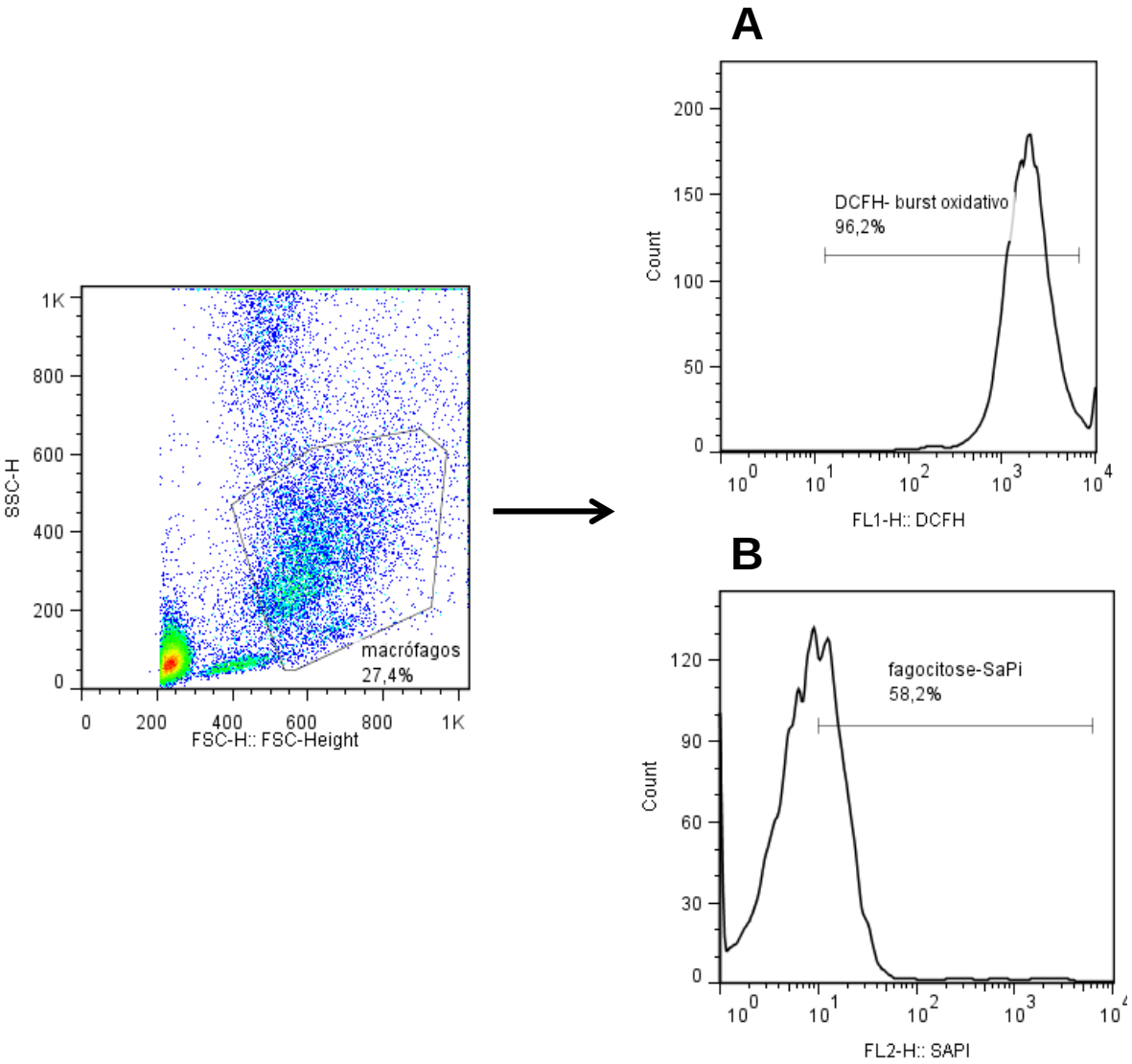
A tabela 4 mostra o ganho de peso total, o consumo de ração total, a atividade de macrófagos intraperitoneais: porcentagem de macrófagos com fagocitose de SAPI; intensidade de fagocitose (número de SAPI fagocitadas por macrófagos) e *“burst”* oxidativo (produção de água oxigenada basal ou induzida por PMA) dos ratos que foram tratados durante 28 dias com as diferentes doses de mimosina.

A análise estatística de ANOVA mostrou haver diferenças significantes na intensidade de fagocitose de macrófagos intraperitoneais entre os animais dos

diferentes grupos ($p<0,05$; $F=3,36$ e $df=36$). O teste de Dunnet, empregado na sequência, mostrou um aumento significante ($p<0,05$) da intensidade de fagocitose (número de SAPI fagocitadas por macrófagos intraperitoneais) dos ratos pertencentes aos grupos MI40 e MI60 em relação aos animais do grupo CO (Tabela 4 e Figura 11).

Por outro lado, a análise estatística de ANOVA ($p>0,05$) revelou não haver diferenças significantes nos demais parâmetros (ganho de peso total, consumo de ração total, *burst* oxidativo basal ou com PMA e porcentagem de macrófagos intraperitoneais) dos ratos dos grupos que receberam as diferentes doses de mimosina, quando comparado com os valores provenientes dos animais do grupo CO (Tabela 4). A figura 10 ilustra o esquema da seleção das populações de macrófagos intraperitoneais avaliados por citometria de fluxo nos experimentos de fagocitose de SAPI e "*burst*" oxidativo, além dos histogramas das análises do "*burst*" oxidativo e da fagocitose.

Figura 10 – Esquema da seleção das populações de macrófagos intraperitoneais avaliados por citometria de fluxo nos experimentos de fagocitose de SAPI e "*burst*" oxidativo



Fonte: (DIPE, V. V., 2013)

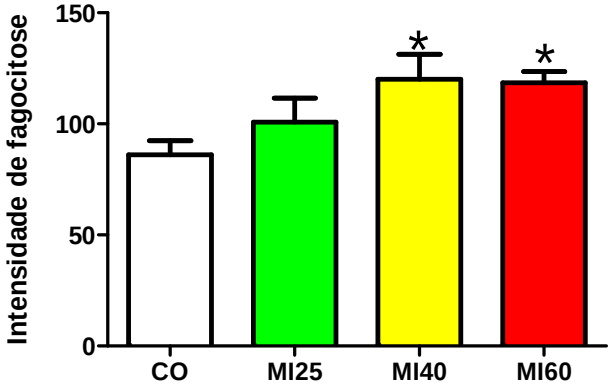
Legenda: A-histograma que ilustra a análise do "*burst*" oxidativo; B- histograma que ilustra a análise da fagocitose. A seta indica o fluxo de análise dos dados obtidos.

Tabela 4 – Ganho de peso total, consumo de ração total, atividade de macrófagos intraperitoneais: porcentagem de macrófagos com fagocitose; intensidade de fagocitose (número de *S. aureus* fagocitadas por macrófagos) e *"burst"* oxidativo (produção de água oxigenada basal ou induzida por PMA) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões.

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
	n=10	n=10	n=10	n=10
Ganho de peso (g)	58,92 ± 3,07	60,75 ± 3,50	56,67 ± 4,76	58,75 ± 2,65
Consumo de ração (g)	583,2 ± 9,90	578,5 ± 11,09	583,1 ± 12,16	564,3 ± 14 ,05
Fagocitose de SAPI (%)	67,9 ± 2,7	70,4 ± 3,9	72,1± 3,9	71,8 ± 3,4
Intensidade de fagocitose	86,0 ± 6,4	100,8 ± 10,8	120,1 ± 11,2*	118,6 ± 5,5*
***"Burst"* oxidativo**				
[a]H_2O_2 basal	744,1±150,3	868,8 ± 371,8	586,7 ± 229,9	697, 7 ± 369,1
H_2O_2 com PMA	1052 ± 71,12	1257 ± 164,9	1078 ± 170,6	1089 ± 106,9

*p<0,05 *versus* o grupo CO.
ANOVA seguida pelo teste de Dunnet

Figura 11 – Intensidade de fagocitose (número de *S. aureus* fagocitadas por macrófagos) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões



Legenda: ANOVA seguida pelo teste de Dunnet;* p<0,05

4.5 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL PELA OBSERVAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE A FORMAÇÃO DOS PFCS POR PLASMÓCITOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-SRBC NO BAÇO E PELA ANÁLISE DO TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-SRBC DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 28 DIAS

4.5.1 **Delineamento experimental**

Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, adultos, os quais foram separados em quatro grupos, um controle (CO) no qual os animais receberam H_2O destilada, durante 28 dias, por meio de gavage; e os demais grupos, nos quais os ratos receberam, pela mesma via, maneira e período de administração, as seguintes doses de mimosina: 25mg/Kg (MI25), 40mg/Kg (MI40), 60mg/Kg (MI60). O ganho de peso e o consumo de ração foram avaliados conforme descrito no item 3.4.3 e durante todo o período experimental, os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. No 29º dia de experimento, os animais foram submetidos à eutanásia para avaliação do PFC e do título de anticorpos anti-SRBC, conforme detalhado no item 3.4.12, além disso, coletou-se material para a avaliação histopatológica do timo e do baço.

4.5.2 **Resultados**

A tabela 5 mostra o ganho de peso total, consumo de ração total, peso relativo de timo, peso relativo de baço, celularidade de medula óssea, celularidade de baço, imunidade humoral (título de anticorpos e PFC) dos ratos tratados, durante 28 dias, com as diferentes doses de mimosina.

A análise estatística de ANOVA ($p>0,05$) não detectou diferenças significantes entre os animais dos diferentes grupos quando foram analisados os seguintes parâmetros: ganho de peso total, consumo de ração total, peso relativo de baço,

peso relativo de timo, PFC, celularidade de medula óssea e título de anticorpos anti-SRBC de carneiro.

A histopatologia de timo e baço dos animais dos diferentes grupos estavam dentro da normalidade.

Tabela 5 – Ganho de peso total, consumo de ração total, peso relativo de timo, peso relativo de baço, celularidade de medula óssea, celularidade de baço, imunidade humoral (título de anticorpos e PFC) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões.

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
	n=12	n=12	n=12	n=12
Ganho de peso total (g)	58,92 ± 3,07	60,75 ± 3,50	56,67 ± 4,76	58,75 ± 2,65
Consumo de ração total (g)	583,2 ± 9,90	578,5 ± 11,09	583,1 ± 12,16	564,3 ± 14 ,05
Peso relativo de timo (%)	0,11 ± 0,006	0,11 ± 0,004	0,10 ± 0,004	0,12 ± 0,005
Peso relativo de baço (%)	0,33 ± 0,016	0,32 ± 0,015	0,31 ± 0,012	0,30 ± 0,011
Celularidade de medula ($x10^7$)	12,26 ± 0,72	11,93 ± 0,42	13,09 ± 0,88	10,89 ± 0,53
Imunidade humoral				
Título de anticorpos	7,66±0,43	6,91 ± 0,33	7,58 ± 0 ,37	8,16 ± 0,42
PFC	219,5±45,70	254,6 ± 34,65	191,3 ± 37,07	140,0 ± 9,819

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet; p>0,05

4.6 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE OS HORMÔNIOS SÉRICOS DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

4.6.1 **Delineamento experimental**

Os ratos do experimento 4 (item 4.5) foram submetidos às dosagens hormonais séricas de testosterona, corticosterona, T3 e T4, conforme descrito no item 3.4.6.

4.6.2 **Resultados**

A tabela 6 mostra os níveis séricos dos hormônios (testosterona, corticosterona, T3 e T4) dos ratos que foram tratados durante 28 dias com as doses de 25mg/Kg (grupo MI25), 40mg/Kg (grupo MI40) e 60mg/Kg (grupo MI60) de mimosina em relação aos animais do grupo controle (CO) que não receberam mimosina.

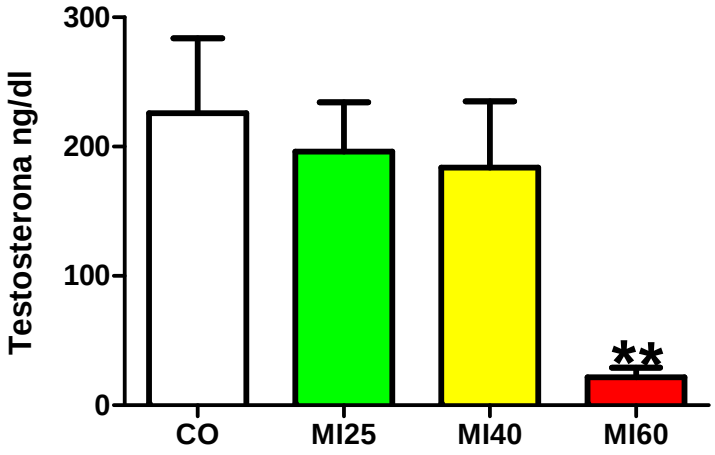
O teste de Kruskal-Wallis mostrou haver diferenças dos níveis séricos de testosterona entre os ratos dos diferentes grupos ($p<0,05$; número estatístico de Kruskal-Wallis=19,03). A aplicação do teste de Dunn, a seguir, revelou uma diminuição significante ($p<0,05$) dos níveis séricos de testosterona dos ratos do grupo MI60, em relação aos ratos do grupo CO (Tabela 6 e Figura 12). Por outro lado, o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significantes ($p>0,05$) entre os animais dos diferentes grupos quando foram avaliados os hormônios T3 e T4, e a ANOVA ($p>0,05$) também não revelou haver diferenças significantes dos níveis séricos de corticosterona entre os animais dos diferentes grupos.

Tabela 6 – Hormônios séricos (testosterona, corticosterona, T3 e T4) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
	n=12	n=12	n=12	n=12
Hormônios séricos				
[a]Testosterona (ng/dl)	226,1±57,84	196,5±37,85	184,0±51,16	22,00±7,22**
Corticosterona (ng/ml)	572,9±58,1	589,5±84,7	544,6±68,5	479,8±113,8
[a]T3 (ng/dl)	34,57±3,98	34,89±2,07	31,28±2,41	26,01±1,58
[a]T4 (ug/dl)	3,40±0,13	3,81±0,15	3,72±0,16	2,934±0,20

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para os dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo testede Dunn para os dados não paramétricos; **p<0,01 *versus* o grupo CO.

Figura 12 – Nível sérico de testosterona (ng/dl) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões



Legenda: Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn; **p<0,01.

4.7 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MIMOSINA SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS TRATADOS POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

4.7.1 **Delineamento experimental**

Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, adultos, os quais foram separados em quatro grupos, nos quais os animais receberam, por gavage, durante 28 dias, as seguintes doses de mimosina: 0 (CO), 25mg/Kg (MI25), 40mg/Kg (MI40), 60mg/Kg (MI60). O ganho de peso e o consumo de ração foram avaliados conforme descrito no item 3.4.3 e durante todo o período experimental, os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. Os tratamentos foram iniciados em dois animais de cada grupo por dia (total de oito animais) durante cinco dias consecutivos (total de 40 animais sendo 10 animais de cada grupo). No 31º dia

de experimento, os ratos foram avaliados quanto ao comportamento sexual conforme detalhado no item 3.4.14.

4.7.2 **Resultados**

A tabela 7 mostra o peso corporal ao final do tratamento, ganho de peso total, consumo de ração total, pesos relativos (rins, fígado, testículos e baço) dos ratos que foram tratados durante 28 dias com as doses de mimosina. A ANOVA ($p>0,05$) não revelou haver diferenças significantes desses parâmetros entre os animais dos diferentes grupos tratados com a mimosina quando foram comparados com aqueles pertencentes ao grupo CO.

A tabela 8 mostra os parâmetros do comportamento sexual dos ratos que foram tratados durante 28 dias com as doses de 25mg/Kg (grupo MI25), 40mg/Kg (grupo MI40) e 60mg/Kg (grupo MI60) de mimosina em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas H_2O destilada (CO). A ANOVA revelou haver diferenças significantes no número de montas ($p<0,05$; $F=4,0$ e $df=39$) e no intervalo entre montas ($p<0,01$; $F=4,91$ e $df=35$) dos animais pertencentes aos diferentes grupos. O teste de Dunnet, realizado em seguida, mostrou haver uma diminuição significante do número de montas e um aumento significante do intervalo entre montas dos ratos dos grupos MI40 e MI60 em relação aos ratos do grupo CO (Tabela 8 e Figura 13).

No entanto, a análise estatística de ANOVA não detectou diferenças entre os dados provenientes dos animais tratados com mimosina em relação aqueles do grupo CO quando foram avaliados o nº de intromissões, intervalo entre intromissões (min), eficiência copulatória (%), latência para a primeira ejaculação e latência para a primeira monta pós-ejaculação. O teste de Kruskal-Wallis também não detectou diferenças significantes ($p>0,05$) entre os ratos que receberam mimosina em relação aqueles do grupo CO, quando foram avaliadas a latência para a primeira monta e a latência para a primeira intromissão. Em relação ao número de ratos que ejacularam, o teste Exato de Fischer não mostrou diferenças significantes entre os animais tratados com mimosina quando comparados com aqueles do grupo CO (Tabela 8).

Tabela 7 – Peso corporal ao final do tratamento, ganho de peso total, consumo de ração total, pesos relativos (rins, fígado, testículos e baço) dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
	n=5	n=5	n=5	n=5
Consumo de ração (g) por dois animais	1344±55,72	1355±27,07	1350±18,18	1328±28,79
	n=10	n=10	n=10	n=10
Peso corporal (g)	367,4±8,61	366,5±9,97	371,8± 5,96	354,6±9,81
Ganho de peso total (g)	51,60±3,50	45,50±5,22	50,50± 3,36	43,40±3,53
Peso renal relativo (%)	0,011±0,000	0,011±0,000	0,010±0,000	0,011±0,000
Peso hepático relativo (%)	3,45±0,08	3,46±0,092	3,34±0,05	3,31±0,06
Peso testicular relativo (%)	0,48±0,015	0,47±0,014	0,48±0,010	0,49±0,010
Peso relativo de baço (%)	0,11±0,004	0,12±0,004	0,12±0,004	0,13±0,004

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. $p>0,05$.

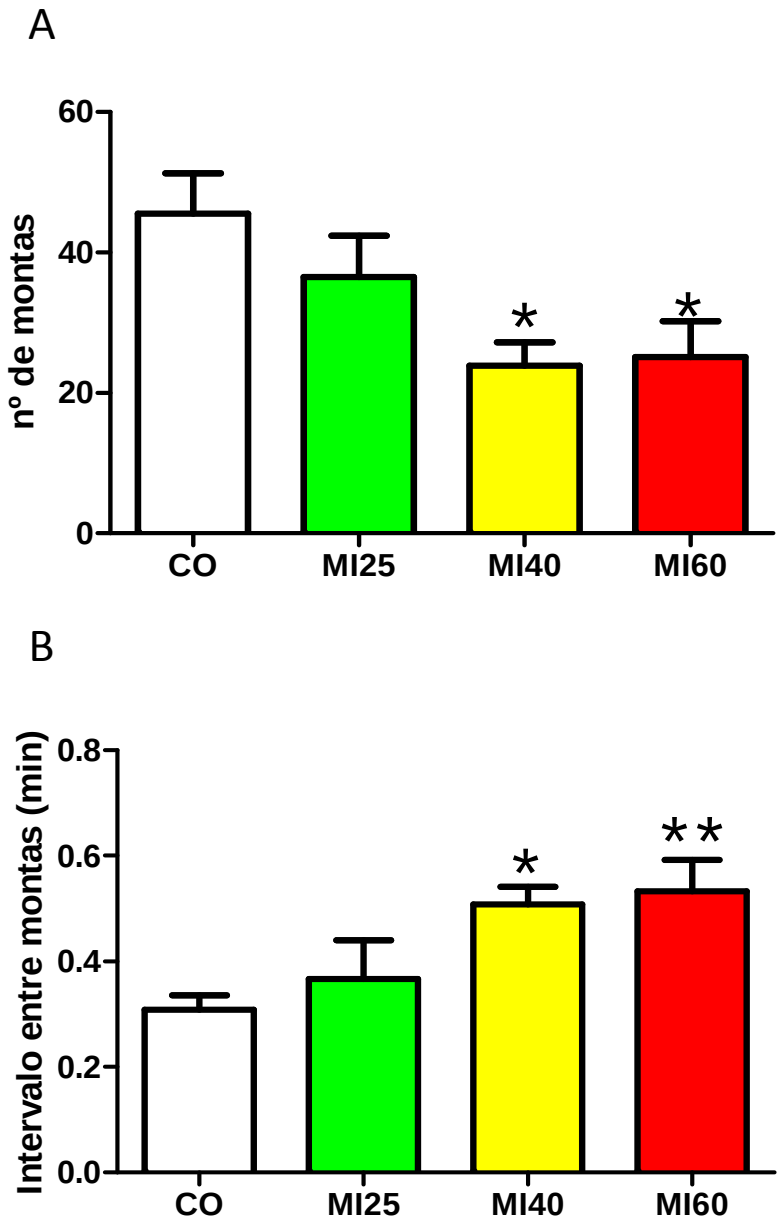
Tabela 8 – Comportamento sexual dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
	n=5	n=5	n=5	n=5
Comportamento sexual				
- Nº de montas	45,50±5,77	36,50±5,88	23,90±3,25*	25,10±5,10*
- Intervalo entre montas (min)	0,30±0,02	0,36±0,07	0,50±0,03*	0,53±0,05**
- Nº de intromissões	8,90±0,79*	5,20±1,13	7,20±0,75	6,10±0,67
- Intervalo entre intromissões (min)	1,72±0,34	1,88±0,33	1,84±0,35	2,14±0,42
- Eficiência copulatória (%)	3,54±1,23	-18,25±15,68	3,26±0,21	3,11±0,19
- [a]Latência para a 1ª monta (min)	1,46±0,87	1,30±0,37	1,57±0,37	1,33±0,34
- [a]Latência para a 1ª intromissão (min)	2,61±0,81	5,18±2,54	1,92±0,35	3,64±1,50
- Latência para 1ª ejaculação (min)	13,86±2,47	13,25±2,26	11,82±1,51	12,09±2,12
- Latência para a 1ª monta pós-ejaculação (min)	6,28±0,48	5,76±0,31	5,70±0,26	5,437±0,25
- [b]Nº ejacularam/total de animais	9/10	7/10	10/10	10/10

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para os dados paramétricos; [a]Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos; [b]Teste Exato de Fisher para análise de contingência; *p<0,05; **p<0,01 *versus* grupo CO

.

Figura 13 – Número de montas até a ejaculação e intervalo entre montas dos ratos que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os erros-padrões



Legenda: A- número de montas até a ejaculação; B- Intervalo entre montas. ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. *p<0,05; ** p<0,01.

4.8 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO NO CAMPO ABERTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS MACHOS EXPOSTOS ÀS DIFERENTES DOSES DE MIMOSONIA DURANTE 28 DIAS

4.8.1 **Delineamento experimental**

Os animais do experimento 6 (item 4.7) também foram submetidos a avaliação do comportamento no campo aberto (conforme descrito no item 3.4.13).

4.8.2 **Resultados**

A tabela 9 mostra os resultados provenientes da avaliação, no campo aberto, de parâmetros locomotores de ratos tratados, durante 28 dias, com as doses de 0mg/Kg, 25mg/Kg (grupo MI25), 40mg/Kg (grupo MI40) e 60mg/Kg (grupo MI60) de mimosina. A análise estatísitica de ANOVA ($p<0,05$; $F=28,5$; $df=39$) mostrou haver diferenças significantes entre os ratos dos diferentes grupos quando se avaliou a distância média da borda da terceira zona. O teste de Dunnet ($p<0,05$) subsequente revelou haver o aumento dessa distância nos animais pertencentes ao grupo MI60 em relação aos animais do grupo CO. No entanto, a análise estatística de ANOVA ($p>0,05$) não revelou diferenças entre os animais dos diferentes grupos quando foram avaliados os seguintes parâmetros: distância percorrida (m), velocidade média

(m/s), tempo em movimento (s), tempo imóvel (s), ângulo de curva (º), velocidade máxima (m/s), rotações corporais, número de entradas na zona inicial, distância percorrina na 1ª zona (m), tempo na 1ª zona (s), distância média da zona inicial (m), número de entradas na 2ª zona, distância percorrida na 2ª zona, tempo na 2ª zona, distância média da 2ª zona (m), número de entradas na 3ª zona, distância percorrida na 3ª zona (m), tempo na 3ª zona (s), distância média da 3ª zona (m).

Tabela 9 – Avaliação de parâmetros de atividade locomotora, avaliada no campo aberto, dos rato que foram tratados, durante 28 dias, com 0 (CO), 25 mg/kg (MI25), 40 mg/kg (MI40) e 60 mg/kg (MI60) de mimosina. São apresentadas as médias e os desvios padrões

	CO	**MI25**	**MI40**	**MI60**
Campo aberto	n=10	n=10	n=10	n=10
- Distância percorrida (m)	42,86±16,38	36,95±18,69	47,89±16,25	43,07±14,24
- Velocidade média (m/s)	0,07±0,02	0,06±0,03	0,07 ±0,02	0,07±0,02
- Tempo em movimento (s)	254,52±98,58	230,02±117,0	286,33±84,94	261,98±75,13
- Tempo imóvel (s)	345,48±98,58	370,00±117,06	313,67±84,94	338,03±75,15
- Ângulo de curva (º)	20414±7730	17911±7797	21642±7106	20342±6418
- Velocidade máxima (m/s)	0,73±0,19	0,66±0,13	0,67±0,09	0,72±0,14
- Rotações corporais	15,40±6,40	13,70±6,65	17,90±7,03	16,80±6,48
- Número de entradas na zona inicial	5,50±2,55	4,40±3,92	9,60±6,70	8,90±6,98
- Distância na 1ª zona (m)	0,67±0,34	0,53±0,47	1,06±0,95	0,89±0,52
- Tempo na 1ª zona (s)	6,92±4,25	7,32±6,11	14,73±14,00	11,47±6,77
- Distância média da zona inicial (m)	0,39 ±0,02	0,39±0,039	0,36±0,05	0,35±0,03
- Número de entradas na 2ª Zona	19,20±11,96	17,10±12,10	26,20±18,24	26,50±14,10
- Distância percorrida na 2ª zona	4,28±3,18	3,80±2,61	6,00±4,53	5,78±3,08
- Tempo na 2ª zona	25,61±16,04	26,61±19,91	48,06±43,76	50,87±31,09
- Distância média da 2ª zona (m)	0,20 ±0,01	0,19±0,02	0,18±0,03	0,17±0,01
- Número de entradas na 3ª zona	13,80±10,18	12,80±8,27	16,70±12,00	17,30±7,90
- Distância percorrida na 3ª zona (m)	37,89±13,81	32,61±16,33	40,81±14,87	36,38 ±11,49
- Tempo na 3ª zona (s)	566,68±19,69	564,37±25,26	535,77±57,21	536,16±35,85
- Distância média da 3ª zona (m)	0,09±0,03	0,10±0,02	0,10±0,01	0,09±0,01
- Distância média da borda da 3ª zona (m)	0,053 ±0,008 0 1	0,0555±0,0082	±0,010 0,06 7	0,063 ±0,006*

ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. *p<0,05 *versus* grupo CO.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A *L.leucocephala* possui grande quantidade de mimosina, sua principal toxina, que, conforme a variedade da planta, que até hoje já são catalogadas ao redor de cem dentro desta espécie, pode apresentar-se em diferentes concentrações (BREWBAKER; HYLIN, 1965). Da mesma maneira, sabe-se que a quantidade desta toxina varia grandemente ao se considerar as diferentes partes da planta (ADENEYE, 1991; ESCOBAR et al., 1998). Uma vez que se sabe que a maior concentração de mimosina está nas folhas jovens e nas sementes da *L.leucocephala* (FRANZOLIN NETO; VELLOSO, 1987; ADENEYE, 1991; XUAN; TAWATA; KHANH, 2013), optou-se, neste presente estudo, por extrair a mimosina das sementes da planta, devido a maior facilidade de coleta das vagens em relação às folhas jovens.

O rendimento médio das extrações nesta pesquisa foi de 2,3% de mimosina pura, o que corrobora fortemente os resultados da pesquisa de Xuan, Tawata e Khanh (2013), que obtiveram 2,38% de mimosina de sementes maduras de *L. leucocephala*, mesmo utilizando uma metodologia diferente daquela aqui realizada. Por outro lado, Spenser e Notation (1962), empregando um método no qual apresenta como vantagem a pouca quantidade de solvente, extraíram somente 1,2% deste aminoácido não proteico, também das sementes da leucena. No entanto, não é possível afirmar que a técnica aqui empregada para a extração da mimosina apresenta vantagem comparada a esta última, empregando-se menos solvente, haja vista que, como já comentado, se sabe que há grande variação na concentração de princípios ativos nas plantas, sendo que estes estão atrelados a alguns fatores como genéticos, variação sazonal, tipo e fertilização de solo, uso de herbicidas e distribuição geográfica (HARAGUCHI; GORNIAK, 2008); portanto, não se pode descartar que neste estudo no qual se obteve baixa concentração de princípio ativo seja devido à pouca concentração de mimosina nas amostras estudadas.

Um dos grandes desafios dos toxicologistas é a escolha da dose correta para as avaliações de toxicidade. De fato, há quase 500 anos, Paracelsius (1493-1591) já postulava que todo composto possui um potencial tóxico, sendo que a diferença do veneno para o remédio é a dose (GALLO, 2008). Neste sentido, deve-se considerar

que quanto maior a dose/concentração do agente tóxico, certamente maior será o risco de intoxicação; no entanto, é necessário empregar doses que sejam factíveis com a possibilidade de exposição real do indivíduo. Além disto, é importante considerar outros parâmetros que influenciam diretamente a toxicidade, como a duração e frequência de exposição, a via de exposição e a susceptibilidade da espécie (LANGMAN; KAPUR, 2006).

Em relação a estes últimos parâmetros que estabelecem as condições de exposição, já havia sido determinado que no presente estudo iria ser empregado o rato como modelo animal, pois é a espécie de escolha em estudos de toxicologia (IPCS, 1996; OECD, 1998a; OECD, 2008), a via de exposição escolhida seria a oral, via natural de intoxicação por *L.leucocephala*, e optou-se ainda por realizar a administração em doses repetidas, durante 28 dias, conforme protocolo proposto pela OECD (OECD, 2008). No entanto, faltava ainda estabelecer o principal parâmetro, a dose a ser empregada. Para tal, houve a necessidade da busca de informações para que fossem determinadas as doses que seriam utilizadas nos experimentos referentes ao estudo aqui proposto.

Uma busca na literatura revelou que até o presente momento não haviam sido realizados estudos que indicassem a DL_{50} da mimosina. Da mesma maneira, neste levantamento bibliográfico muito poucos foram os dados encontrados relativos à toxicidade da mimosina administrada em ratos. Num destes raros estudos, verificou-se que a adição de 1,5% de mimosina na ração de ratas adultas, o que corresponderia a aproximadamente 526,5mg/Kg p.v/dia, produziu perda de peso significante e também a inibição do ciclo estral (HYLIN; LICHTON, 1965). Ainda, outra pesquisa encontrada mostrou que a administração de 0,3, 0,5 e 0,7% de mimosina na ração, correspondendo, respectivamente, ao consumo de, aproximadamente, 188, 270 e 307 mg/kg p.v/dia de mimosina por ratas gestantes, durante toda a gestação, produziu nas fêmeas, dos três diferentes grupos experimentais, queda drástica no consumo de ração e perda de peso significante, demonstrando, portanto, que estas doses empregadas foram muito elevadas (DEWREEDE; WAYMAN, 1970).

Outro trabalho, conduzido por El-Harith, Schart e Meulen (1979), revelou que ratos jovens alimentados com uma dieta de 25% de leucena, o equivalente ao consumo diário de 383mg/kg de mimosina, durante 21 dias, apresentaram diarréia,

retardo no crescimento, diminuição no consumo de ração, alopecia, catarata e ausência de movimentos em membros posteriores.

Finalmente, em um trabalho mais recente, no qual se objetivou avaliar a natriurese em ratos machos da linhagem *Sprague Dawley*, administrou-se mimosina na dose de 50mg/Kg p.v./dia, em doses repetidas, durante duas semanas, por via intraperitoneal. Sendo que neste estudo os autores não relataram efeitos tóxicos do aminoácido não proteico (LI et al., 2007).

Como o objetivo do presente estudo seria o de empregar doses de mimosina que não produzissem qualquer sintomatologia clínica, uma vez que aqui se pretendia avaliar alterações mais sutis e, possivelmente, mais precoces dos efeitos desta fitotoxina, seja no sistema endócrino ou imune, optou-se, numa primeira etapa, por utilizar doses iniciais abaixo de 50mg/Kg p.v./dia, a qual, conforme indicado na literatura, não promoveria alterações drásticas; além disto, verificou-se que em estudos anteriores, as doses empregadas foram extremamente elevadas e não correspondiam à situação de risco aqui desejada. Dessa maneira, foram escolhidas nesta pesquisa, inicialmente as doses de 15, 25 e 45mg/Kg p.v/dia.

No entanto, as avaliações deste estudo “piloto”, mostraram que seria necessário ajustar para doses um pouco mais elevadas; portanto, a partir destes dados, propôs-se trabalhar com a administração de 25, 40 e 60mg/Kg de mimosina aos ratos. Assim, embora estas doses de mimosina, da mesma maneira que anteriormente verificado, não produzissem alterações clínicas, diminuição do consumo de ração e do ganho de peso, foi possível detectar alguns efeitos tóxicos, primeiramente identificados pela análise histopatológica.

Estudos anteriores propuseram que a *L.leucocephala* é uma planta que causa lesões tireoidianas com consequente desenvolvimento de bócio em ruminantes (HOLMES et al., 1981; JONES; HEGARTY, 1984; HAMMOND, 1995; PEIXOTO et al., 2008), mas não em animais monogástricos que eram avaliados apenas quanto às manifestações clínicas de bócio, sendo que não eram realizadas avaliações histopatológicas da tireoide, que poderiam revelar lesões iniciais características de bócio em desenvolvimento.

Surpreendentes foram os achados histopatológicos realizados neste estudo em que à microscopia verificou-se que a mimosina, administrada nas diferentes doses, produzia alterações consistentes na tireoide de ratos, evidenciadas por necrose, presença de folículos distendidos com epitélio achatado, maior número de

mastócitos e principalmente um grande acúmulo de coloide na região medular da glândula.

Deve-se salientar que tais achados são os primeiros a serem descritos em monogástricos e rompem um paradigma de mais de trinta e cinco anos, já que, desde as primeiras descrições sobre a toxicidade da *L.leucocephala*, vinha sendo proposto que a mimosina, *de per se* não provocaria alterações em tireoide de não ruminantes, conforme brevemente mencionado por Hegarty, Christie e Lee (1976). Reiterou esta suposição, outro estudo conduzido por estes mesmos autores, três anos mais tarde (HEGARTY et al., 1979), os quais administraram, durante vinte semanas, ração com 0,5% de mimosina, correspondendo a aproximadamente 1250mg/Kg p.v./dia, em camundongos *Swiss*, e verificaram diminuição no ganho de peso desses animais, porém não observaram qualquer alteração histológica na tireoide, nem o desenvolvimento de bócio. No entanto, quando esses autores administraram o 3,4 DHP em outros camundongos, notaram lesões na tireoide e sinais clínicos de bócio.

Portanto, estes pesquisadores concluíram que o 3,4 DHP seria o agente bociogênico e não a mimosina, pois, como a transformação desta fitotoxina em 3,4 DHP ocorreria somente no rúmen (JONES; MEGARRITY, 1986), os monogástricos estariam livres de tal toxicidade. Neste momento não seria possível propor qual seria a razão para a discrepância destes resultados aqui verificados com aqueles apresentados pelos trabalhos realizados por Hegarty e colaboradores. No entanto, um fator muito relevante que deve ser considerado é a espécie animal distinta, empregada como modelo experimental na pesquisa anterior (camundongos) e no presente estudo (ratos). Assim, futuros estudos serão realizados, com outras espécies de animais monogástricos, como o coelho, para melhor identificar como estes efeitos tireotóxicos relatados na presente pesquisa poderiam ser produzidos.

As lesões da tireoide observadas nos experimentos, aqui discutidos, são típicas de tireoides hipofuncionais, portanto, seria o esperado verificar alterações na avaliação da função tireoidiana, ou seja, uma diminuição dos hormônios T3 e T4. Mas tal expectativa não foi confirmada, já que a análise estatística não detectou diferenças nos valores obtidos entre os animais expostos à mimosina e aqueles dos ratos do grupo controle. Por outro lado, deve-se considerar que embora estatisticamente não tenha sido verificada a diferença nos níveis dos hormônios tireoidianos, houve uma diminuição de, aproximadamente, 25% destes, em relação

aos valores obtidos nos ratos do grupo controle. Portanto, pode-se supor que um período de exposição mais prolongado à mimosina deve levar à hipofuncionalidade das tireoides. Assim, também planejam-se futuros experimentos, tomando-se como protocolo aquele sugerido pela OECD para avaliação sub-crônica de xenobióticos, com administrações orais durante 90 dias (protocolo OECD 408), ou o protocolo OECD 452, no qual se realiza avaliações crônicas de 6, 9 e 12 meses (OECD, 1998a,b).

Uma hipótese plausível para justificar os efeitos tóxicos da mimosina na tireoide aqui encontrados, seria a possibilidade de que esta fitotoxina possa estar diminuindo a reabsorção do colóide acumulado no interior dos folículos, esse acúmulo provoca o aumento da pressão intrafolicular e, consequentemente, o epitélio é pressionado e fica achatado. Ainda, é possível supor que esse mecanismo seja devido à substituição da tirosina pela mimosina durante a formação do principal componente do colóide, que é a tireoglobulina. Neste sentido, sabe-se que para que ocorra a formação dos hormônios tireoidianos é necessário que a tireoglobulina seja reabsorvida pelas células epiteliais do folículo, e posteriormente sofra proteólise para a formação e liberação dos hormônios T3 e T4. No entanto, quando na presença da mimosina, é possível que nem toda a tireoglobulina esteja sendo reabsorvida.

Em relação à necrose ocorrida nos folículos tireoidianos, é bem conhecida a presença desta lesão em casos de bócio em desenvolvimento, e sabe-se que nesta condição em que há o acúmulo de coloide nos folículos, alguns tirócitos aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio que danificam as membranas celulares e também o DNA destas células, assim advém a morte celular evidenciada por restos celulares no interior dos folículos. Isso ocorre, *a priori,* como um mecanismo de defesa na tentativa de impedir o crescimento demasiado da tireoide (MUTAKU et al., 2002).

Além disto, outra possibilidade que posteriormente deverá ser investigada no sentido de esclarecer estes efeitos danosos da mimosina na tireoide de ratos seria a biotransformação de mimosina em 3,4 DHP no trato gastrintestinal de ratos. Tal possibilidade pode ser considerada, uma vez que um estudo no qual se administrou a ratos a prunasina, um glicosídeo cianogênico, o qual se imaginava liberar cianeto somente por enzimas presentes na flora ruminal, produziu intoxicação aguda com sinais clássicos de intoxicação cianídrica (GÓRNIAK et al., 1993). Portanto, pode-se teorizar que, da mesma maneira, a mimosina possa ser degradada no trato

gastrintestinal de ratos, por enzimas semelhantes àquelas encontradas na flora ruminal, produzindo o 3,4 DHP e este promover a ação lesiva nas tireoides.

Vários são os estudos que mostram inequivocamente que toxicantes em doses baixas causam injúrias no sistema imune antes de qualquer alteração ou comprometimento no funcionamento normal de outros órgãos e tecidos, nos quais em doses mais elevadas deste agente tóxico tornam-se bastante sensíveis (KAMINSKI; KAPLAN; HOLSAPPLE, 2008). Considerando que a mimosina é um agente anti-mitótico e capaz de inibir reversivelmente a fase G1 do ciclo celular (LALANDE; HANAUSKE-ABEL, 1990), pode-se supor que esta toxina promoveria alteração no sistema imune. Ainda, suportam esta conjectura, os estudos conduzidos por Frydas et al. (2003), os quais demostraram, numa pesquisa conduzida em ratos, que a mimosina reduziu granulomas cutâneos. Além disso, outro estudo, realizado em camundongos, revelou que esta fitotoxina da *L.leucocephala* promoveu a inibição da expressão de quimiocinas MCP1 a qual, se sabe, promove o recrutamento de linfócitos, e a MCP2, de macrófagos e linfócitos (CONTI et al., 2005). Portanto, um dos principais objetivos da presente pesquisa foi verificar se, nestas concentrações baixas, a mimosina poderia promover algum efeito imunotóxico.

No entanto, ao contrário do esperado, os ensaios aqui realizados não indicaram qualquer efeito anti-inflamatório ou imunotóxico da mimosina. Assim, os animais expostos a esta toxina não apresentaram diminuição da fagocitose, alteração da produção de anticorpos e diminuição da celularidade de medula óssea.

Por outro lado, um dado interessante e, de certa maneira, inesperado foi a observação do aumento da intensidade de fagocitose de *S.aureus* por macrófagos intraperitoneais de ratos tratados com as duas maiores doses de mimosina. Este achado corrobora o estudo "*in vitro"* em que a mimosina aumentou a capacidade bactericida de fagócitos frente às mesmas bactérias utilizadas no estudo aqui realizado. Embora neste momento seja precoce afirmar o porquê deste achado, pode-se teorizar que a mimosina aumente a intensidade de fagocitose por induzir a transcrição do fator de hipóxia HIF-1α que possui o papel de regular a resposta imune inata, estimulando-a (ZINKERNAGEL et al., 2008). Esta constatação permite sugerir que a mimosina reduza o crescimento de tumores, conforme já verificado em um estudo realizado por este grupo de pesquisa (DIPE et al., 2012), não só por sua atividade antimitotica, mas também por aumentar a intensidade de fagocitose sobre

células tumorais, já que é bem conhecido que fagócitos possuem a atividade antitumoral por meio deste mecanismo (MUNN; CHEUG, 1990).

Considerando-se que a mimosina possui similaridade química com neurotransmissores derivados da tirosina, como a dopamina e a norepinefrina (D'MELLO, 2003) e aliando-se aos dados provenientes de um estudo conduzido na Austrália, no qual se verificou que bovinos tratados com *L.leucocephala* apresentavam hiperatividade (FALVEY, 1976), pareceu factível supor que esta fitotoxina poderia apresentar uma ação, agonista ou antagonista àqueles neurotransmissores. Além disto, deve-se considerar que dois estudos independentes mostraram que a mimosina inibe a dopamina-βhidroxilase, enzima responsável por catalisar a reação de conversão de dopamina em norepinefrina (HASHIGUCHI; TAKAHASHI, 1977; KANG, 2008), o que poderia indicar um efeito desta fitotoxina no sistema catecolaminérgico.

Portanto, para avaliar inicialmente algum indício de alteração, particularmente no sistema adrenérgico ou dopaminérgico, e conhecendo-se que a ação de substâncias nestes sistemas promovem alteração na atividade motora (AYDOGAN et al., 2013; GRIFFIN III et al., 2013), realizou-se avaliação da atividade geral, empregando-se para tal, a observação direta, por meio do campo aberto, o qual, embora tenha sido introduzido nas pesquisas de comportamento animal há, aproximadamente, oito décadas (HALL, 1934), vem ainda sendo amplamente usado com este intuito, não só devido à sua simplicidade como aparelho, mas também pela rápida e fácil obtenção de diferentes parâmetros (FELICIO; NASELLO; PALERMO-NETO, 1987; SPINOSA et al., 1999; BERNARDI et al., 2013). No entanto, os dados obtidos nesta avaliação não revelaram qualquer alteração, digna de nota, o que permite supor que as doses de mimosina aqui empregadas não causam comprometimento motor.

Alguns estudos vêm mostrando inequivocamente que animais de produção, inclusive monogástricos, alimentados basicamente com *L.leucocephala*, tiveram baixos índices reprodutivos. No entanto, não há uma conclusão do porquê de tal efeito, propôs-se apenas que poderia estar relacionado à diminuição da libido ocasionada pela mimosina ou por seu metabólito 3,4DHP (HOLMES et al., 1981; JONES; MCLENNAN; DOWSETT, 1989). Portanto, considerando-se que até o momento, não foram encontradas pesquisas que visavam compreender tal ação

tóxica da mimosina, foi também objetivo desse estudo melhor investigar os efeitos desta fitoxina empregando-se a avaliação do comportamento sexual dos ratos.

Segundo Meisel e Sachs (1994), quando se observa o comportamento sexual do macho, são analisados dois aspectos principais: a motivação ou apetite sexual ou, ainda, libido; e a performance que também é chamada de consumação ou potência sexual. A performance sexual é avaliada principalmente pela observação do número de intromissões, intervalo entre intromissões e latência para a primeira ejaculação. Já a motivação sexual é normalmente avaliada pela latência para a primeira monta, latência para a primeira intromissão, número de montas e intervalo entre as montas (BITRAN; HULL, 1987; MEISEL; SACHS, 1994; AGMO, 1997).

No estudo aqui realizado verificou-se que ratos expostos à mimosina apresentaram diminuição no número de montas e o aumento do intervalo entre elas. Corrobora tal resultado, um estudo conduzido por Joshi (1968), o qual relatou haver, entre outros efeitos reprodutivos, a diminuição da libido e fertilidade de ratos machos expostos a uma ração contendo 15% de *L.leucocephala*. Uma hipótese que poderia explicar tal alteração estaria relacionada à diminuição da testosterona dos ratos que receberam mimosina, haja vista que é amplamente conhecido que a redução nos parâmetros sexuais de machos, anteriormente descritos, é extremamente influenciada pela baixa concentração sérica de testosterona que indiretamente controla o comportamento sexual, pois é biotransformada em estradiol, por aromatização, e em diidrotestosterona, por meio da 5α-redução, sendo estes metabólitos responsáveis pela normal atividade sexual (WU; GORE, 2010).

Considerando-se que a produção de testosterona é dependente do hormônio hipofisário luteinizante (LH), já que este estimula as células testiculares de Leydig a produzir o andrógeno (FOSTER; GRAY JR., 2008) e que estudos mostraram que vacas alimentadas com leucena apresentam intumescimento da hipófise (HOLMES et al., 1981) e, além disso, verificou-se que a mimosina inibiu o ciclo estral de ratas, o qual é determinado por pulsações de hormônios gonadotróficos (HYLIN; LICHTON, 1965), pode-se sugerir que, a diminuição da testosterona dos ratos que receberam a maior dose de mimosina esteja sendo provocada, indiretamente, por alguma alteração da região hipofisária responsável pela produção de gonadotrofinas.

Ganha maior suporte tal conjectura os dados provenientes de um estudo conduzido por Valle et al. (1985), que demonstrou que lesões na tireoide,

semelhantes àquelas aqui descritas com os ratos tratados com mimosina, estão altamente correlacionadas com diminuições dos níveis séricos do hormônio hipofisário LH.

Outro mecanismo que poderia explicar a diminuição da testosterona em ratos tratados com a mimosina, advém de um estudo *in vitro*, no qual foi mostrado que essa fitotoxina é um potente inibidor da expressão do RNAm responsável pela transcrição do receptor de LH (CANNON et al., 2009). Portanto, outra possibilidade seria a diminuição da produção de testosterona pelas células de Leydig que estariam com poucos receptores de LH que, quando estimulados, induzem a produção de testosterona.

Reunindo-se os dados relativos ao comportamento sexual aqui estudados e associados àqueles outros dados da literatura, claramente fica evidenciado o comprometimento na esfera reprodutiva produzida pela mimosina. No entanto, outros estudos mais verticalizados, empregando-se também poligástricos como modelo animal, caprinos, por exemplo, deverão ser conduzidos no sentido de se avaliar qual (is) seria(m) o(s) mecanismo(s) de ação(ões) tóxico(s) da mimosina nestes animais.

Ainda, com bases nestes dados aqui verificados é possível inferir que a mimosina, possua efeito desregulador endócrino. Assim, futuras pesquisas serão continuadas neste laboratório, empregando-se os modelos experimentais contidos no protocolo nº441 da OECD (OECD, 2009), e/ou por testes sugeridos pela agência norte americana de proteção ambiental (US-EPA), por meio de seu programa para avaliação de desreguladores endócrinos para o século vinte e um, que inclui testes *in vivo, in vitro* e *in silico*, para procurar confirmar tal conjectura (US-EPA, 1998, 2011a, b, 2012).

Concluindo, o presente estudo empregando doses baixas de mimosina e utilizando-se o rato como sujeito experimental, permitiu contribuir com a melhor compreensão da toxicidade desta fitotoxina, sendo válido este modelo animal para ser empregado em estudos pré-clinicos ou naqueles em que se busque compreender o mecanismo de ação da mimosina em alguns sistemas, como o endócrino e o reprodutivo.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Foi obtido um rendimento de 2,3% de mimosina na extração das sementes;

- Verificou-se que a administração prolongada de mimosina, administrada por via oral, em doses baixas em ratos machos:
  - Não promoveu alteração no consumo de ração e queda de peso;
  - Não produziu nefro ou hepatotoxicidade;
  - Promoveu lesões acentuadas na tireoide;
  - Alterou a imunidade celular, verificando-se o aumento da intensidade de fagocitose de macrófagos intraperitoneais;
  - Possui efeito desregulador endócrino, que pôde ser verificado pela diminuição dos níveis séricos de testosterona;
  - Interferiu no comportamento sexual, sendo detectada a diminuição do número de montas e aumento do intervalo entre elas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADENEYE, J. A. Mimosine content in various fractions of Leucaena leucocephala grown in western Nigeria. **Animal feed science and technology**, v. 33, n. 3, p. 349-353, 1991.

ÅGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Research Protocols**, v. 1, n. 2, p. 203-209, 1997.

ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. s43-s49, 2006.

AKBAR, M. A.; GUPTA, P. C. Subabul (*Leucaena leucocephala*) as a source of protein supplement for buffalo calves. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 55, p. 54-58, 1985.

AKMAEV, I. G.; GRINEVICH, V. V. From neuroendocrinology to neuroimmunoendocrinology. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 131, n. 1, p. 15-23, 2001.

ALLISON, M. J.; MAYBERRY, W. R.; MCSWEENEY, C. S.; STAHL, D. A. Synergistes jonesii, gen. nov., sp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 522-529, 1992.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: influências do sistema imune sobre o sistema nervoso central. **Revista Neurociências**, v. 18, n. 2, p. 214-219, 2010.

ALVES, G.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.

AYDOGAN, M. S.; PARLAKPINAR, H.; ALI ERDOGAN, M.; YUCEL, A.; UCAR, M.; SAĞIR, M.; COLAK, C. Effects of Dexmedetomidine and Midazolam on Motor Coordination and Analgesia: A Comparative Analysis. **Current Therapeutic Research**, v. 75, p. 22-26, 2013.

BERNARDI, M. M.; SCANZERLA, K. K.; CHAMLIAN, M.; TEODOROV, E.; FELICIO, L. F. Maternal treatment with picrotoxin in late pregnancy improved female sexual

behavior but did not alter male sexual behavior of offspring. **Behavioural Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 282-290, 2013.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. (Ed.). **Patologia clínica veterinária.** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-34.

BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological analysis of male sexual behavior.

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman Group (Far East), Limited, 1977 1977. 465 p.

BREWBAKER, J. L.; HYLIN, J. W. Variations in mimosine content among Leucaena species and related mimosaceae. **Crop Science**, v. 5, n. 4, p. 348-349, 1965.

CANNON, J. D.; SEEKALLU, S. V.; VANDEVOORT, C. A.; CHAFFIN, C. L. Association of luteinizing hormone receptor gene expression with cell cycle progression in granulosa cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 296, n. 6, p. 1392-1399, 2009.

CHANARIN, I.; ROTHMAN, D.; BERRY, V. Iron deficiency and its relation to folic-acid status in pregnancy: results of a clinical trial. **British Medical Journal,** v.1, p.480-485, 1965.

CONTI, P.; FRYDAS, S.; REALE, M.; BARBACANE, R. C.; DI GIOACCHINO, M.; FELACO, M.; TRAKATELLIS, A. Inhibition of MCP-1 and MIP-2 chemokines in murine trichinellosis: effect of the anti-inflammatory compound L-mimosine. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 85, 2005.

CREWS, D.; WILLINGHAM, E.; SKIPPER, J. K. Endocrine disruptors: present issues, future directions. **Quarterly Review of Biology**, p. 243-260, 2000.

D'MELLO, J. P. F. Adverse effects of amino acids. In: D'MELLO, J. P. F. **Amino acids in farm animal nutrition**. London, UK: Biddles, 2003. p. 125-142.

DALZELL, S. A.; BURNETT, D. J.; DOWSETT, J. E.; FORBES, V. E.; SHELTON, H. M. Prevalence of mimosine and DHP toxicity in cattle grazing Leucaena leucocephala pastures in Queensland, Australia. **Animal Production Science**, v. 52, n. 5, p. 365-372, 2012.

DEWREEDE, S.; WAYMAN, O. Effect of mimosine on the rat fetus. **Teratology**, v. 3, n. 1, p. 21-27, 1970.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C.; HAUSTER, R.; PRINS, G. S.; SOTO, A. M.; ZOELLER, T. Z.; GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

DIPE, V. V.; GOTARDO, A. T.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIAK, S. L. Mimosine and cyclophosphamide: a potential new combination therapy used to prevent tumor development. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 55, n. 6, p. 871-876, 2012.

D'MELLO, J. P. F.; ACAMOVIC, T. Leucaena leucocephala in poultry nutrition-A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 1-28, 1989.

EBUENGA, M. D.; ILAG, L. L.; MENDOZA, E. M. T. Inhibition of pathogens of field legumes by mimosine. **Philippine Phytopathology**, v.15, p. 58-61, 1979.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V. Plantas Tóxicas do Brasil. Ed. Helianthus, Rio de Janeiro, 2000, 310p.

EL-HARITH, B. A.; SCHART, Y.; MEULEN, U. T. Reaction of rats fed on *Leucaena leucocephala*. **Tropical Animal Production**, v. 4, p. 162-167, 1979.

ESCOBAR, A.; ALFONSO, H. A.; RAMIREZ, R.; CONYEDO, R. Mimosine contents in three Leucaena cultivars. **Revista de Salud Animal**, v. 10, n. 2, p. 116-120, 1988.

FAHLBUSCH, R.; BAROCKA, A. Hormones and behaviour. **Acta Neurochirurgica**, v. 132, n. 4, p. 169-177, 1995.

FALVEY, L. The effects of Leucaena leucocephala on cattle in the Northern Territory. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, n. 5, p. 243-243, 1976.

FELICIO, L. F.; NASELLO, A. G.; PALERMO-NETO, J. Dopaminergic supersensitivity after long-term bromopride treatment. **Physiology & Behavior**, v. 41, n. 5, p. 433-437, 1987.

FENG, D.; ATREJA, P. P. Comparative ruminal degradation of mimosine and DHP in cattle and buffalo. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 122-125, 1998.

FERIA, M. J.; LÓPEZ, F.; GARCÍA, J. C., PÉREZ, A.; ZAMUDIO, M. A. M.; ALFARO, A. Valorization of Leucaena leucocephala for energy and chemicals from autohydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2224-2233, 2011.

FOSTER, P.M.D.; GRAY JR, L.E. Toxic responses of the reproductive system. In: CURTIS, D. K. (Ed.). **Cassaret & Doull´s toxicology:** the basic science of poisonous. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 761-806.

FRANZOLIN NETO, R.; VELLOSO, L. Aspectos tóxicos da Leucaena Leucocephala (LAM.) de WIT. Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v. 11, p. 37-47, 1987.

FRYDAS, S.; PAPAZAHARIADOU, M.; PAPAIOANNOU, N.; HATZISTILIANOU, M.; TRAKATELLIS, M.; MERLITTI, D.; DI GIOACCHINO, M.; GRILLI, A.; DELUTIIS, M.A.; RICCIONI, G.; CONTI, P. VLEMMAS, I.Effect of the compound L-mimosine in an in vivo model of chronic granuloma formation induced by potassium permanganate (KMNO4). **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 99, 2003.

GALLO, M. A. History and scope of toxicology. In: CURTIS, D. K. (Ed.). **Cassaret & Doull´s toxicology**: the basic science of poisonous. New York: McGraw-Hill, 2008. P. 3-10.

GHOSH, M. K.; ATREJA, P. P.; BURAGOHAIN, R.; BANDYOPADHYAY, S. Influence of short-term Leucaena leucocephala feeding on milk yield and its composition, thyroid hormones, enzyme activity, and secretion of mimosine and its metabolites in milk of cattle. **The Journal of Agricultural Science**, v. 145, n. 04, p. 407-414, 2007.

GOEL, V. L.; BEHL, H. M. Selection of Leucaena species for afforestation and amelioration of sodic soils. **Land Degradation & Development**, v. 13, n. 5, p. 387-393, 2002.

GORNIAK, S. L. Plantas tóxicas de interesse agropecuário. In: SPINOSA, H. S.; GORNIAK., S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária.** Barueri: Manole, 2008. p. 415-457.

GÓRNIAK, S. L.; HARAGUCHI, M.; SPINOSA, H. S.; NOBRE, D. Experimental intoxication in rats from a HCN-free extract of Holocalyx glaziovii taub : probable participation of the cyanogenic glycoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 85-88, 1993.

GRIFFIN III, W. C.; MCGOVERN, R. W.; BELL, G. H.; RANDALL, P. K.; MIDDAUGH, L. D.; PATRICK, K. S. Interactive effects of methylphenidate and alcohol on discrimination, conditioned place preference and motor coordination in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 3, p. 613-625, 2013.

GUPTA, H. K.; ATREJA, P. P. Influence of gradual adaptation of cattle to Leucaena leucocephala leaf meal on biodegradation of mimosine and 3-hydroxy-4 (1H)-pyridone (3, 4 DHP) in rumen, their levels in blood, fate and influence of absorbed DHP on thyroid hormones and liver enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, n. 1, p. 29-43, 1998.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.

HAMMOND, A. C. Leucaena toxicosis and its control in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 5, p. 1487-1492, 1995.

HAMMOND, A. C.; ALLISON, M. J.; WILLIAMS, M. J.; PRINE, G. M.; BATES, D. B. Prevention of leucaena toxicosis of cattle in Florida by ruminal inoculation with 3-hydroxy-4-(1H)-pyridone-degrading bacteria. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 12, p. 2176, 1989.

HARAGUCHI, M.; GÓRNIAK, S.L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária.** Barueri: Manole, 2008. p. 366-414.

HASHIGUCHI, H.; TAKAHASHI, H. Inhibition of two copper-containing enzymes, tyrosinase and dopamine β-hydroxylase, by L-mimosine. **Molecular Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 362-367, 1977.

HEGARTY, M. P.; CHRISTIE, G. S.; LEE, C. P. Mimosine in Leucaena leucocephala is metabolised to a goitrogen in ruminants. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, n. 10, p. 490-490, 1976.

HEGARTY, M. P.; LEE, C. P.; CHRISTIE, G. S.; HAYDOCK, K. P. The goitrogen 3-Hydroxy-4 (1H)-pyridone, a ruminal metabolite from Leucaena leucocephala: effects in mice and rats. **Australian journal of biological sciences**, v. 32, n. 1, p. 27-40, 1979.

HEGARTY, M. P.; SCHINCKEL, P. G.; COURT, R. D. Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth. and to its toxic principle mimosine. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 33, p.152-153, 1964.

HEGARTY, M. P.; COURT, R. D. A simple method for the isolation of mimosina from the seed of Leucaena glauca Benth. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 15, n. 1, p. 165-166, 1964.

HEGARTY, M. P.; COURT, R. D.; CHRISTIE, G. S.; LEE, C. P. Mimosine in *Leucaena leucocephala* is metabolized to a goitrogen in ruminants. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 52, p. 490, 1976.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. Graphicars: São Paulo, p. 196-199, 1939.

HOLMES, J. H. G.; HUMPHREY, J. D.; WALTON, E. A.; O'SHEA, J. D. Cataracts, goitre and infertility in cattle grazed on an exclusive diet of Leucaena leucocephala. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 6, p. 257-261, 1981.

HOLMES, J. H. G. Toxicity of *Leucaena leucocephala.* Reduced fertility of heifers grazing *Leucaena leucocephala.* **Papua New Guinea Journal of Agriculture Forestry and Fisheries**, v. 31, p. 47-50, 1980.

HYLIN, J. W.; LICHTON, I. J. Production of reversible infertility in rats by feeding mimosine. **Biochemical Pharmacology**, v. 14, n. 7, p. 1167, 1965.

IPCS. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria 180. Principles and methods for assessing direct immnotoxicity associated with exposure to chemicals**. GENEVA: World Health Organization, 1996.

JAMES, L. F.; NIELSEN, D. B.; PANTER, K. E. Impact of poisonous plants on the livestock industry. **Journal of Range Management**, v.45 ,, p. 3-8, 1992.

JONES, R. J.; HEGARTY, M. P. The effect of different proportions of Leucaena leucocephala in the diet of cattle on growth, feed intake, thyroid function and urinary excretion of 3-hydroxy-4 (1H)-pyridone. **Crop and Pasture Science**, v. 35, n. 2, p. 317-325, 1984.

JONES, R. J.; MEGARRITY, R. G. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of Leucaena. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 8, p. 259-262, 1986.

JONES, R. M.; MCLENNAN, M. W.; DOWSETT, K. F. The effect of Leucaena leucocephala on the reproduction of beef cattle grazing Leucaena grass pastures. **Tropical Grasslands**, v. 23, n. 2, p. 109, 1989.

JONES, R. J. Leucaena toxicity and the ruminal degradation of mimosine. In: SEAWRIGHT, M. P.; HEGARTY, L. F.; SAMES, R. F. **Plant toxicology**. Queensland, Australia: Queensland Poisonous Plants Committee Yeerongpilly, 1985. p. 111.

JOSHI, H. S. The effect of feeding on Leucaena leucocephala (Lam) de Wit. on reproduction in rats. **Crop and Pasture Science**, v. 19, n. 2, p. 341-352, 1968.

KALEJTA, R. F.; HAMLIN, J. L. The dual effect of mimosine on DNA replication. **Experimental Cell Research**, v. 231, p. 173-183, 1997.

KAMINSKI, N. E.; KAPLAN, B. L. F; HOLSAPPLE, M. P. Toxic responses of the immune system. In: CURTIS, D. K. (Ed.). **Cassaret & Doull´s toxicology:** the basic science of poisonous. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 485-555.

KANG, Y. J.Toxic responses of the heart and vascular system. In: CURTIS, D. K. (Ed.). **Cassaret & Doull´s toxicology:** the basic science of poisonous. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 699-739.

KIMBER, I.; DEARMAN, R. J. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. **Contact Dermatitis**, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2002.

LALANDE, M.; HANAUSKE-ABEL, H.M. A new compound which reversibly arrests T lymphocyte cell cycle near the G1/S boundary. **Experimental Cell Research**, v. 188, p. 117–121,1990.

LANGMAN, L. J.; KAPUR, B. M. Toxicology: then and now. **Clinical biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 498-510, 2006.

LI, N.; YI, F.; SUNDY, C. M.; CHEN, LI; HILLIKER, M. L.; DONLEY, D. K.; DONLEY, D. K.; MULDOON, D. B.; LI, P. Expression and actions of HIF prolyl-4-hydroxylase in the rat kidneys. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 1, p. F207-F216, 2007.

LINN, H. B.; FALCHETTO, R.; MOSCA, P. J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; HAMLIN, J. L. Mimosine targets serine hydroxymethyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 2548-2556, 1996.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; DE POORTER, M. **100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database**. Auckland, New Zealand: Invasive Species Specialist Group, 2000.

LUSTER, M. I.; PORTIER, C.; PAÎT, D. G.; WHITE, K. L.; GENNINGS, C.; MUNSON, A. E.; ROSENTHAL, G. J. Risk assessment in immunotoxicology: I. Sensitivity and predictability of immune tests. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 200-210, 1992.

MALIK, R. S.; DUTT, D.; TYAGI, C. H.; JINDAL, A. K.; LAKHARIA, L. K. Morphological, anatomical and chemical characteristics of Leucaena leucocephala and its impact on pulp and paper making properties. **Journal of scientific & Industrial Research**, v. 63, n. 2, p. 125-133, 2004.

MANNING, T. Endocrine-disrupting chemicals: a review of the state of the science. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-52, 2005.

MASCRÉ. Structural of leucenol. **Comptes Rendus**, p. 204-890, 1937.

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A. **Animal nutrition.** 5th Edn. Harlow, Essex, UK: Longman Scientific and Technical, 1995.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIAK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed Crotalaria spectabilis seeds on growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p.10, 1999.

MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBIL E.; NEILL, J. D. (Ed.). **Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 3-106.

MOSCA, P. J.; DIJKWEL, P. A.; HAMLIN, J. L. The plant amino acid mimosine may inhibit initiation at origins of replication in Chinese hamster cells . **Molecular and Cellular Biology***,* v. 12, p. 4375–4383, 1992.

MTENGA, L. A.; LASWAI, G. D. Leucaena leucocephala as feed for rabbits and pigs: detailed chemical composition and effect of level of inclusion on performance. **Forest Ecology and Management**, v. 64, n. 2, p. 249-257, 1994.

MUNN, D. H.; CHEUNG, N. K. Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 1, p. 231-237, 1990.

MUTAKU, J. F.; POMA, J. F.; MANY, M. C.; DENEF, J. F.; VAN DEN HOVE, M. F. Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goitre development and iodine-induced involution. **Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 2, p. 375-386, 2002.

NAGARKATTI, P. S.; NAGARKATTI, M. Immunotoxicology: Modulation of the immune system by xenobiotics. **Defence Science Journal.** New Delhi, v. 37, n. 2, p. 234-244, 1987.

OECD. **Draft OECD guideline for the testing of chemicals**. Paris: OECD, 1998b**.** **(**Test Guideline 452). Disponível em: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/41753317.pdf. Acesso em: 8 ago. 2013.

OECD. **Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption**. Paris: OECD, 2012**.** (Series on Testing and Assessment, no. 150). Disponível em: http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282012%2922&doclanguage=en. Acesso em: 08 ago. 2013.

OECD. **OECD guideline for the testing of chemicals**. Paris: OECD, 1998a**.** **(**Guideline 408) Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740801e.pdf?expires=1375968067&id=id&accname=guest&checksum=193EBD0362E04B1B25C1BF429450EA21. Acesso em: 8 ago. 2013.

OECD. **OECD guideline for the testing of chemicals**: Hershberger bioassay in rats: a short-term screening assay for (anti)androgenic properties. Paris: OECD, 2009. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG441.pdf. Acesso em: 8 ago. 2013.

OECD. **OECD guidelines for the testing of chemicals.** Paris: OECD, 2008. Sec. 4. (Test nº407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents). Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740701e.pdf?expires=1376053567&id=id&accname=guest&checksum=59E8941CA43E5333B5AB3BBE5C9E2537. Acesso em: 8 ago. 2013.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. D.; FREGONA, M. G.; SOUZA, V. D.; FERNANDES, W. R.; COELHO, C. S. Leucaena (Leucaena leucocephala) natural intoxication in a horse. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 12, n. 1/3, p. 55-59, 2009.

OPPENHEIM, E. W.; NASRALLAH, T. M.; MASTRI, M. G.; STOVER, P. J. Mimosine is a cell-specific antagonist of folate metabolism**. The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 19268–19274, 2000.

PALMER, B.; JONES, R. J.; POATHONG, S.; CHOBTANG, J. Within country variation in the ability of ruminants to degrade DHP following the ingestion of Leucaena leucocephala a Thailand experience. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 2, p. 161-164, 2010.

PANTER, K. E.; JAMES, L. F. Natural plant toxicants in milk: a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 892-904, 1990.

PEIXOTO, P. V; FRANÇA, T. N.; CUNHA, B. M.; TAVARES, D. V. A. M.; BRITO, M. F. Spontaneous poisoning by Leucaena leucocephalai in a goat from Rio de Janeiro State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 551-555, 2008.

POTTINGER, A. J. HUGHES, C. E. A review of wood quality in Leucaena. IN: SHELTON H. M.; PIGGIN, C. M.; BREWBAKER, J. L. (Ed.). **Leucaena opportunities and limitations:** proceedings of a workshop held in Bangor. ACIAR Proceedings: Canberra, 1995. p. 98–102.

PRASAD, J. V. N. S. ; KORWAR , G. R.; RAO, K. V.; MANDAL, U. K.; RAO, G. R.; SRINIVAS, I.; VENKATESWARLU, B.; RAO, S. N.; KULKARNI, H. D.; KULKARNI. Optimum stand density of Leucaena leucocephala for wood production in Andhra Pradesh, Southern India. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 227-235, 2011.

QUIRK, M. F.; BUSHELL, J. J.; JONES, R. J.; MEGARRITY, R. G.; BUTLER, K. L. Live-weight gains on leucaena and native grass pastures after dosing cattle with rumen bacteria capable of degrading DHP, a ruminal metabolite from leucaena. **The Journal of Agricultural Science**, v. 111, n. 01, p. 165-170, 1988.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C., GAY, C. C. Veterinary medicine. London: Bailliere Tindal, 2000.

RENZ, J. Über das mimosin. **Zeitschrft für Physiologische Chemie,** v. 244, p. 153-158, 1936.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

SCHERER, L.M.; ZUCARELI, V., ZUCARELI, C. A.; FORTES, A. M. T. Allellopatic effects of aqueous extracts of leucena (Leucaena leucocephala Wit) leave and fruit on germination and root growth of canafístula (Peltophorum dubium Spreng). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p.161-166, 2005.

SERRANO, E. P.; ILAG, L. L.; MENDOZA, E. M. T. Biochemical mechanisms of mimosine toxicity to *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Australian Journal of Biological Sciences,** v. 36, p. 445-454, 1983.

SKERMAN, P. J. **Tropical forage legumes.** Rome, FAO, 1977. 610 p.

SMITH, C. W. Impact of alien plants on Hawaii's native biota. In: STONE, C.P; SCOTT, M. (Ed.). **Hawaii'i's terrestrial ecosystems:** preservation and management. Manoa: University of Hawaii, 1985. p.180-250.

SPENSER, I. D.; NOTATION, A. D. A synthesis of mimosine. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1374-1379, 1962.

SPINOSA, H. S.; SILVA, Y. M. A.; NICOLAU, A. A.; BERNARDI, M. M.; LUCISANO. A. Possible anxiogenic effects of fenvalerate, a type II pyrethroid pesticide, in rats. **Physiology & Behavior**, v. 67, n. 4, p. 611-615, 1999.

THYAGARAJAN, S.; PRIYANKA, H. P. Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: relevance to health and diseases. **Annals of Neurosciences**, v. 19, n. 1, p. 17-27, 2012.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas tóxicas do brasil. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2000.

TSAI, W. C.; LING, K. H. Study on the stability constant of some metal ion chelatea of mimosine and 3,4-tihydroxypyridine. **Journal of the Chinese Biochemical Society,** v. 2, p. 70-86, 1973.

U.S. EPA. Endocrine disruptor screening and testing. Advisory committee (EDSTAC) final report, 1998. Disponível em: http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm. Acesso em: 8 ago. 2013.

U.S. EPA. **Endocrine disruptor screening program comprehensive management plan**. 2012. Disponível em: http://www.epa.gov/endo/pubs/EDSP-comprehensive-management-plan.pdf. Acesso em: 8 ago. 2013.

U.S. EPA. **Endocrine disruptor screening program for the 21st century (edsp21): summary overview**. 2011a. Disponível em: http://www.epa.gov/endo/pubs/edsp21_work_plan_ summary %20_overview_final.pdf . Acesso em: 8 ago. 2013.

U.S. EPA. **Integrated approaches to testing and assessment strategies: use of new computational and molecular tools**. 2011b. Disponível em: http://www.epa.gov/scipoly/sap/ meetings/ 2011/may/052411minutes.pdf. Acesso em: 8 ago. 2013.

VALLE, L.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; ROMALDINI, J. H.; LARA, P. F. Pituitary-testicular axis abnormalities in immature male hypothyroid rats. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 253-257, 1985.

VAN DER LAAN, J. W.; VAN LOVEREN, H. Current status and burning issues in immunotoxicity testing of drugs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2, p. 435-440, 2005.

VIDYASAGAR, G. M.; PRASHANTKUMAR, P. Traditional herbal remedies for gynecological disorders in women of Bidar district, Karnataka, India. **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 48-51, 2007.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. **Manual of the flowering plants of Hawaii**. Honolulu: University of Hawai'i Press/Bishop Museum Press, 1999. 1919 p.

WU, D.; GORE, A. C. Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 2, p. 306-316, 2010.

XUAN, T. D.; TAWATA, S.; KHANH, T. D. Herbicidal activity of mimosine and its derivatives. In: PRICE, J. A.; KELTON, J. A. **Herbicides Advances in Research**. Rijeka: InTech, 2013. p. 299-312.

XUAN, T. D.; ELZAAWELY, A. A.; DEBA, F.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. Mimosine in Leucaena as a potent bio-herbicide. **Agronomy for Sustainable Development***,* v. 26, p. 89-97, 2006*.*

ZALATNAI, A. P-glycoporotein expression is induced in human pancreatic xenografts during treatment with a cell cyclo regulator, mimosine. **Pathology Oncology Research**, v. 11, p. 164-169, 2005.

ZINKERNAGEL, A. S.; PEYSSONNAUX, C.; JOHNSON, R. S.; NIZET, V. Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 214-7, 2008.