

FERNANDO PÍPOLE

**Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea* e
de seu princípio ativo tóxico, a suainsonina, em ratos
jovens e adultos**

São Paulo
2010

FERNANDO PÍPOLE

Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea* e de seu princípio ativo tóxico, a suainsonina, em ratos jovens e adultos

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Isis Machado Hueza

São Paulo
2010

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.2325
FMVZ

Pípole, Fernando

Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea* e de seu princípio ativo tóxico, a suainsonina, em ratos jovens e adultos / Fernando Pípole. -- 2010.
109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Isis Machado Hueza.

1. *Ipomoea carnea*. 2. Imunomodulação. 3. Toxicologia do desenvolvimento. 4. Fenotipagem. I. Título.

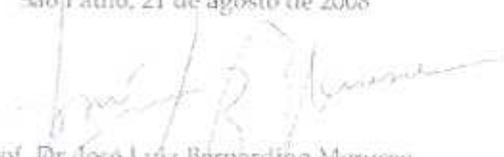


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos possíveis efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea*, em ratos jovens e adultos" protocolado sob o nº 1627/2008, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) ratos, sob responsabilidade da Profa. Dra. Isis Machado Hueza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum"

We certify that the Research " Evaluation of immunotoxics effects of *Ipomea carnea* in young and adults rats", utilizing 250 (two hundred fifty) rats, protocol number 1427/2008, under the responsibility Profa. Dra. Isis Machado Hueza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved " ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008


Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PÍPOLE, Fernando

Título: Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea* e de seu princípio ativo tóxico, a suainsonina, em ratos jovens e adultos

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais, Ruth e Waldir, pelo amor,
carinho, compreensão, paciência, por
respeitarem meus sonhos e acima de tudo
por me ensinarem a ser bom e respeitar o
próximo. Tenho extrema admiração e
gratidão por tudo que fizeram e ainda
fazem por mim. Obrigado por tudo.*

Amo Vocês

*Aos meus irmãos, Cesar, Eduardo e José Carlos.
Obrigado pela amizade e por compartilharem todos
os momentos de alegria e tristeza comigo. Tenho
muito orgulho de todos!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Isis Machado Hueza, por toda atenção dispensada a mim durante todo o mestrado, pela preocupação, pelo auxílio rápido em todos os momentos em que precisei, e principalmente por ser um exemplo de determinação, força de vontade e disciplina. Sempre que desejo algo que considero difícil alcançar lembro-me da sua estória. Muito obrigado!!!!

À minha "segunda mãe", Dr^a Luciana Retz de Carvalho, pesquisadora do Instituto de Botânica de São Paulo, que me recebeu em seu laboratório quando eu tinha apenas 16 anos de idade e me ensinou tudo que sei hoje sobre Química dos Produtos Naturais, foi e ainda é muito mais que minha professora, sempre me aconselhando sobre todos os assuntos e torcendo pelo meu sucesso. Luciana, obrigado pelo seu carinho e amizade!!!

À Prof^a Dr^a Silvana Lima Górnaiak, por me receber neste programa de pós, pelo exemplo de seriedade, competência e notável dedicação a docência.

Ao meu professor da graduação Luiz Antonio Bafille Leoni, pelos conselhos durante todo o curso e por me receber inúmeras vezes em sua sala e ouvir minhas queixas, dúvidas e aflições.

À minha cunhada Fabiane, pela convivência harmoniosa e sempre divertida com muitas risadas, pela preocupação que sempre demonstrou ter por mim e principalmente por ter trazido ao mundo meu querido sobrinho Vinicius que encheu nossa casa de alegria.

As minhas tias Esther e Helena, e minha prima Darlene, pela convivência, por todo carinho, orações, torcida durante todos estes anos. Adoro vocês.

As colegas da graduação Bartira, Camila, Cintia e Renata, jamais esquecerei os anos que passamos juntos, as risadas, as crises de desespero antes das provas, o tempo super mal calculado para realizar os trabalhos, sempre ia dar tempo para fazer aquele trabalho da semana que vem, rsrsrs. Muito obrigado por tudo é impossível lembrar da faculdade e não pensar em vcs!

Ao pessoal do HESAP Aline Akeme, Aline Lopes, Cecilia, Keler, Priscila e Rosângela, pelo convívio agradável durante todo o tempo que passamos juntos por me agüentarem reclamando do cansaço da faculdade e pela torcida para que eu realizasse todos os meus sonhos.

À Andréia Oliveira Latorre pela amizade, pelo auxílio imprescindível para realização deste trabalho, pela competência e amor que tem pela ciência e acima de tudo pelo respeito que demonstra ter pelo próximo. Andréia desejo a você toda sorte do mundo nesta nossa longa jornada, Obrigado por tudo!

Ao meu grande amigo Thales Proa pelos conselhos, esforço para que eu alcance sucesso profissional, pelos ensinamentos espirituais e pela amizade incondicional, tenho muito respeito e admiração por você.

À minha grande amiga Luciana Castro da Cunha, sem dúvida alguma a maior surpresa em minha vida durante a pós. Lú, seu sorriso é maravilhoso e simplesmente transforma o ambiente onde você esta, obrigado pelas conversas, conselhos, pela ajuda nos experimentos de final de semana, madrugada etc, e claro, pelas risadas intermináveis que demos juntos.

À Fabiana Elias, pela amizade sincera, pela confiança depositada em mim, por toda ajuda e carinho e claro pelas risadas e crises de stress rsrsrs.

À Juliana Vieira pelo maravilhoso senso de humor, por me fazer rir sem parar, por me ensinar que com disciplina e planejamento não há obstáculos em nossas vidas. Já sou seu Fã.

À Aline Ameni, Beatriz, Camila Lima, Esther e Luciana Lippi, por todos os momentos que passamos juntos, que com diferentes formas contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fernanda Rios do Instituto de Botânica de São Paulo, pela amizade, por me ouvir durante todas as manhãs nas nossas idas e vindas do Instituto, pelas risadas, por me ensinar Botânica, rsrs, e com certeza pela pessoa sincera e honesta que é. Fê obrigado por tudo serei sempre seu amigo.

Aos demais colegas do Instituto de Botânica de São Paulo, Camila Malone, Camilinha, Edna, Luiz Felipe, Raquel e Regina Tsukada, obrigado pela amizade e ajuda durante nossa jornada.

Ao Paulo César e Ester do CEPTOX, por toda amizade, carinho e auxílio para a confecção desta dissertação.

Aos funcionários do biotério do VPT Claudia, Herculano, Idalina, Luís, Nelson, Mauro e Rosiris, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos, por todo auxílio e ótima convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT Magali, Priscila, Ricardo e Vagner, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT, Adriana, Milena, Cláudia, Deise, Joana e Cristina, pelo auxílio sempre que preciso.

Aos funcionários da informática Antônio e Miro, aos seguranças, e aos demais funcionários do VPT, Lívia, Lúcia, Luciana, Marguiti, Shirley, pela ótima convivência.

A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

À todos os animais usados nestes experimentos.

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

PÍPOLE, F. **Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea* e de seu princípio ativo tóxico, a suainsonina, em ratos jovens e adultos.** [Evaluation of the immunotoxic effects of *Ipomoea carnea* and its toxic principle, the swainsonine in young and adult rats]. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O presente estudo visou avaliar os efeitos da administração do resíduo aquoso final (RAF) da *Ipomoea carnea* e da suainsonina, sobre o sistema imune de ratos jovens em idade pré-pubere (21 dias) e adultos (70 dias). Para isso, o RAF foi administrado nas doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg e a suainsonina na dose de 5,0 mg/kg, por gavagem, durante 14 dias para avaliação histopatológica de diferentes órgãos, peso relativo de baço e timo, celularidade de medula óssea, fenotipagem de linfócitos T e B presentes no sangue, timo e baço, e atividade proliferativa de linfócitos T de animais tratados apenas com suainsonina. Além disto, foi realizada toxicocinética da suainsonina de animais jovens e adultos. Dentre os resultados obtidos com o tratamento com RAF, foi verificado que todos os animais apresentaram lesões, tais como: congestão hepática e esplênica e vacuolização renal. Em ratos adultos observou-se ainda diminuição do ganho de peso e do consumo de ração, além de involução tímica e diminuição da celularidade da medula óssea. Já nos jovens, as principais alterações observadas foram quanto à alteração fenotípica das populações de linfócitos T CD8⁺ no timo, sangue e baço e de linfócitos B no sangue e baço. Entretanto, estas alterações não podem ser atribuídas exclusivamente ao RAF de *I. carnea*, pois os animais do grupo *pear-feeding* (grupo sob restrição alimentar para mimetizar a diminuição da ingestão de alimentos daqueles ratos tratados com a maior dose do RAF) apresentaram resultados semelhantes àqueles tratados com a planta. Em relação aos resultados obtidos em ratos jovens tratados com suainsonina, verificou-se menor porcentagem de linfócitos B no baço e no sangue e maior expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ de ratos imunizados *in vivo* e desafiados *ex vivo* com anatoxina tetânica. Por fim, o estudo toxicocinético revelou que este alcalóide possui biodisponibilidade de apenas 9 horas tanto nos animais jovens quanto nos adultos. Assim, é possível concluir que a suainsonina, principal princípio ativo da *I. carnea*, tem atividade imunomodulatória, mas esta atividade

difere do efeito imunomodulador causado pelo RAF provavelmente devido a presença de outros alcalóides também encontrados na planta.

Palavras-chaves: *Ipomoea carnea*. Imunomodulação. Toxicologia do desenvolvimento. Fenotipagem. Ratos.

ABSTRACT

PÍPOLE, F. **Evaluation of the immunotoxic effects of *Ipomoea carnea* and its toxic principle, the swainsonine in young and adult rats** "Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Ipomoea carnea* e de seu princípio ativo tóxico, a swainsonina, em ratos jovens e adultos". 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

This study aimed to evaluate the effects of administration of the final aqueous residue (RAF) of *Ipomoea carnea* and swainsonine on the immune system of young (21 days) and adult rats (70 days). For this, the RAF was administered at doses of 1.0, 3.0 and 7.0 g/kg and swainsonine at dose of 5.0 mg/kg by gavage for 14 days for histopathological evaluation of different organs, relative weight of spleen and thymus, bone marrow cellularity, phenotyping of T and B lymphocytes in the blood, thymus and spleen, and proliferative activity of T lymphocytes from animals treated with swainsonine. Moreover, we performed toxicokinetics of swainsonine in young and adult rats. Among the results obtained with treatment with the RAF, it was observed that all animals had lesions such as hepatic and splenic congestion and kidney vacuolization. In adult rats there was also reduction in weight gain and feed intake, thymic involution and decreased bone marrow cellularity. Already in the young rats, the main changes observed were in the populations of T CD8⁺ lymphocytes in the thymus, spleen and blood and B lymphocytes in the blood and spleen. However, these changes cannot be attributed solely to the RAF of *I. carnea*, because the animals of the pair-feeding group (group under food restriction to mimic the decrease in food intake of those rats treated with the higher dose of the RAF) had similar results to those treated with the plant. Regarding the results obtained in young rats treated with swainsonine, there was a lower percentage of B lymphocytes in the spleen and blood and increased clonal expansion of T CD4⁺ lymphocytes from rats immunized *in vivo* and challenged *ex vivo* with tetanus toxoid. Finally, the toxicokinetic study has revealed that bioavailability of this alkaloid is only 9 hours in the both animals young and adult. Thus, we conclude that swainsonine, the main active principle of *I. carnea*, has immunomodulatory activity, but this activity differs

from the immunomodulatory effect caused by the RAF probably due to the presence of other alkaloids also found in the plant.

Key words: *Ipomoea carnea*. Immunomodulation. Development Toxicology. Immunophenotyping. Rats

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A <i>Ipomoea carnea</i>	18
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais	29
3.2 Reagentes e equipamentos	29
3.3 Material vegetal	31
3.4 O Alcalóide: Suainsonina	31
3.5 Procedimentos	31
3.5.1 Extração de princípios ativos da <i>I. carnea</i>	31
3.5.2 Determinação quantitativa dos alcalóides.....	32
3.5.3 Administração do RAF da <i>I. carnea</i> e da suainsonina.....	32
3.5.4 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratos.....	33
3.5.5 Coleta de sangue.....	34
3.5.6 Histopatologia.....	34
3.5.7 Órgãos linfóides.....	34
3.5.8 Avaliação global de células da medula óssea	35
3.5.9 Fenotipagem de subpopulações linfocíticas.....	35
3.5.10 Avaliação da atividade proliferativa de linfócitos T.....	36
3.5.11. Estudo Toxicocinético da suainsonina por meio do ensaio de inibição da enzima α - manosidase.....	37
3.5.12 Análise estatística.....	38
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	39
4.1 Experimento 1: Avaliação do hemograma, peso relativo de órgãos linfóides, celularidade de medula óssea e baço, avaliação histopatológica de baço, timo, cérebro, fígado e rim...	40
4.1.1 Resultados.....	40
4.2 Experimento 2 - Fenotipagem linfocítica: Avaliação das subpopulações de linfócitos B e T presentes no sangue, baço e timo de ratos jovens e adultos tratados com RAF	56
4.2.1 Resultados.....	57

4.3 Experimento 3: Estudo toxicocinético do princípio ativo suainsonina: determinação da concentração sérica de suainsonina em ratos jovens e adultos.....	66
4.3.1 Resultados.....	66
4.4 Experimento 4: Avaliação do hemograma; peso relativo de órgãos linfóides; celularidade de medula óssea e baço de animais jovens tratados com suainsonina.....	68
4.4.1 Resultados.....	68
4.5 Experimento 5 - Fenotipagem linfocítica: Avaliação das subpopulações de linfócitos B e T presentes no sangue, baço e timo de ratos jovens tratados com suainsonina.....	75
4.5.1 Resultados.....	76
4.6 Experimento 6 – Avaliação da atividade proliferativa de linfócitos T: avaliação da expansão clonal de linfócitos T <i>helper</i> de ratos jovens tratados com 5mg/kg de suainsonina frente ao desafio com anatoxina tetânica.....	83
4.6.1 Resultados.....	83
5 DISCUSSÃO.....	86
6 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	102

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A *Ipomoea carnea*

A *Ipomoea carnea* Jacq. spp. *Fistulosa* (Choisy) D.F. Austin (Figura 1) é uma planta pertencente à família das Convolvulaceae sendo, arbustiva de porte ereto, leitosa, com caule glabro, oco e pouco ramificado, medindo cerca de 1 a 3 metros de altura. Suas folhas glabras, alternadas, são longo-pecioladas, com medidas variando entre 10 e 30 centímetros de comprimento e 5 e 15 centímetros de largura. A sua florescência é axilar, com flores de 5-8 cm de comprimento, com coloração variando de rosa ao roxo, sustentadas por longo pedúnculo. Multiplica-se por estacas e naturalmente por dispersão de sementes, as quais são ovóides-cuneiformes de superfície pouco áspera (8-10 mm de comprimento), intensamente recoberta por pêlos ferrugíneos (HOEHNE, 1939; LORENZI, 1991).

Esta planta pode ser encontrada, por todo o Brasil, e também em outros países de clima tropical (AUSTIN; HUAMAN, 1996), como em alguns países da África, como o Zimbábue, Moçambique, África do Sul e Zâmbia (GONÇALVES, 1987). A *I. carnea* propaga-se rapidamente, inclusive em condições climáticas adversas, devido a sua resistência às secas (TIRKEY; YADAVA; MANDAL, 1987), possuindo desta forma, ampla distribuição nacional e, devido a este fato, recebe diferentes nomenclaturas, como “algodão-bravo” no Pará, “canudo-de-lagoa” no Ceará, “algodão-do-pantanal” ou “algodão-do-brejo” no Mato Grosso do Sul, entre outros nomes vulgares (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). A *I. carnea* mantém-se verde durante todo o ano, sendo resistente a longos períodos de seca (HOEHNE, 1939). Assim, em épocas de escassez de alimento, esta planta fornece matéria verde aos animais de produção; sob estas condições, os bovinos, ovinos e caprinos podem intoxicar-se (TOKARNIA; DOBEREINER; CANELLA, 1960; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000).



Figura 1 - *Ipomoea carnea*

A intoxicação natural é de caráter crônico e ocorre quando diferentes espécies animais, como bovinos, ovinos e, particularmente, caprinos ingerem a planta de forma crônica, promovendo nestes animais anorexia com perda de peso e de índices zootécnicos, sintomatologia nervosa de origem cerebelar, com paresia de membros posteriores, tremores de cabeça, dismetria, decúbito esternal e eventualmente pode levar à morte por inanição (HOEHNE, 1939; TOKARNIA; DOBEREINER; CANELLA, 1960; MATOS, 1983; TIRKEY; YADAVA; MANDAL, 1987; SRILATHA; GOPAL-NAIDU; RAMA-RAO, 1997; SCHUMAHER-HENRIQUE et al., 2003).

Os animais intoxicados pela *I. carnea* desenvolvem, principalmente, sintomatologia de origem nervosa. Histologicamente, esta intoxicação é caracterizada pela presença de vacúolos lisossomais no sistema nervoso central (SNC), tireóide, fígado, pâncreas e rins (DE BALOGH et al., 1999). Em particular, os caprinos intoxicados pela planta manifestam alterações nervosas bastante acentuadas, apresentando, no estudo histopatológico, neurônios e células da glia

vacuolizadas, bem como vacuolização em neurônios do plexo mesentérico do intestino delgado e em células epiteliais do rim (DE BALOGH et al., 1999; SCHUMAHER-HENRIQUE et al., 2003).

Os primeiros a isolarem os princípios ativos tóxicos da *I. carnea* foram De Balogh et al. (1999) de uma planta originária de Moçambique, sendo detectado neste momento, dois tipos distintos de alcalóides, o alcalóide indolizidínico: suainsonina e os alcalóides nortropânicos: calisteginas B2 e C1. Ainda, em relação aos alcalóides nortropânicos, Haraguchi et al. (2003) isolaram e identificaram de folhas de *I. carnea* brasileira as calisteginas B1 e B3. Testes in vitro demonstraram que as calisteginas B1 e B2 são responsáveis pela inibição das enzimas β -glicosidase e α e β -galactosidases, já a calistegina C1 é um potente inibidor apenas da enzima β -glicosidase e por fim, pouco se sabe a respeito dos efeitos da calistegina B3 sobre as enzimas α e β -manosidases (ASANO et al., 1995; MOLYNEUX et al., 1995; GOLDMANN et al., 1996). Sugere-se que a presença destes alcalóides pode produzir uma exacerbação do efeito tóxico da suainsonina.

Já em relação à suainsonina, o principal composto ativo tóxico encontrado na *I. carnea*, esta possui o seu mecanismo de ação há muito tempo conhecido, já que este alcalóide não é encontrado exclusivamente nesta planta, podendo ser isolado em outras plantas tóxicas distribuídas pelo mundo, e cuja intoxicação pelas mesmas promove sinais clínicos semelhantes àqueles observados em animais intoxicados com a *I. carnea*. Exemplos de plantas nas quais a suainsonina pode ser encontrada são aquelas pertencentes à família das Leguminosae, como a *Swainsona canescens*, originária da Austrália (DORLING; HUXTABLE; VOGUEL, 1978), e também em algumas espécies do gênero *Astragalus* e *Oxytropis*, nativas da América do Norte e conhecidas localmente como locoweed (VAN KAMPEN; JAMES, 1970); além de outras espécies de *Ipomoea*, como a *I. muelleri* do oeste da Austrália (GARDINER; ROYCE; OLDROY, 1965). Ainda, alguns fungos também podem produzir este alcalóide como metabólito secundário, sendo alguns exemplos aqueles do gênero *Metarhizium spp.* (TULLOCH, 1976) e *Rhizoctonia spp.* (SCHNEIDER et al., 1983).

O mecanismo de ação tóxico da suainsonina se estabelece por inibição de duas enzimas intracelulares a α -manosidase, também conhecida como manosidase

ácida ou lisossômica e a α -manosidase II do Complexo de Golgi. Os lisossomos são organelas responsáveis, não apenas em promover a degradação de glicoproteínas ou de microorganismos que são levados para o interior da célula por fagocitose ou pinocitose, mas são também importantes estruturas celulares responsáveis em catabolizar macromoléculas da própria célula; catabolismo este dependente de um aparato enzimático, para que tal reação possa resultar na produção de monossacarídeos, ácidos nucléicos, aminoácidos, entre outras moléculas mais simples que são liberadas novamente para o citosol, por meio de difusão passiva ou mediada por transportador de membrana para, então serem reutilizadas em novos processos de síntese (WHINCHESTER, 2005). Desta forma, quando ocorre o comprometimento da atividade de alguma destas enzimas responsáveis pelo catabolismo lisossomal, seja por distúrbios genéticos ou por ação de xenobióticos, ocorre o acúmulo de substrato o que resulta na denominada “moléstia do armazenamento lisossomal” (ELBEIN, 1991).

A enzima α -manosidase, se encontra confinada no interior de lisossomos e é responsável pelo catabolismo dos N-glicanos, a sua inibição faz com que, estes oligossacarídeos não metabolizados, principalmente aqueles ricos em resíduos α -manose e β -N-acetilglicosamina, se acumulem no interior desta organela, levando ao processo de degeneração vacuolar lisossomal que, persistindo este processo por não haver a retirada da exposição à planta, pode levar à perda da função celular e finalmente à sua morte (TULSIANI, 1988). A sintomatologia decorrente da ação da suainsonina é muito semelhante àquela observada em humanos e também em animais domésticos como: bovinos da raça Red Angus, Shorthorn, Galloway, Murray e Grey e também gatos da raça Persa, acometidos pela doença genética de caráter autossômico recessivo, a α -manosidosis (DORLING, 1984; JOLLY; WALKLEY, 1997).

Embora a sintomatologia desenvolvida por animais naturalmente intoxicados com a suainsonina seja de caráter neurológico, outras células de diferentes órgãos também são acometidas pela ação inibitória deste alcalóide. Assim, a avaliação histopatológica de diferentes tecidos, em diferentes espécies animais revela a presença das degenerações vacuolares lisossomais, as quais são observadas na tireóide, fígado, pâncreas e rins (VAN KAMPEN; JAMES, 1970; HUEZA et al., 2005; SCHUMAHER-HENRIQUE, 2005;).

Os N-glicanos, para serem sintetizados, passam por distintos processos enzimáticos que ocorrem em diferentes organelas. Ainda, no retículo endoplasmático rugoso, algumas proteínas já recebem oligossacarídeos ricos em resíduos de diferentes açúcares, entre eles o de manose, que são, então, transportadas no interior de vesículas para o Complexo de Golgi, para a produção de glicoproteínas complexas que serão secretadas para desempenhar suas diferentes funções celulares (FARQUHAR; HUARI, 1997). No Complexo de Golgi, os N-glicanos sofrem ação de várias enzimas, que atuam sobre elas de forma seqüencial, portanto, a inibição de uma delas pode acarretar em alterações importantes na estrutura final desta macromolécula. Dentre estas enzimas, a α -manosidase II do Complexo de Golgi está envolvida no processo de glicosilação em glicoproteínas, cabendo a esta manosidase remover ou alterar os padrões de resíduos de manose de glicoproteínas (N-glicanos) recém sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso. Assim, sua inibição promove alterações importantes nestas macromoléculas, resultando na formação de glicoproteínas defeituosas (MOREMEN; ROBBINS, 1991). Vale lembrar que muitas macromoléculas de grande importância biológica são glicoproteínas, entre elas: hormônios, moléculas de adesão, receptores de membrana, imunoglobulinas, citocinas entre outras (STEGELMEIER et al., 1998). De fato, diversos são os relatos de que a intoxicação por plantas que possuem suainsonina como princípio ativo promove alterações no sistema imune, como o comprometimento da função proliferativa de linfócitos T de ovinos (SHARMA; JAMES; MOLINEUX, 1984), linfócitos B humanos – estudo in vitro - (KARASUNO et al., 1992), e ainda supressão na maturação de neutrófilos humanos tratados com a suainsonina (MISAGO et al., 2000).

Em relação aos estudos referentes às células do sistema imune, não apenas efeitos supressores foram observados quando do uso da suainsonina. Muitos trabalhos realizados evidenciaram que este alcalóide e sua ação sobre a α -manosidase II do complexo de Golgi promove efeito imunomodulador sobre a resposta imune, como maior atividade proliferativa e citotóxica durante a reação da mistura de linfócitos (MLR – *Mixed Lymphocyte Reaction*) (HINO et al., 1985), aumento da proliferação induzida pela interleucina (IL) – 2 e maior expressão de receptores para IL-2 em linfócitos T humanos (BOWLIN; SUNKARA, 1988), aumento da atividade citotóxica de linfócitos Natural Killer (NK) (HUMPHRIES et al., 1988),

aumento da atividade tumoricida, da expressão de MHC-II (*Major Histocompatibility Complex-type II*), produção de IL-1 de macrófagos (GRZEGORZEWSKI et al., 1989), ativação de macrófagos residentes (DAS et al., 1995) e aumento da citotoxicidade de *Large Granular Lymphocytes* (LGL) contra carcinoma humano resistente a NK (YAGITA; SAKSELA, 1990).

A observação de tais efeitos imunomoduladores da suainsonina sobre diferentes componentes imunológicos, pode induzir na inferência de que o sistema imune dos animais de produção expostos à plantas que possuem a suainsonina como principio ativo, estejam menos predispostos a desenvolver qualquer processo infeccioso. Contrariamente, há relatos a campo de que animais intoxicados com estas plantas são mais suscetíveis à ocorrência de diversas afecções como pneumonias, doenças de casco e conjuntivite (SHARMA; JAMES; MOLINEUX, 1984). Além disso, vale salientar que indivíduos portadores da α -manosidosis autossômica são geralmente mais acometidos por infecções oportunistas que indivíduos normais, (ALROY et al., 1989; MALM et al., 2000).

Assim, com o objetivo de verificar se de fato a *I. carnea* possuía efeito imunomodulador sobre as diferentes respostas do sistema imune, alguns estudos realizados em nosso laboratório verificaram que a administração do resíduo aquoso final (RAF) obtido do processo de extração da *I. carnea*, com concentrações de suainsonina conhecida, promoveu em ratos adultos maior atividade de macrófagos peritoneais (HUEZA et al., 2003) e também ação imunomodulatória perinatal, estudo este no qual o RAF de *I. carnea* administrado à ratas durante a gestação ou lactação, promoveu nos filhotes em idade adulta (70 dias de vida), maior predisposição ao desenvolvimento de artrite reumatóide (auto-imune) induzida por desafio imunogênico, mostrando que, de fato a suainsonina possui caráter tóxico sobre o sistema imune em desenvolvimento (HUEZA, 2006).

Devido à esta observação, foi realizado, naquele momento, ensaios preliminares de imunotoxicidade, os quais empregaram alguns protocolos já estabelecidos como clássicos dentro da imunotoxicologia (DESCOTES, 1999), como: avaliação de peso relativo de órgãos linfóides (timo e baço) e respostas imunes humoral e celular de ratos pré-púberes (21 dias de vida) e ratos adultos (70 dias de vida) com o objetivo de verificar a diferença existente entre as idades dos

animais. Mais uma vez a *I. carnea* mostrou possuir efeito imunomodulatório sobre as respostas imunes experimentadas, e ainda, possibilitou verificar que a toxicidade sobre os parâmetros imunes estudados se mostrou diferente entre os animais jovens e os adultos (HUEZA, 2006).

Assim, o objetivo principal deste trabalho de pesquisa foi o de dar seqüência aos estudos de imunotoxicidade da *I. carnea* empregando para tal, tanto ratos pré-púberes quanto animais adultos, a fim de estabelecer as diferenças da toxicidade da planta sobre o sistema imune em desenvolvimento e aquele já estabelecido como maduro.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da *I. carnea* e de seu principal princípio ativo tóxico, a suainsonina, sobre o sistema imune de ratos jovens e adultos.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Imunopatologia 1- avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da *I. carnea* sobre diferentes parâmetros imunes e avaliação histopatológica de ratos adultos e jovens tratados com o resíduo aquoso da planta durante 14 dias, por gavage:
 - Realização de hemograma completo.
 - Avaliação do peso relativo de órgãos linfóides (timo e baço).
 - Celularidade do baço e da medula óssea.
 - Fenotipagem de linfócitos T e B presentes no sangue periférico e nos órgãos linfóides: timo e baço.
 - Histologia dos órgãos linfóides e também avaliação histopatológica de diferentes órgãos.

- ❖ Imunopatologia 2 - avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da suainsonina sobre diferentes parâmetros imunes e avaliação histopatológica de ratos jovens tratados com o alcalóide isolado durante 14 dias, por gavage:
 - Realização de hemograma completo.
 - Avaliação do peso relativo de órgãos linfóides (timo e baço).

- Celularidade do baço e da medula óssea.
 - Fenotipagem de linfócitos T e B presentes no sangue periférico e nos órgãos linfóides: timo e baço.
 - Histologia dos órgãos linfóides e também avaliação histopatológica de diferentes órgãos.
-
- ❖ Atividade proliferativa: avaliação da atividade proliferativa de linfócitos T de ratos jovens tratados com a suainsonina durante 14 dias, por gavagem.
 - ❖ Toxicocinética: estudo toxicocinético da suainsonina em ratos tratados com o resíduo aquoso da *I. carnea*, por gavagem.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos com 21 ou 60 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP. Os animais foram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm, as quais foram mantidas em salas com temperatura e umidade ambiente constante (21-24°C e 65-70%, respectivamente) e com livre acesso à água e ração, e foram utilizados de acordo com as normas de bioética desta Faculdade.

3.2 Reagentes e equipamentos

- Adjuvante completo de Freund (Sigma);
- Álcool etílico 95° GL (Dinâmica[®]);
- Analisador sanguíneo ABC Vet[®] (Horiba);
- Anticorpos conjugados a ficoeritrina anti-CD4, anti-CD8, anti-CD 45R, anti-CD32 e anti-IgM (Pharmingen, BD);
- Azul de Tripán 4% (Gibco);
- Citometro de Fluxo (Becton Dickison Immunocytometry System);

- Ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Merck);
- Espectrofotômetro (Biotek);
- Hidróxido de sódio (Merck);
- Hidróxido de amônio (Synth);
- Lâminas e lamínulas (Glasstechica);
- Meio de cultura RPMI-1640 (Gibco);
- Paraformaldeído (Synth[®]);
- Placas de 6 e de 96 wells com fundo chato e fundo em U (Costar);
- Penicilina e estreptomicina (Cultlab);
- Software Cell Quest Pro[®] (Becton Dickison Immunocytometry System);
- Software FlowJo 7.2.2[®] (Tree Star Inc);
- Soro albumina bovina – fração V (Gibco[®]);
- Seringas descartáveis de 1,0 e 3,0 mL (Rynco[®]);
- Freezer -20°C;
- Microscópio de luz modelo Nikon;
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf[®]);
- Rotaevaporador (Fisaton[®]);

3.3 Material vegetal

As folhas frescas da *Ipomoea carnea* (*I. carnea*), foram colhidas, em abril de 2009 da cultura existente no Centro de Pesquisas Toxicológicas – CEPTOX – do Departamento de Patologia da FMVZ, Campus de Pirassununga, USP.

3.4 O Alcalóide: Suainsonina

O alcalóide indolizidínico foi extraído, purificado e gentilmente cedido para execução deste trabalho de pesquisa pelo Dr. Dale Gardner do *Poisonous Plant Research Laboratory* (PPRL) – *United States Department of Agriculture* (USDA) – Utah- EUA.

3.5 Procedimentos

3.5.1 Extração de princípios ativos da *I. carnea*

As folhas frescas de *I. carnea*, foram trituradas no liquidificador e maceradas a frio com álcool etílico 95% por três dias. O extrato etanólico obtido foi filtrado e o resíduo vegetal voltou para o recipiente para nova extração com álcool etílico 95%. Este processo foi realizado por mais quatro vezes com a mesma porção de folhas.

Os extratos foram reunidos e concentrados totalmente através do rotaevaporador sob pressão reduzida à 50°C para eliminar o solvente, sendo em seguida dissolvidos em água destilada e filtrados em papel de filtro pregueado para separar a porção insolúvel da porção solúvel. Esta última porção foi fracionada por partição com solvente imiscível, butanol saturado com água, até a porção butanólica ficar com coloração clara. Tanto a solução butanólica como a solução aquosa final deste fracionamento, foram concentradas totalmente, para obtenção do resíduo butanólico e do resíduo aquoso final (RAF), o qual por meio de ensaio biológico e químico, anteriormente realizado, mostrou ser a fração detentora dos alcalóides, sendo este administrado aos animais experimentais em diferentes doses.

3.5.2 Determinação quantitativa dos alcalóides

Porções do RAF da *I. carnea* foram encaminhadas ao laboratório do Dr. Dale Gardner do USDA-ARS *Poisonous Plants Research Laboratory*-EUA, onde foram analisadas quantitativamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a espectrômetro de massas (MS).

As doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de folhas secas de *I. carnea* presentes no RAF equivalem a aproximadamente às concentrações de 0,8; 2,3 e 5,0 mg/kg de suainsonina existente no RAF.

3.5.3 Administração do RAF da *I. carnea* e da suainsonina

As doses do RAF da *I. carnea* foram obtidas por meio da diluição do resíduo obtido da extração da planta com água potável, as quais foram mantidas em

geladeira até o momento do uso. A administração das doses do RAF da *I. carnea* aos ratos foi realizada por via oral, especificamente por *gavage*, nas doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg, durante 14 dias. As doses aqui empregadas foram estabelecidas em estudos anteriores (HUEZA, 2006) nos quais tomou-se como medida para administração a quantidade de suainsonina presente nas folhas secas presentes no RAF da *I. carnea*.

Para administração do alcalóide isolado, foi preparada uma solução de suainsonina diluída com água potável na dose de 5mg/kg, referente ao valor deste alcalóide presente na maior dose do RAF da *I. carnea*. Os ratos pertencentes ao grupo controle receberam, pela mesma via, apenas o mesmo volume de água de bebida durante o mesmo período que os diferentes grupos experimentais.

O grupo pair-feeding (PF) entrou no delineamento experimental 1 dia após o início do tratamento dos outros grupos. Estes animais receberam apenas o valor médio de ração que foi consumida pelos ratos tratados com a maior dose mensurada a dia.

3.5.4 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratos

Os ratos foram pesados antes do início dos tratamentos para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. O consumo de ração, bem como o peso dos animais, foi mensurado dia sim, dia não, durante todo o período experimental.

3.5.5 Coleta de sangue

Para a coleta de sangue, os ratos foram anestesiados com xilazina e cetamina (5,0 e 50 mg/kg, respectivamente por via i.p.), coletando-se em seguida o sangue por punção intracardíaca. Foram coletadas amostras sanguíneas em tubos heparinizados para realização do hemogramas e não-heparinizadas para retração de coágulo, centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm em centrífuga refrigerada e separação do soro, o qual foi acondicionado individualmente em tubos plásticos devidamente identificados e estocados em freezer a -20°C até o processamento.

3.5.6 Histopatologia

No final de cada delineamento experimental, procedeu-se à coleta de fragmentos representativos de diferentes órgãos tais como: baço, fígado, rins, timo e sistema nervoso central (SNC) que foram conservados em formol a 10%, até o momento do processamento.

3.5.7 Órgãos linfóides

Após a coleta e pesagem do timo e do baço, este último órgão linfóide foi divulsionado entre duas lâminas e lavado com 10 mL de solução gelada de RPMI-1640 com pH 7,4. As células foram acondicionadas em gelo até o momento da contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram mensuradas utilizando-se o corante azul de tripan diluído 6x em PBS. O timo destinado à avaliação histopatológica foi pesado e posteriormente foi acondicionado em frasco previamente identificado contendo formol, para posterior

análise morfométrica. Aqueles timos que seriam destinados ao isolamento de tímócitos para fenotipagem linfocítica foram divulsionados de maneira semelhante aquele realizado com o baço dos animais.

3.5.8 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 5,0 mL de solução gelada de RPMI ajustada para o pH 7,4. As células foram acondicionadas em tubos de poliestireno e dispersas com auxílio de pipeta tipo “Pasteur” até obter-se uma suspensão celular homogênea. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de tripan, diluído 6x em PBS.

3.5.9 Fenotipagem de subpopulações linfocíticas

Para a determinação das subpopulações de linfócitos foi realizada análise por citometria de fluxo, em que as células foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Foward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências do isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram detectadas pelo filtro FL-1 (530 nm), da ficoeritrina (PE) foram detectadas pelo filtro FL-2 (585 nm) e da peridinin chlorophyll protein - cyanine dye 5.5 (PerCP-Cy5.5) e da ficoeritrina – cyanine dye 7 (PE-Cy7) foram detectadas pelo filtro FL-3 (> 650 nm).

Todos os dados foram analisados através do software FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA), sendo as populações de interesse em cada experimento selecionadas por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Além disto, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

As células linfóides foram obtidas de fragmentos de baço e timo, os quais foram acondicionados em microtubos de 2 mL, contendo 1 mL de RPMI. Após duas

lavagens com RPMI, baço e timo foram divulsionados com 5 mL de RPMI, até obter uma suspensão de células. A suspensão de células esplênicas foi centrifugada a 1200 rpm/8 min e ressuspensa em 10 mL de solução de lise (cloreto de amônio). Cerca de dois minutos após, as amostras foram novamente centrifugadas. Este processo foi repetido mais uma vez para completa lise dos eritrócitos. Em seguida, tanto timócitos quanto esplenócitos foram ressuspensas em 5 mL de RPMI, contadas e ajustadas para 1×10^6 cels/100 μ L em microtubos de 1,5 ml, para marcação das moléculas de superfície. Também foi coletado o sangue dos animais para análise de linfócitos circulantes, 100 μ L de sangue de cada animal foram lisados com 2,0 mL de solução salina 0,2% durante 20 segundos e depois adicionados 2,0 mL de solução salina 1,6% para estabilizar o meio, o procedimento foi repetido até a completa lise dos eritrócitos, após isso as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 μ L de PBS para marcação das moléculas de superfície.

A caracterização das moléculas de superfície dos linfócitos T foi realizada com o uso de anticorpos monoclonais conjugados a fluoresceína ou ficoeritrina: anti-CD4 para linfócitos T helper, anti-CD8 para linfócitos T citotóxicos e finalmente, anticorpos anti-CD45 e IgM para linfócitos B. Para bloquear receptores inespecíficos foram utilizados anticorpos anti-CD32.

Uma alíquota de 100 μ L da suspensão de esplenócitos, timócitos, ou células do sangue (10^6 cels/mL) foram acondicionadas em tubos para citometria e incubadas com os diferentes anticorpos marcados, durante 1 hora, no escuro, à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas e ressuspensas em 300 μ L de PBS para então ser analisado por meio de citometria de fluxo.

3.5.10 Avaliação da atividade proliferativa de linfócitos T

Ratos foram imunizados com anatoxina tetânica (AT) na dose de 100 μ L de AT [50 LF/mL¹] diluída 1:1 em PBS e adjuvante completo de Freund, por via

¹ LF: Limite de floculação é a quantidade de um anticorpo (medido em unidades internacionais), que equilibra o antígeno presente de tal forma que o complexo antígeno-anticorpo precipitado seja estável (floculação).

subcutânea. Sete dias após a imunização, os ratos foram submetidos à eutanásia para coleta do baço, que foi divulsionado e após a lise das hemácias, os esplenócitos foram mantidos em placas de 6 poços por 2 horas em estufa (37°, 5% CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações após aderência ao plástico. Esta etapa serve para que os macrófagos fiquem aderidos às placas e apenas os linfócitos fiquem em suspensão. Após este período, as populações de células não-aderentes e aderentes foram cuidadosamente separadas e depois foram co-cultivadas em placas de 96 poços, na proporção de 30:1 (não-aderentes: aderentes), ou seja, $1,93 \times 10^5$ ($38,7 \times 10^5$ céls/mL, plaqueta 50 µL) não-aderentes para $6,5 \times 10^3$ ($1,3 \times 10^5$ céls/mL, plaqueta 50 µL) aderentes. Em seguida, fez-se a estimulação em triplicata acrescentando-se 10µL/ poço dos seguintes estímulos: meio completo (basal) e 20LF de AT. As placas foram então mantidas em estufa (37°, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada) por 3 dias e após este período, as células em suspensão foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-C8 e analisadas por meio de citometria de fluxo quanto à porcentagem de proliferação. Para o cálculo do índice de proliferação utilizou-se a fórmula abaixo.

$$\text{Índice de proliferação} = \frac{\text{Porcentagem de linfócitos estimulados}}{\text{Porcentagem de linfócitos não estimulados}}$$

3.5.11. Estudo Toxicocinético da suainsonina por meio do ensaio de inibição da enzima α - manosidase²

Para a quantificação de suainsonina no soro, coletou-se sangue dos animais nos tempos: 0, 30min, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24h. O sangue de cada animal foi alocado em microtubos sem EDTA. Após retração do coágulo, este material biológico foi centrifugado por 15 min a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi submetido ao ensaio de inibição da α -manosidase para determinação indireta da concentração de suainsonina na amostra. Para isto, 300 µL

² Este estudo foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Stegelmeier, no PPRL – Utah, EUA.

de soro foram misturados a 600 μL de tampão acetato 0,2 M (pH 5) esta mistura foi acondicionada em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos, 150 μL do sobrenadante de cada amostra foram pipetados em placas de 96 poços e a cada poço foram adicionados 15 μL de uma solução de α - manosidase (5,0 mg/mL) e 10 μL de p-nitrophenyl α - D- mannoside (10mM). Esta mistura foi então encubada a 37°C por 1h. Após este período, a reação enzimática foi parada com adição de 100 μL de glicina (2,5M) e submetido a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 400nm. Para quantificação indireta da suainsonina presente no soro e submetido ao ensaio enzimático, foi preparada uma curva padrão com concentrações conhecidas de suainsonina.

3.5.12 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett para comparação dos grupos experimentais com o grupo controle. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises que apresentaram nível de significância de $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão e os dados de porcentagem estão expressos como mediana (mínimo – máximo).

Delineamento experimental e

Resultados

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Avaliação do hemograma, peso relativo de órgãos linfóides, celularidade de medula óssea e baço, avaliação histopatológica de baço, timo, cérebro, fígado e rins

Foram utilizados 90 ratos machos, sendo subdivididos em subgrupos compostos por 45 ratos jovens e 45 ratos adultos, os quais foram separados em cinco grupos: um controle (Co), 3 experimentais (n=10/grupo) que receberam, por gavagem, durante 14 dias as doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF e um grupo PF (n=5) que recebeu a mesma quantidade de ração que o grupo tratado com a maior dose de RAF ingeriu, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período, conforme descrito no item 3.5.3. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses e também se avaliou o consumo de ração (item 3.5.4). No último dia de experimentação (15º dia), todos os animais foram pesados e então submetidos à eutanásia por meio da decaptação, para coleta de sangue total para realização do hemograma e para coleta dos diferentes órgãos linfóides para a realização do peso relativo e celularidade dos mesmos, bem como realização da coleta de fragmentos significativos dos mesmos para avaliação histológica e ainda, coleta de células da medula óssea para determinação de sua celularidade, conforme detalhadamente descrito nos itens 3.5.5; 3.5.6; 3.5.7 e 3.5.8.

4.1.1 Resultados

Em relação ao ganho de peso de ratos adultos, a ANOVA revelou haver alterações significantes entre os grupos de animais ($F=66,17$; $df=4,40$ com $p<0,05$). De fato, o teste *post hoc* de escolha revelou que ratos adultos tratados com as

maiores doses do RAF, ou seja, 3,0 e 7,0 g/kg da planta e do grupo PF tiveram um menor ganho de peso que aqueles ratos adultos do grupo controle. Da mesma forma, o mesmo teste de variância empregado, revelou haver diferenças estatísticas entre os grupos de ratos jovens ($F= 13,62$; $df=4,40$ com $p<0,05$). O teste de Dunnett revelou que ratos jovens tratados com 3,0 e 7,0 g/kg do RAF também apresentaram um menor ganho de peso quando comparados com seu respectivo grupo controle, como pode ser observado na tabela 1 e na figura 2.

Tabela 1 – Avaliação do ganho de peso total (em gramas) de ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias, por gavagem

		Ganho de peso (g)				
		Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^b
Adulto		62,0 ± 10,4	49,8 ± 9,6	18,3 ± 18,7***	-15,0 ± 13***	8,4 ± 3,8***
Jovem		97,5 ± 16,3	89,4 ± 9,4	76,3 ± 14,0**	64,1 ± 9,2***	82,1 ± 7,65

^an=10 ratos/grupo; ^b n=5 animais. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. ** p<0,01; *** p<0,001 versus grupo controle; Teste Dunnett

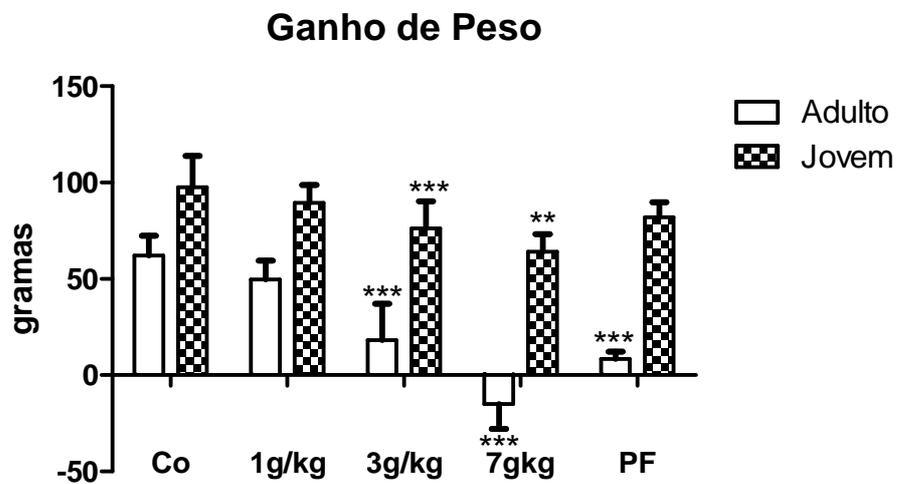


Figura 2 – Ganho de peso total (em gramas) de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias, por gavagem. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão. PF=grupo *pair-feeding*. **p<0,01, ***p<0,001, Teste de Dunnett

A tabela 2 mostra e a figura 3 ilustra os dados referentes à média de consumo médio diário de ração dos ratos adultos tratados ou não com o RAF da *I. carnea*. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos de animais ($F= 48,40$ $df=3,36$, $p<0,05$). O teste de Dunnett evidenciou que o consumo de ração dos ratos tratados com 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea* estava estatisticamente diminuído quando comparado com o grupo de ratos adultos não tratados com a planta (controle). Mais uma vez, de forma semelhante àquela relatada em relação ao ganho de peso, a ANOVA também mostrou haver diferenças significantes entre os grupos de ratos jovens ($F= 10,44$ $df= 3,36$, $p<0,05$). O teste de Dunnett mostrou que ratos jovens tratados com as duas maiores doses apresentaram diminuição estatisticamente significante no consumo de ração que seus pares do grupo controle.

Tabela 2 – Consumo médio diário total de ração (em gramas) dos ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias.

Consumo médio diário de ração				
(g)				
	Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a
Adulto	49,3 ± 3,4	46,3 ± 2,2	36,2 ± 6,7***	28,8 ± 3,4***
Jovem	36,0 ± 4,0	35,0 ± 4,5	31,5 ± 3*	28,0 ± 2,0***

^an=10 ratos/grupo. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. * p<0,05; ***p<0, 001 *versus* grupo controle; Teste Dunnett

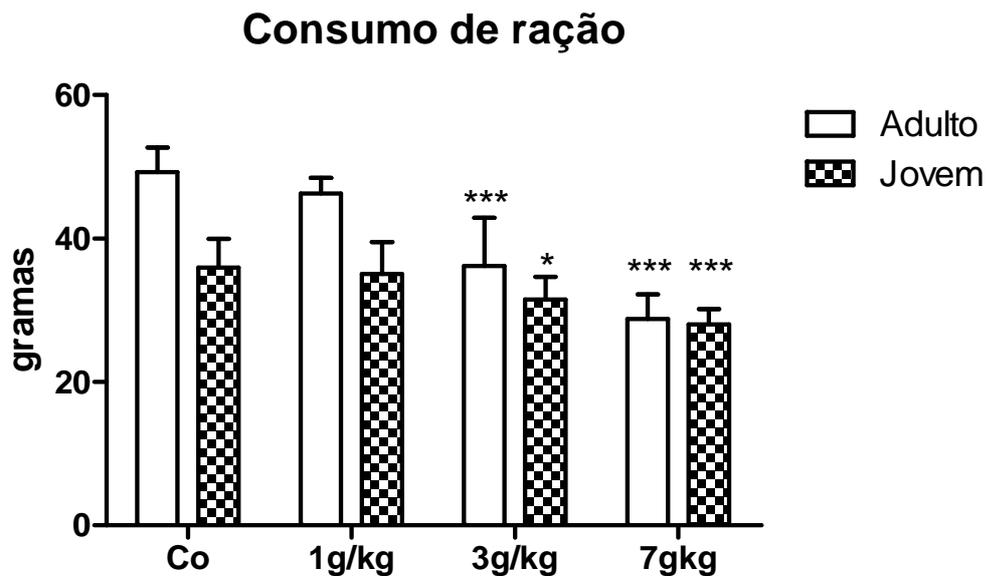


Figura 3 – Consumo médio diário total de ração (em gramas) de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão. PF=grupo *pair-feeding*. *p<0,05, ***p<0, 001 *versus* grupo controle; Teste de Dunnett

A tabela 3 mostra e a figura 4 ilustra os dados referentes ao peso relativo do timo dos ratos adultos tratados ou não com o RAF da *I. carnea*. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos de animais ($F= 4,81$ $df= -4,40$, $p<0,05$). O teste de Dunnett evidenciou que o peso relativo do timo dos ratos tratados com 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea* e do grupo PF estava estatisticamente diminuído quando comparado com o grupo de ratos adultos não tratados com a planta. Entretanto, o teste matemático empregado (ANOVA) não foi capaz de evidenciar qualquer alteração estatisticamente significante entre os diferentes grupos de animais jovens.

Tabela 3 – Peso relativo do timo (g/100g de P.V.) dos ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0g/Kg de RAF durante 14 dias

	Peso relativo do timo (g/100g de P.V.)				
	Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^b
Adulto	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,03*	0,10 ± 0,03**	0,10 ± 0,05**
Jovem	0,27 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,03

^an=10 ratos/grupo; ^bn=5 ratos. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. * p<0,05, **p<0,01 *versus* grupo controle; Teste Dunnett

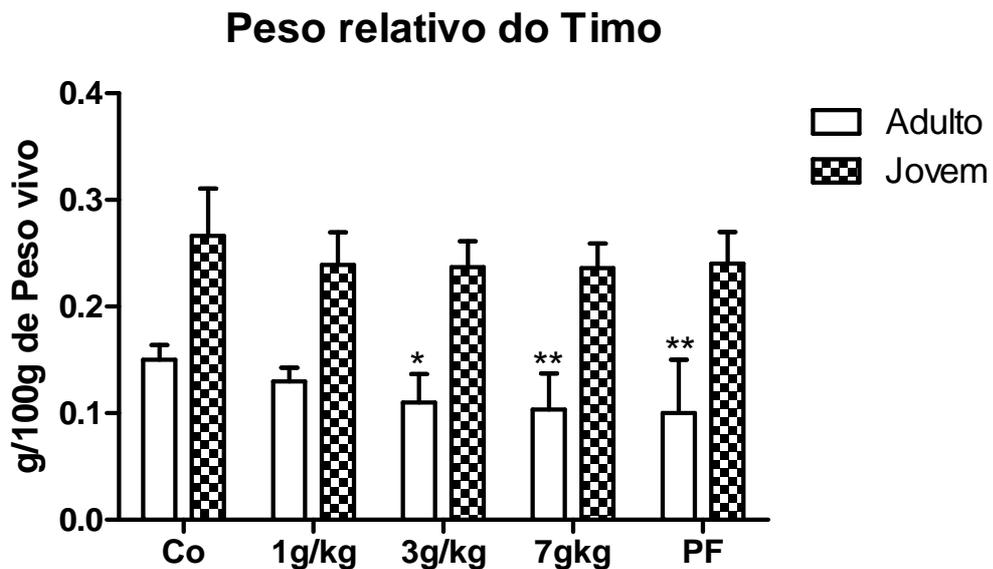


Figura 4 – Peso relativo do timo (g/100g de PV) de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão. PF=grupo *pair-feeding*. * p<0,05 ** p<0, 01 Teste de Dunnett

A tabela 4 mostra e a figura 5 ilustra os dados referentes ao peso relativo do baço dos ratos adultos tratados ou não com o RAF da *I. carnea*. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos de animais ($F= 4,34$ $df=4,41$, $p<0,05$). O teste de Dunnett evidenciou que o peso relativo do baço dos ratos tratados com 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea* estava estatisticamente aumentado quando comparado com o grupo de ratos adultos não tratados com a planta, Entretanto, o teste matemático empregado (ANOVA) não foi capaz de evidenciar qualquer alteração estatisticamente significante entre os diferentes grupos de animais jovens.

Tabela 4 – Peso relativo do baço (g/100g de P.V.) dos ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg g/Kg de RAF durante 14 dias

	Peso relativo do baço (g/100g de P.V.)				
	Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^b
Adulto	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,29 ± 0,05**	0,23 ± 0,02
Jovem	0,31 ± 0,06	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,05	0,36 ± 0,05	0,32 ± 0,05

^an=10 ratos/grupo; ^bn=5 ratos. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. **p<0,01 *versus* grupo controle; Teste Dunnett

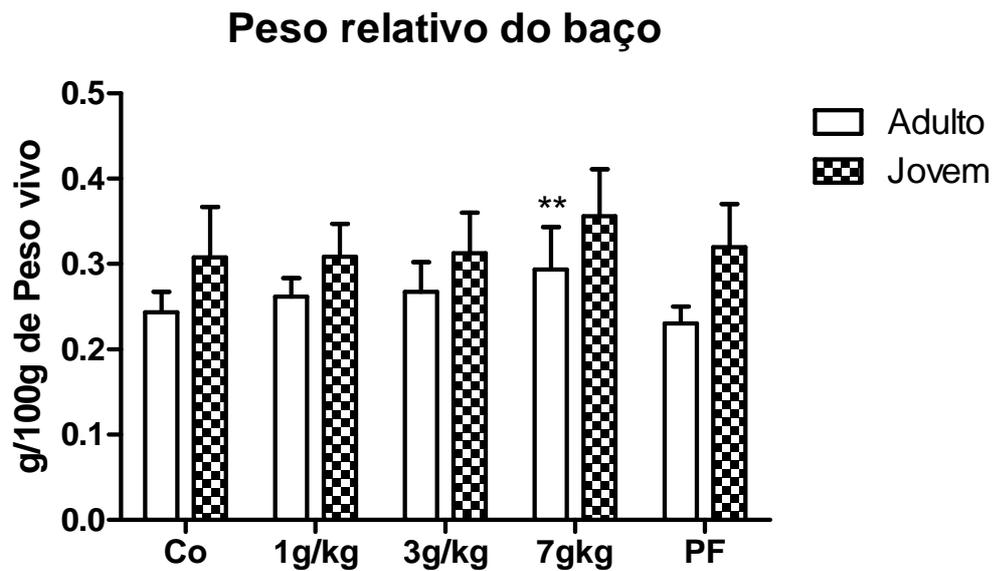


Figura 5 – Peso relativo do baço (g/100g de P.V) de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão. PF=grupo *pair-feeding*. ** p< 0, 01 Teste de Dunnet

A tabela 5 mostra e a figura 6 ilustra os dados referentes à celularidade do baço dos ratos adultos e jovens tratados ou não com o RAF da *I. carnea*. O teste matemático empregado (ANOVA) revelou não haver diferenças significantes tanto entre os grupos de animais adultos, quanto entre os grupos de animais jovens.

Tabela 5 – Celularidade total do baço ($\times 10^7$) dos ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias

	Celularidade do Baço				
	($\times 10^7$)				
	Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^b
Adulto	4,1 \pm 2,0	3,4 \pm 1,1	2,7 \pm 0,13	2,9 \pm 0,9	3,5 \pm 0,8
Jovem	6,7 \pm 2,3	5,4 \pm 1,3	6,4 \pm 1,8	6,1 \pm 1,2	5,0 \pm 1,4

^an=10 ratos/grupo; ^bn=5 ratos. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão

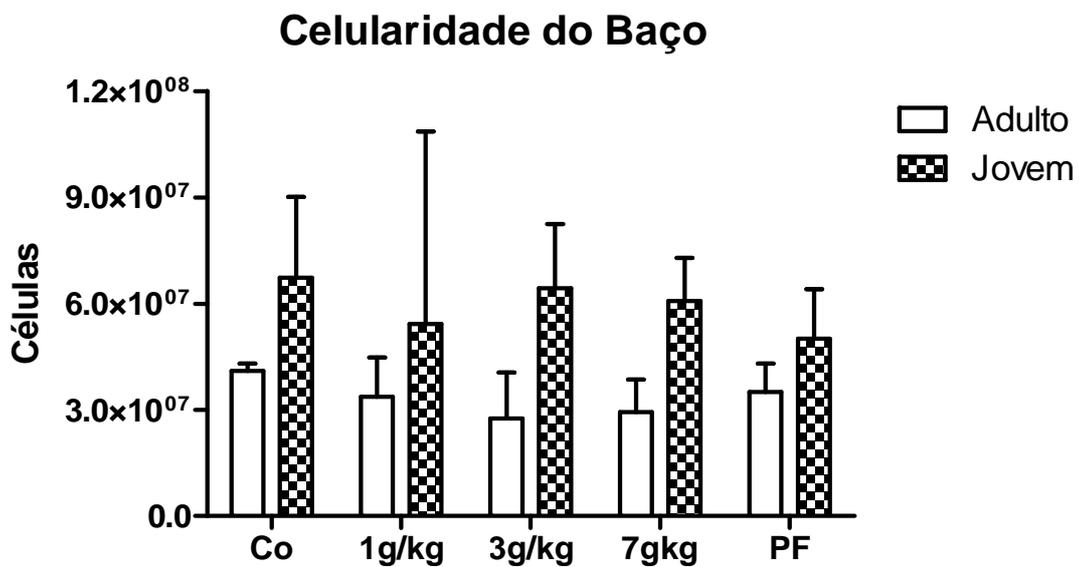


Figura 6 – Celularidade do baço de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão PF=grupo *pair-feeding*.

A tabela 6 mostra e a figura 7 ilustra os dados referentes à celularidade de medula óssea dos ratos adultos tratados ou não com o RAF da *I. carnea*. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos de animais ($F= 11,62$ $df= 4,41$, $p<0,05$). O teste de Dunnett evidenciou que a celularidade da medula óssea dos ratos tratados com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF *I. carnea* e do grupo PF estava estatisticamente diminuído quando comparado com o grupo de ratos adultos não tratados com a planta. Entretanto, o teste matemático empregado (ANOVA) não foi capaz de evidenciar qualquer alteração estatisticamente significante entre os diferentes grupos de animais jovens.

Tabela 6 – Celularidade de medula óssea de ratos adultos e jovens tratados com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias

Celularidade de medula óssea ($\times 10^7$)					
	Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^b
Adulto	6,5 ± 1,5	4,4 ± 1,9*	3,5 ± 1,4***	2,7 ± 1,3***	2,2 ± 0,2***
Jovem	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,6	2,0 ± 1,1	1,9 ± 1,1	1,3 ± 0,1

^an=10 ratos/grupo; ^bn=5 ratos. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. *p< 0,05, ***p<0, 001 *versus* grupo controle; Teste de Dunnett

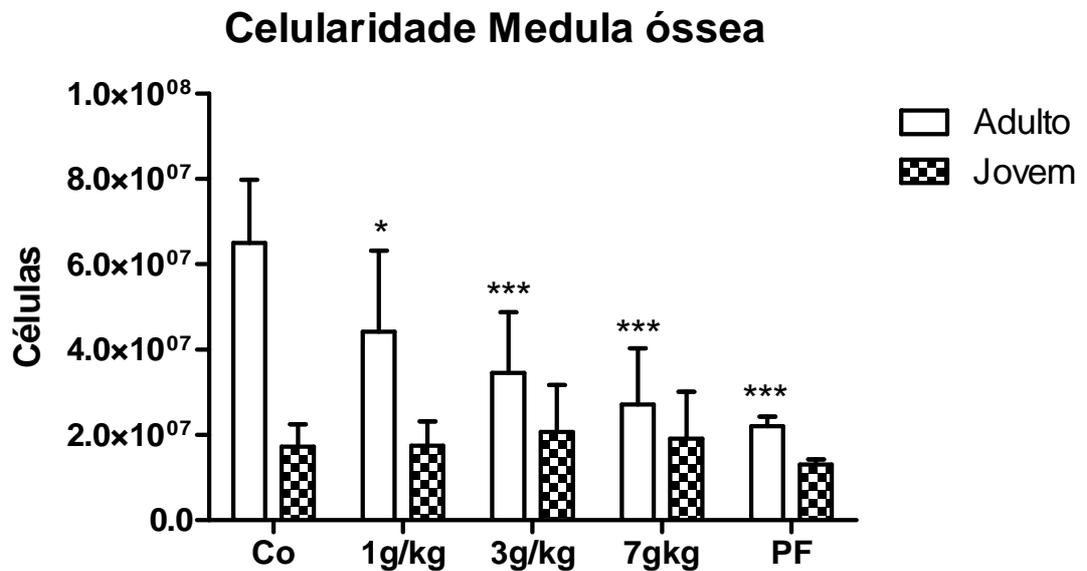


Figura 7 – Celularidade de medula óssea de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. PF=grupo *pair-feeding*. *p< 0,05, ***p<0, 001; Teste de Dunnett

O teste matemático empregado (ANOVA) na avaliação do hemograma completo dos ratos adultos revelou diferenças significantes entre os grupos de animais em relação ao número de leucócitos ($F= 6,30$ $df= 3,36$ e $p<0,05$) e sobre o volume corpuscular médio (VCM) ($F= 9,4$ $df= 3,36$ e $p<0,05$). O teste de Dunnet evidenciou aumento significativo do número de leucócitos dos animais tratados com 7,0g/kg de RAF da *I. carnea* e diminuição do volume corpuscular médio (VCM) entre os ratos tratados com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF da *I. carnea*. Entretanto quando avaliado o hemograma dos animais jovens a ANOVA revelou diferenças significantes apenas em relação ao VCM ($F= 19,77$ $df= 3,36$ e $p<0,05$). O teste de Dunnet evidenciou diminuição significativa deste parâmetro entre os grupos de animais tratados com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF da *I. carnea*. (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação do hemograma completo dos animais adultos e jovens tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias

Grupo	Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	Plaquetas (10 ⁶ /mm ³)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (μ ³)	HCM (μg)	CHCM (%)
Adulto	3,4 ± 1,2	7,6 ± 0,4	782,7 ± 63,6	14,4 ± 1,1	40,1 ± 2,0	52,6 ± 0,7	18,8 ± 0,6	35,8 ± 1,0
Jovem	3,4 ± 0,9	6,0 ± 0,4	743,4 ± 89,6	10,7 ± 2,0	38,9 ± 2,5	64,8 ± 1,8	17,8 ± 3,4	27,4 ± 5,0
Adulto	3,6 ± 1,2	7,5 ± 0,4	769,0 ± 122,3	13,8 ± 0,8	37,8 ± 2,0	50,5 ± 1,0***	18,5 ± 1,0	36,6 ± 1,1
Jovem	3,8 ± 0,7	6,0 ± 0,4	666,0 ± 109,0	11,7 ± 0,8	38,4 ± 2,5	62,3 ± 2,0***	19,0 ± 1,0	30,5 ± 1,0
Adulto	4,2 ± 1,0	7,6 ± 0,6	722,0 ± 68,3	14,0 ± 1,0	38,0 ± 3,0	49,9 ± 1,3***	18,5 ± 0,4	37,0 ± 0,9
Jovem	4,0 ± 2,0	6,0 ± 1,2	637,0 ± 139,3	11,3 ± 2,2	36,0 ± 7,4	60,4 ± 1,0***	19,0 ± 0,5	31,5 ± 0,8
Adulto	5,6 ± 1,3**	7,8 ± 0,4	713,1 ± 79,4	14,5 ± 0,9	39,0 ± 2,5	50,0 ± 1,8***	18,5 ± 0,5	37,0 ± 1,0
Jovem	5,4 ± 1,5	5,5 ± 2,0	593,5 ± 147,3	10,4 ± 3,4	33,0 ± 10,5	59,6 ± 1,4***	18,6 ± 1,3	31,3 ± 2,0

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. **p<0,01; *** p<0,001 *versus* grupo controle; Teste Dunnett

Na avaliação histopatológica dos órgãos não foram observadas alterações no timo e cérebro dos animais tratados com as diferentes doses de RAF (dados não mostrados). Contudo, foi possível observar naqueles animais tratados com a maior dose do RAF congestão moderada à severa no fígado e baço (dado não mostrado) tanto dos animais adultos quanto nos jovens, esta mesma dose causou nos rins severa vacuolização e edema dos túbulos proximais. Já com a dose de 3,0g/kg a vacuolização mostrou-se menos intensa, sendo estas lesões menos severas nos animais jovens. (figuras 8 e 9).

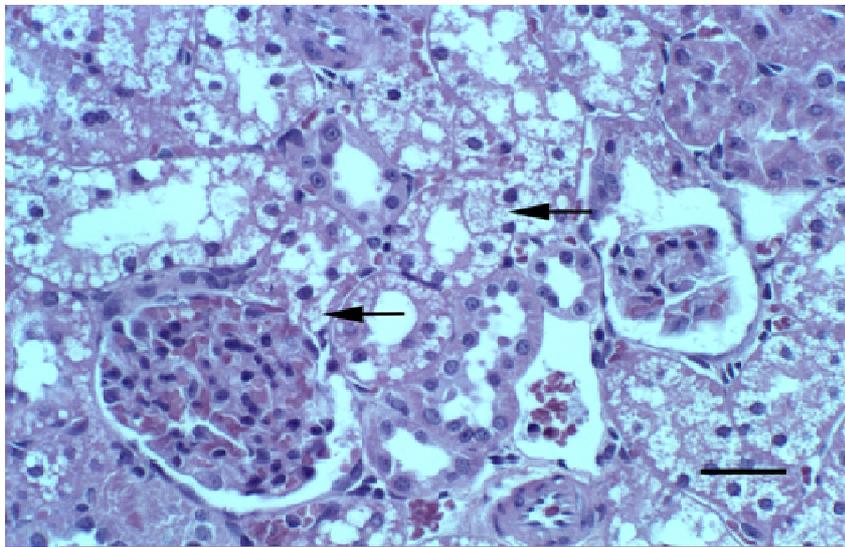


Figura 8 – Fotomicrografia do rim de rato adulto tratado com 7,0g/Kg de RAF por 14 dias, as setas indicam severa vacuolização e edema dos túbulos proximais. Barra= 30 μ M

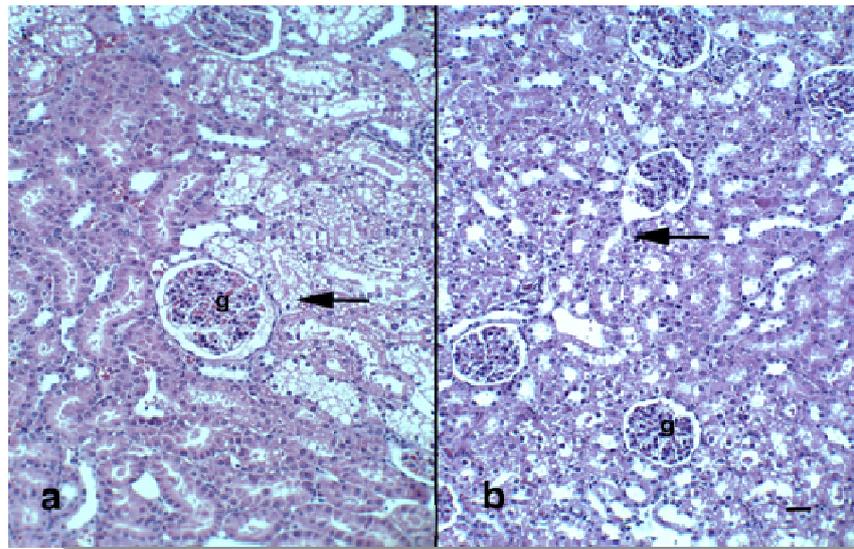


Figura 9 – Fotomicrografia do rim de rato adulto (a) e de rato jovem (b) tratados com 3,0g/Kg de RAF durante 14 dias, as setas indicam vacuolização e edema dos túbulos proximais. G= glomérulo Barra= 30 μ M

4.2 Experimento 2 – Fenotipagem linfocítica: Avaliação das subpopulações de linfócitos B e T presentes no sangue, baço e timo de ratos jovens e adultos tratados com RAF

Foram utilizados 50 ratos machos, sendo subdivididos em subgrupos compostos por 25 ratos jovens e 25 ratos adultos, os quais foram separados em cinco grupos: um controle (Co), 3 experimentais que receberam por gavagem durante 14 dias as doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF e um grupo PF que recebeu a mesma quantidade de ração que o grupo tratado com a maior dose de RAF ingeriu, os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período, conforme descrito no item 3.5.3. Durante todo o período experimental fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses. No último dia de experimentação (15^o dia), todos os animais foram pesados e foram então submetidos á eutanásia por meio da decaptação, a realização da fenotipagem linfocítica, conforme detalhadamente descrito no item 3.5.9.

4.2.1 Resultados

Quando avaliado a fenotipagem de linfócitos T do timo dos ratos adultos o teste matemático empregado (Kruskal Wallis) revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os grupos de ratos tratados com o RAF de *I. carnea* em relação ao grupo controle em nenhuma das etapas do desenvolvimento linfocítico. Porém, quando avaliado a fenotipagem de linfócitos T dos ratos jovens o teste Kruskal Wallis revelou haver diferenças significantes entre os grupos de animais jovens tratados com RAF de *I. carnea* e grupo PF em relação ao grupo controle ($p<0,05$) o teste de Dunn evidenciou aumento da porcentagem de linfócitos T citotóxicos imaturos ($CD3^+CD8^+$) nos grupos tratados com 7,0g/kg de RAF e também no grupo PF conforme ilustra a figura 10.

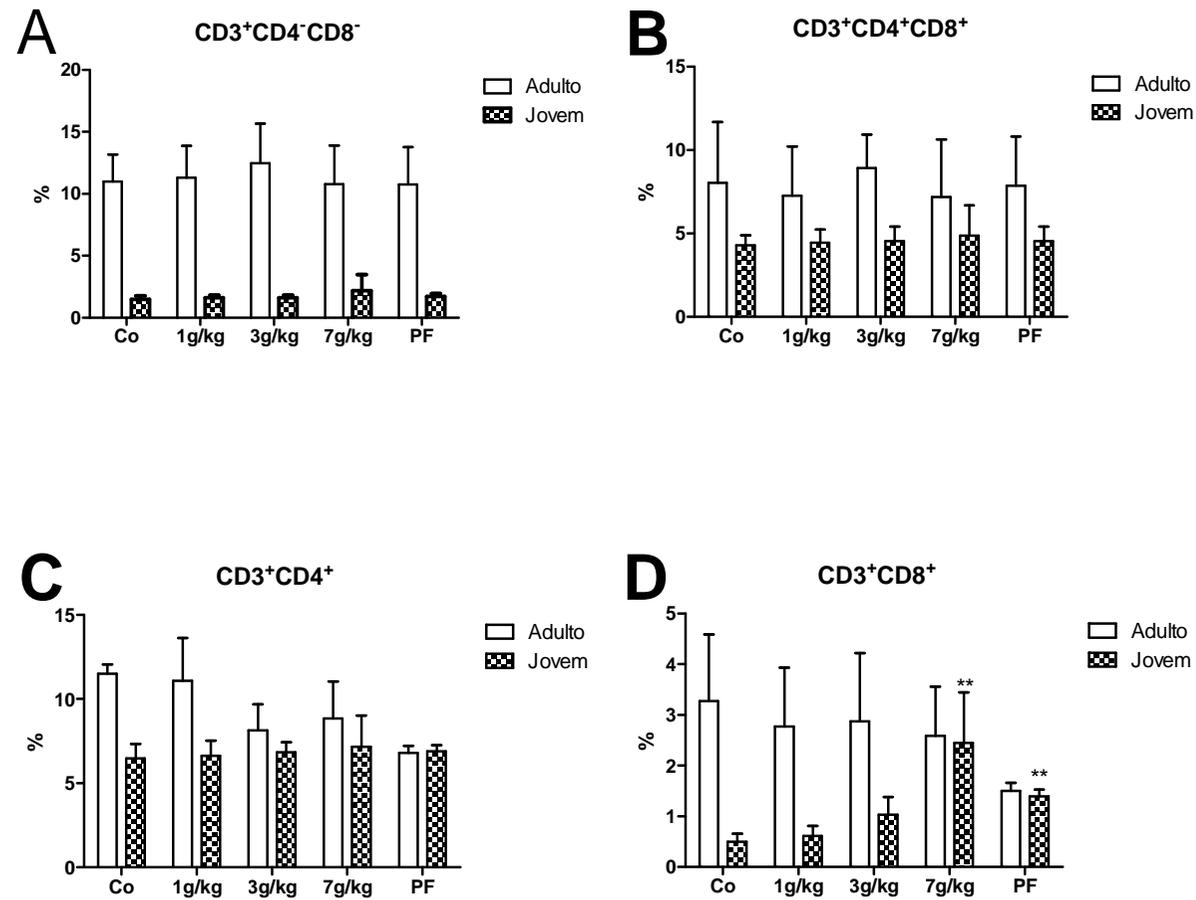


Figura 10 – Fenotipagem de dos linfócitos T no timo de ratos jovens e adultos tratados com diferentes doses de RAF durante 14 dias. **A.** células Pré – T (CD3+CD4-CD8-). **B.** células Duplo-positivas (CD3⁺CD4⁺CD8⁺). **C.** Linfócitos T *helper* imaturos (CD3⁺CD4⁺). **D.** Linfócitos T citotóxicos imaturos (CD3⁺CD8⁺) Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. PF=grupo *pair-feeding* **p<0, 01 Teste de Dunn. n=5 ratos por grupo

A tabela 8 mostra e a figura 11 ilustra os dados da fenotipagem de linfócitos T *helper* (CD3⁺CD4⁺) do timo, sangue e baço dos ratos adultos e jovens tratados com diferentes doses de RAF. O teste matemático empregado (Kruskal Wallis) revelou não haver diferenças significantes desta população celular ($p>0,05$).

Tabela 8 – Porcentagem de linfócitos T *helper* (CD3⁺CD4⁺) do timo, sangue e baço de ratos adultos e jovens tratados com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias

		Linfócito T CD3 ⁺ CD4 ⁺				
		(%)				
		Grupos				
		Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^a
Timo	Adulto	11,5 ± 0,6	11,0 ± 2,5	8,0 ± 1,5	9,0 ± 2,0	6,8 ± 0,42
	Jovem	6,5 ± 0,9	6,6 ± 0,9	6,8 ± 0,6	7,2 ± 1,8	6,9 ± 0,36
Baço	Adulto	22,6 ± 4,7	19,5 ± 7,4	23,0 ± 2,0	19 ± 2,0	12,9 ± 3,0
	Jovem	14,6 ± 4,6	14,8 ± 4,1	12,3 ± 4,8	26,4 ± 10,5	26,4 ± 10,5
Sangue	Adulto	38,0 ± 13,4	21,0 ± 15,0	44,5 ± 4,6	33,7 ± 5,5	45,2 ± 7,9
	Jovem	15,7 ± 9,4	7,6 ± 2,9	8,6 ± 5,0	8,2 ± 3,5	15,0 ± 5,3

^an=5 animais/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.
PF=grupo *pair-feeding*

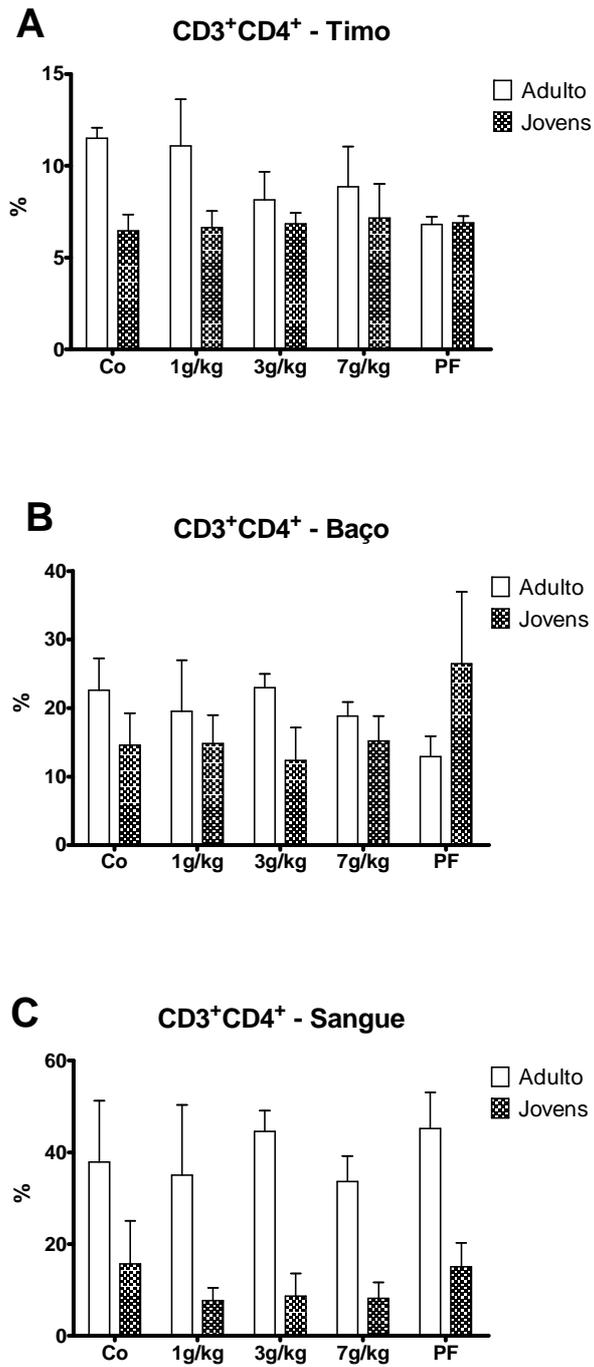


Figura 11 – Porcentagem de linfócitos T *helper* (CD3⁺CD4⁺) de ratos jovens e adultos tratados com diferentes doses de RAF durante 14 dias. **A.** Timo. **B.** Baço. **C.** Sangue. Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão. PF=grupo *pair-feeding*

A tabela 11 mostra e a figura 12 ilustra os dados da fenotipagem de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) do timo, sangue e baço dos ratos adultos e jovens tratados com diferentes doses de RAF de *I. carnea* e o grupo PF. O teste matemático empregado (Kruskal Wallis) revelou haver diferenças significantes desta população celular no timo, sangue e baço de ratos jovens ($p < 0,05$). O Teste de Dunn revelou que ratos jovens tratados com a dose de 7,0g/kg de RAF e os animais do grupo PF apresentam aumento desta população celular no timo, porém o inverso foi observado no baço e sangue, onde o mesmo teste estatístico evidenciou diminuição destas células nos grupos de animais tratados com as maiores doses do RAF de *I. carnea*. Não foram observadas diferenças significantes na porcentagem destas células nos animais adultos ($p > 0,05$).

Tabela 9 – Porcentagem de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) do timo, sangue e baço de ratos adultos e jovens tratados com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias

		Linfócito T CD3 ⁺ CD8 ⁺				
		(%)				
		Grupos				
		Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^a
Timo	Adulto	3,3 ± 1,3	2,8 ± 1,2	2,9 ± 2,4	2,6 ± 1,0	2,5 ± 0,16
	Jovem	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,4	2,4 ± 3,0**	1,4 ± 0,13 **
Baço	Adulto	8,6 ± 2,7	4,2 ± 3,1	10,9 ± 0,6	10,9 ± 1,0	10,1 ± 1,4
	Jovem	12,5 ± 1,8	12,1 ± 1,6	12,7 ± 2,8	1,4 ± 0,6**	19,2 ± 7,7
Sangue	Adulto	9,1 ± 2,8	4,3 ± 3,0	10,1 ± 0,2	7,0 ± 0,7	10,7 ± 1,8
	Jovem	3,8 ± 2,3	1,9 ± 0,8*	2,0 ± 1,0*	2,0 ± 0,8*	2,24 ± 1,9

^an= 5 animais/grupo. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. ** $p < 0,01$ versus grupo controle; Teste de Dunn.

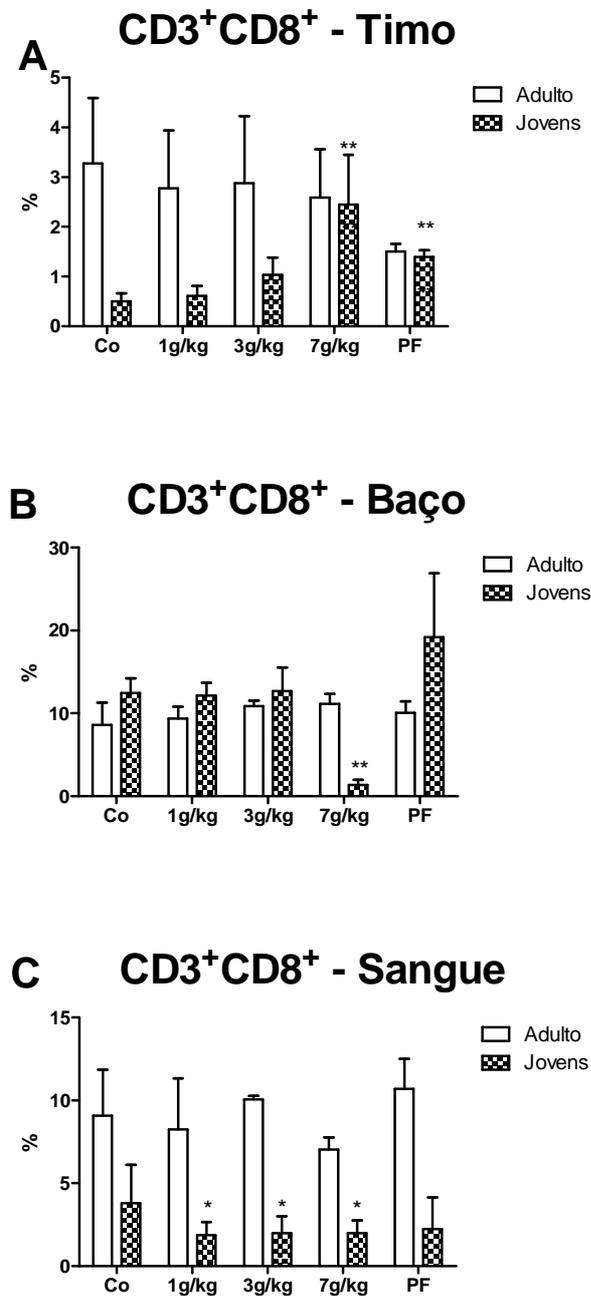


Figura 12 – Porcentagem de células CD3⁺CD8⁺ de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. **A.** Timo. **B.** Baço. **C.** Sangue. Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão. PF=grupo *pair-feeding*. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; Teste de Dunn

A tabela 10 mostra e a figura 13 ilustra os dados da fenotipagem de linfócitos B (CD45R⁺ IgM⁺) no baço e sangue dos ratos adultos e jovens tratados com diferentes doses de RAF de *I. carnea* e o grupo PF O teste matemático empregado (Kruskal Wallis) revelou haver diferenças significantes desta população celular no baço e sangue de ratos jovens ($p < 0,05$). O teste de Dunn evidenciou que ratos jovens tratados com 3,0 e 7,0g/kg de RAF e o grupo PF apresentaram menor porcentagem destas células no baço. Da mesma forma, o mesmo teste evidenciou diminuição de linfócitos B no sangue dos ratos jovens tratados com a maior dose de RAF e também no grupo *pair-feeding*. Não foram observadas diferenças significantes na fenotipagem dos animais adultos ($p > 0,05$).

Tabela 10 – Porcentagem de linfócitos B (CD45R⁺ IgM⁺) do sangue e baço de ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de RAF durante 14 dias

		Linfócitos B (%)				
		Grupos				
		Controle ^a	1,0g/kg ^a	3,0g/kg ^a	7,0g/kg ^a	PF ^a
Baço	Adulto	43,6 ± 7,9	38,3 ± 5,7	38,3 ± 5,2	41,03 ± 2,8	40,6 ± 1,9
	Jovem	28,6 ± 3,8	25,0 ± 3,9	17,4 ± 3,3**	14,2 ± 4,6***	7,0 ± 0,97
Sangue	Adulto	27,0 ± 5,2	25,8 ± 4,5	21,0 ± 3,9	31,6 ± 11,0	11,8 ± 1,3
	Jovem	25,9 ± 9,5	21,6 ± 7,0	16,8 ± 9,2	4,4 ± 1,3***	9,0 ± 2,2***

^an=5 ratos/grupo. PF=grupo *pair-feeding*. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. **p<0,01; ***p<0,001 versus grupo controle, Teste de Dunn

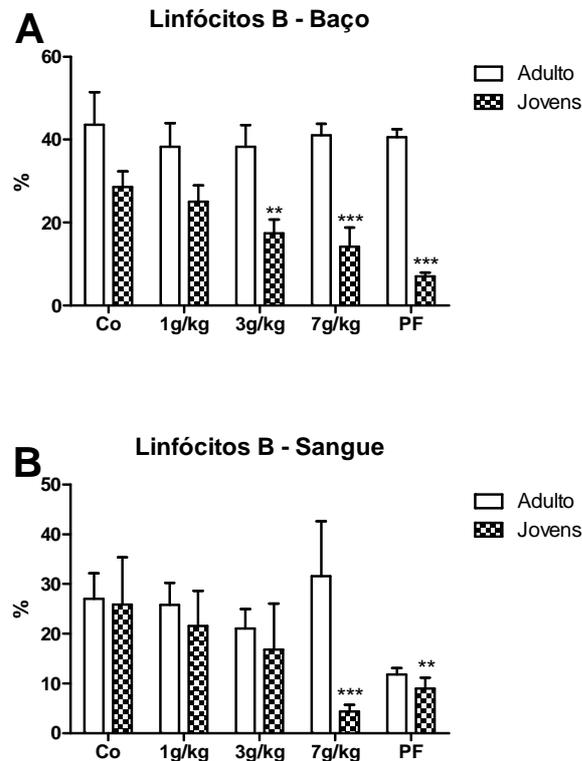


Figura 13 – Porcentagem de linfócitos B ($CD45^+ IgM^+$) de ratos jovens e adultos tratados ou não com diferentes doses de RAF durante 14 dias. **A.** Dados relativos ao baço. **B.** Dados relativos ao sangue periférico. Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão. PF=grupo *pair-feeding*. ** $p < 0,01$; $p < 0,001$ versus grupo controle; Teste de Dunn.

A figura 14 ilustra a subdivisão da população de linfócitos B ($CD45R^+ IgM^{high}$ e $CD45R^+ IgM^{low}$) presentes no baço de ratos jovens e adultos tratados com diferentes doses de RAF de *I. carnea* e o grupo PF. O teste matemático empregado (Kruskal Wallis) revelou haver diferenças significantes destas populações celulares entre os grupos de ratos jovens ($p < 0,05$). O teste de Dunn evidenciou diminuição da porcentagem de linfócitos com alta expressão de IgM ($CD45R^+ IgM^{high}$) nos animais tratados com 3,0 e 7,0g/kg de RAF e também no grupo PF e de linfócitos com baixa expressão de IgM ($CD45R^+ IgM^{low}$) nos animais tratados com 3,0g/kg de RAF e no grupo PF. Por outro lado, o mesmo teste revelou não haver diferenças significantes entre os grupos de ratos adultos.

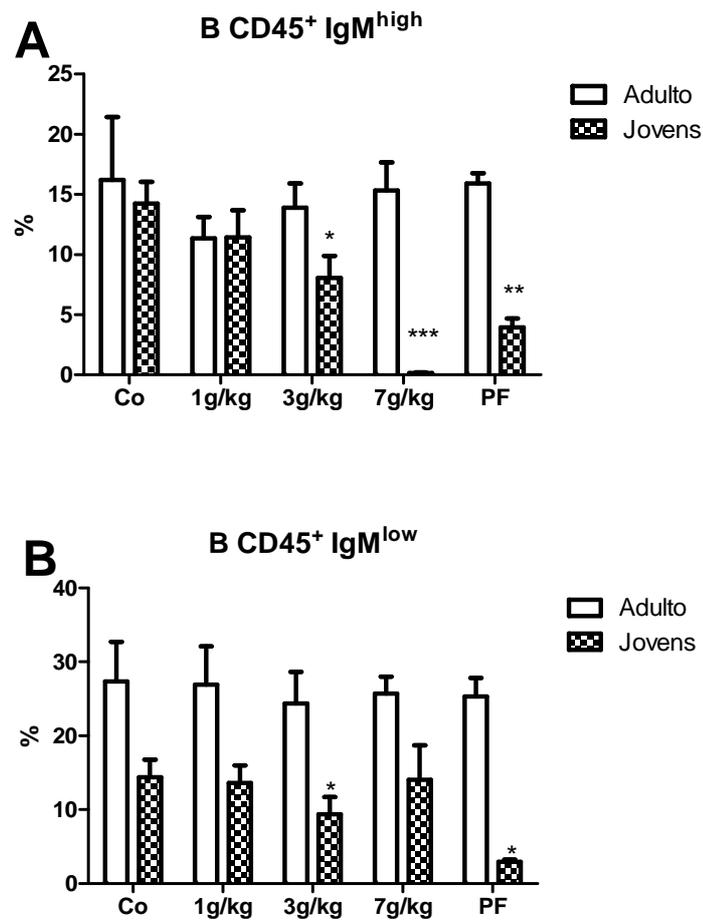


Figura 14 – Porcentagem de linfócitos B (CD45^{R+} IgM⁺) esplênicos com altas **(A)** e baixas **(B)** concentrações de IgM de ratos adultos e jovens tratados ou não com 1,0; 3,0 e 7,0g/kg de RAF durante 14 dias e o grupo *peer feeding* (PF). Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; *versus* grupo controle; Teste de Dunn

4.3 Experimento 3 – Estudo toxicocinético do princípio ativo suainsonina: determinação da concentração sérica de suainsonina em ratos jovens e adultos

Foram utilizados 60 ratos sendo 30 jovens e 30 adultos separados em 10 grupos iguais (N= 3 animais por período): T0 (0min), T1 (30min), T2 (3h), T3 (6h), T4 (9h), T5 (12h) T6 (15h), T7 (18h), T8 (21h) e T9 (24h) todos os animais receberam 7,0g/Kg de RAF e após a administração os animais foram eutanasiados periodicamente para a determinação de suainsonina no soro conforme o item 3.5.11

4.3.1 Resultados

A tabela 11 mostra e a figura 15 ilustra os dados do perfil toxicocinético da suainsonina. O teste estatístico empregado (ANOVA de duas vias) revelou que a idade interfere de forma significativa no tempo de eliminação do alcalóide, as concentrações de suainsonina nos animais jovens são menores quando comparado com os adultos o que indica uma maior taxa de eliminação da suainsonina no primeiro grupo.

Tabela 11 – Concentração de suainsonina (ng/mg de peso seco) no soro de animais jovens e adultos tratados com uma dose única de 7,0 g/kg de RAF de *I. carnea*, por gavagem e avaliados durante 24 horas

Concentração de Suainsonina (ng/mg de peso seco)		
Tempo	Grupos	
	Adultos ^a	Jovens ^a
30min	390,7	59,52
3h	671,4	400,5
6h	101,2	266,0

^an=3 animais/grupo Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.
*p<0,05; Teste de Bonferroni.

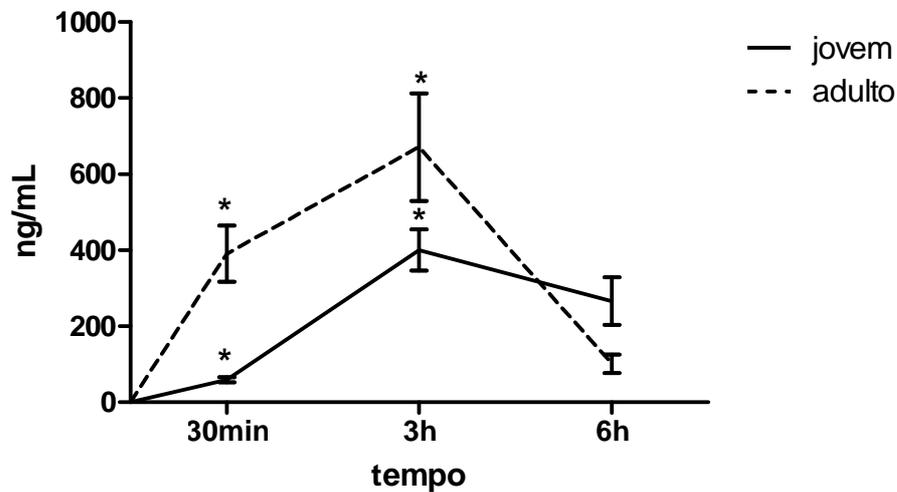


Figura 15 – Concentração sérica de suainsonina em relação ao tempo de sua administração em ratos jovens e adultos que receberam 7,0g/Kg de RAF. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão. *p<0,05; Teste de Bonferroni.

4.4 Experimento 4: Avaliação do hemograma; peso relativo de órgãos linfóides; celularidade de medula óssea e baço de animais jovens tratados com suainsonina

Foram utilizados 20 ratos machos jovens separados em dois grupos iguais: um controle (Co) e um experimental que receberam, por gavagem, durante 14 dias a dose de 5mg/kg de suainsonina, os animais do grupo controle receberam água pela mesma via e período, conforme descrito no item 3.5.3. Durante todo o período experimental fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses e também se avaliou o consumo de ração. No último dia de experimentação (15^o dia), todos os animais foram pesados e foram então submetidos à eutanásia por meio da decaptação, para coleta de sangue total para realização do hemograma e para coleta dos diferentes órgãos linfóides para a realização do peso relativo e celularidade dos mesmos e ainda coleta de células da medula óssea para determinação de sua celularidade, conforme detalhadamente descrito nos itens 3.5.5; 3.5.7 e 3.5.8.

4.4.1 Resultados

A tabela 12 mostra e a figura 16 ilustra os dados relativos ao ganho de peso dos ratos jovens tratados ou não com suainsonina durante 14 dias. O teste estatístico empregado *t-Student* revelou haver diminuição significativa deste parâmetro no grupo tratado com suainsonina em relação ao grupo controle

Tabela 12 – Avaliação do ganho de peso (em gramas) dos animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina por 14 dias

Ganho de Peso (g)	
Controle ^a	5mg/kg ^a
52,0 ± 7,4	33,0 ± 12,4 ^{***}

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.
^{***} p<0,001 *versus* grupo controle; Teste t-Student

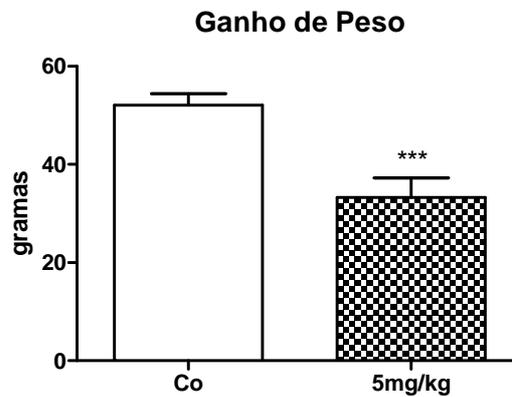


Figura 16 – Ganho de peso total de ratos jovens tratados com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio
^{***} p<0, 001 *versus* grupo controle; Teste t-Student

A tabela 13 mostra e a figura 17 ilustra os dados referentes ao consumo de ração dos ratos jovens tratados ou não com suainsonina durante 14 dias. O teste estatístico empregado t-Student revelou não haver diferenças significantes entre o grupo tratado com suainsonina em relação ao grupo controle (p>0,05).

Tabela 13 – Consumo médio diário total de ração (em gramas) dos animais jovens tratados com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

Consumo médio diário total de ração	
(g)	
Controle ^a	5mg/kg ^a
36,0 ± 4,0	33,0 ± 4,5

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão

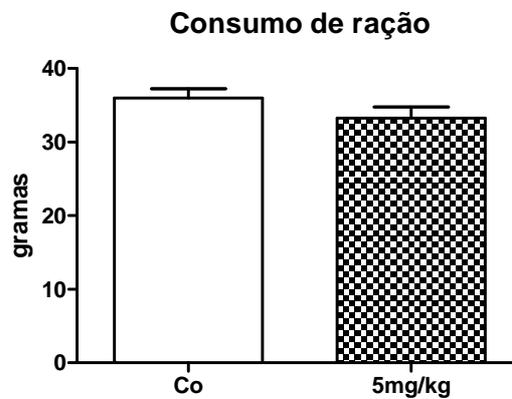


Figura 17 – Consumo de ração de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

Em relação ao peso relativo de timo o teste *t-Student* revelou não haver alterações significantes deste parâmetro entre o grupo de ratos jovens tratados com suainsonina em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) como mostra a tabela 14 e a figura 18.

Tabela 14 – Peso relativo do timo (g/100g de P.V.) de animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

Peso relativo do timo (g/100g de P.V.)	
Controle ^a	5mg/kg ^a
0,35 ± 0,03	0,30 ± 0,04

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

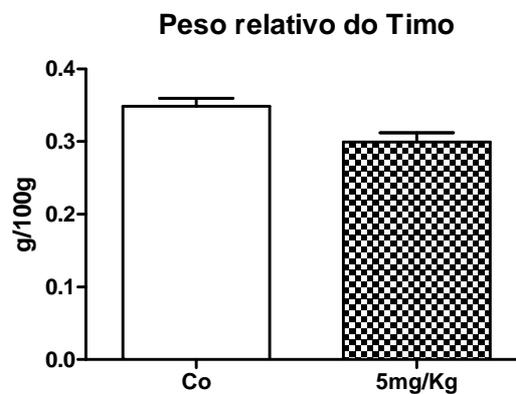


Figura 18 – Peso relativo de timo dos animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão

A tabela 15 mostra e a figura 19 ilustra os dados referentes ao peso relativo do baço de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina. Mais uma vez, o teste estatístico empregado *t-Student* revelou não haver diferenças significantes deste parâmetro entre o grupo de animais tratado com suainsonina em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 15 – Peso relativo do baço (g/100g de P.V.) de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

Peso relativo do baço (g/100g de P.V)	
Controle ^a	5mg/kg ^a
0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,06

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

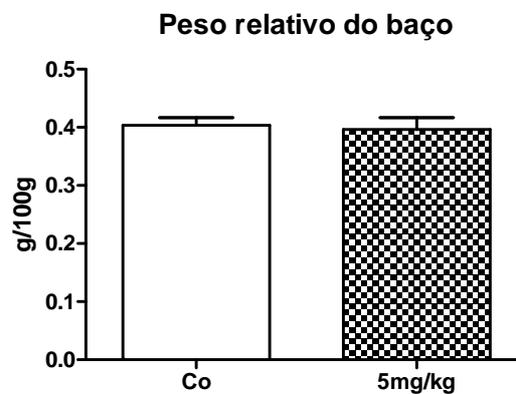


Figura 19 – Peso relativo do baço dos animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão

A tabela 16 mostra e a figura 20 ilustra os dados de celularidade total do baço de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina. O teste matemático empregado *t-Student* revelou não haver diferenças significantes deste parâmetro entre o grupo de animais tratados com suainsonina em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 16 – Celularidade do baço de animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

Celularidade de baço (Células x 10 ⁷)	
Controle ^a	5mg/kg ^a
5,2 ± 2,6	6,1 ± 1,9

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

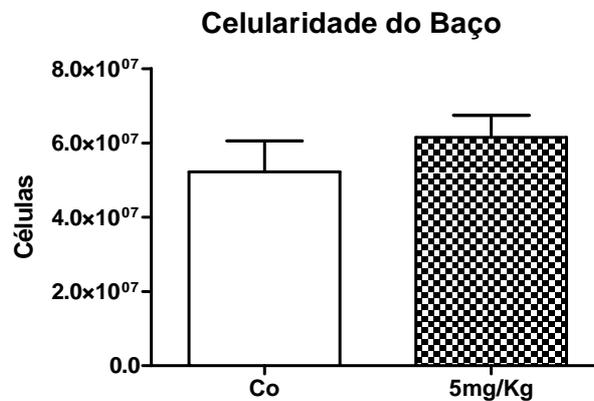


Figura 20 – Celularidade do baço dos animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

A tabela 17 mostra e a figura 21 ilustra os dados de celularidade de medula óssea dos ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Mais uma vez o teste estatístico empregado *t-Student* revelou não haver diferenças significantes deste parâmetro entre grupo de animais tratados com suainsonina em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 17 – Celularidade de medula óssea de animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

Celularidade de medula óssea (Células x10 ⁷)	
Controle ^a	5mg/kg ^a
1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,4

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

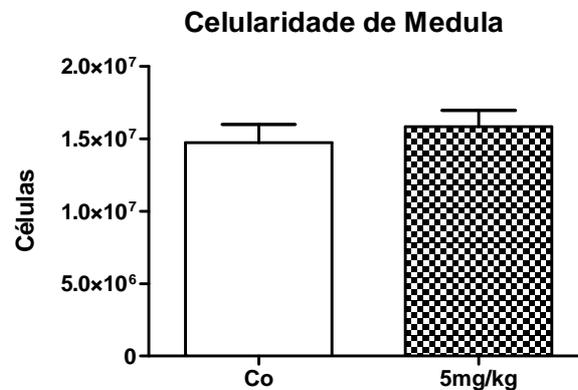


Figura 21 – Celularidade de medula óssea dos animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão

O teste matemático empregado *t-Student* para a avaliação do hemograma completo dos ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina revelou haver diminuição estatisticamente significativa entre os grupos de animais em relação ao número de leucócitos e sobre o volume corpuscular médio (VCM), como mostra a tabela 18.

Tabela 18 – Avaliação do hemograma completo dos animais jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias.

	Controle ^a	5mg/kg ^a
Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	2,7 ± 0,5	1,8 ± 0,3 ***
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	6,0 ± 1,0	6,8 ± 1,2
Plaquetas (x10 ⁶ /mm ³)	681,5 ± 100,1	417,6 ± 83,9
HGB (g/dL)	17,0 ± 2,7	15,5 ± 3,0
HCT (%)	41,2 ± 7,3	45,0 ± 8,3
VCM (μ ³)	67,7 ± 0,8	66,0 ± 1,0***
HCM (μμg)	27,8 ± 0,9	25,6 ± 0,85
CHCM(%)	41,0 ± 1,3	38,8 ± 0,8

^an=10 ratos/grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. ***p<0, 001 versus grupo controle. teste t-Student..

4.5 Experimento 5 – Fenotipagem linfocítica: Avaliação das subpopulações de linfócitos B e T presentes no sangue, baço e timo de ratos jovens tratados com suainsonina

Foram utilizados 10 ratos machos, sendo divididos em dois grupos iguais: um controle (Co) e um experimental que receberam, por gavagem, durante 14 dias a dose de 5mg/kg de suainsonina enquanto que os animais do grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período, conforme descrito no item 3.5.3. Durante todo o período experimental, fez-se a avaliação do ganho de peso para o ajuste das doses. No último dia de experimentação (15^o dia), todos os animais foram pesados e foram então submetidos à eutanásia por meio da decaptação para realização da fenotipagem linfocítica, conforme detalhadamente descrito no item 3.5.9.

4.5.1 Resultados

A tabela 19 mostra e a figura 22 ilustra a fenotipagem de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ no timo, baço e sangue dos ratos jovens tratados ou não com suainsonina. O teste estatístico empregado (Mann Whitney) revelou não haver diferenças significantes entre os animais tratados com suainsonina em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 19 – Porcentagem de linfócitos T *helper* (CD3⁺CD4⁺) do timo, sangue e baço de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina, durante 14 dias

	CD3 ⁺ CD4 ⁺	
	(%)	
	Controle ^a	5mg/kg ^a
Timo	6,7 ± 0,5	7,9 ± 1,5
Baço	14,0 ± 2,6	16,1 ± 0,6
Sangue	56,6 ± 4,6	59,8 ± 2,3

^an= 5 ratos por grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão.

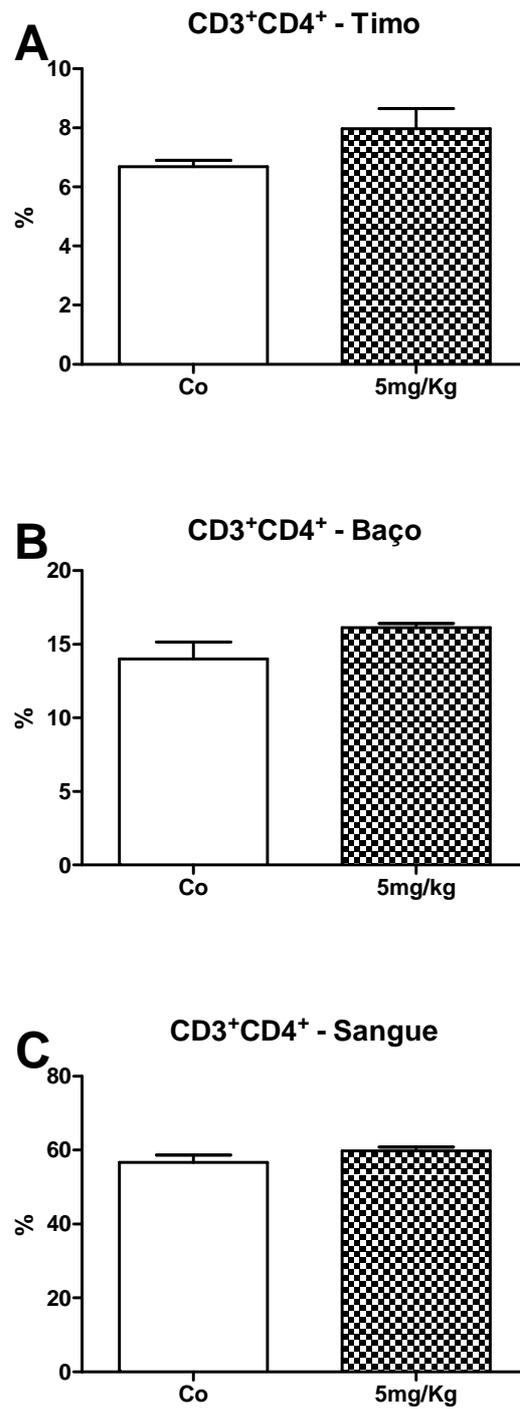


Figura 22 – Porcentagem de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. **A.** Timo. **B.** Baço. **C.** Sangue. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão

A tabela 20 mostra e a figura 23 ilustra a fenotipagem de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ no timo, baço e sangue dos ratos jovens tratados ou não com suainsonina. O teste estatístico empregado (Mann Whitney) revelou não haver diferenças significantes entre os animais tratados com suainsonina em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 20 – Porcentagem de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) do timo, sangue e baço de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

	CD3 ⁺ CD8 ⁺	
	(%)	
	Controle ^a	5mg/kg ^a
Timo	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Baço	7,6 ± 1,2	8,5 ± 1,1
Sangue	11,6 ± 1,2	12,2 ± 0,9

^an= 5 ratos por grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão.

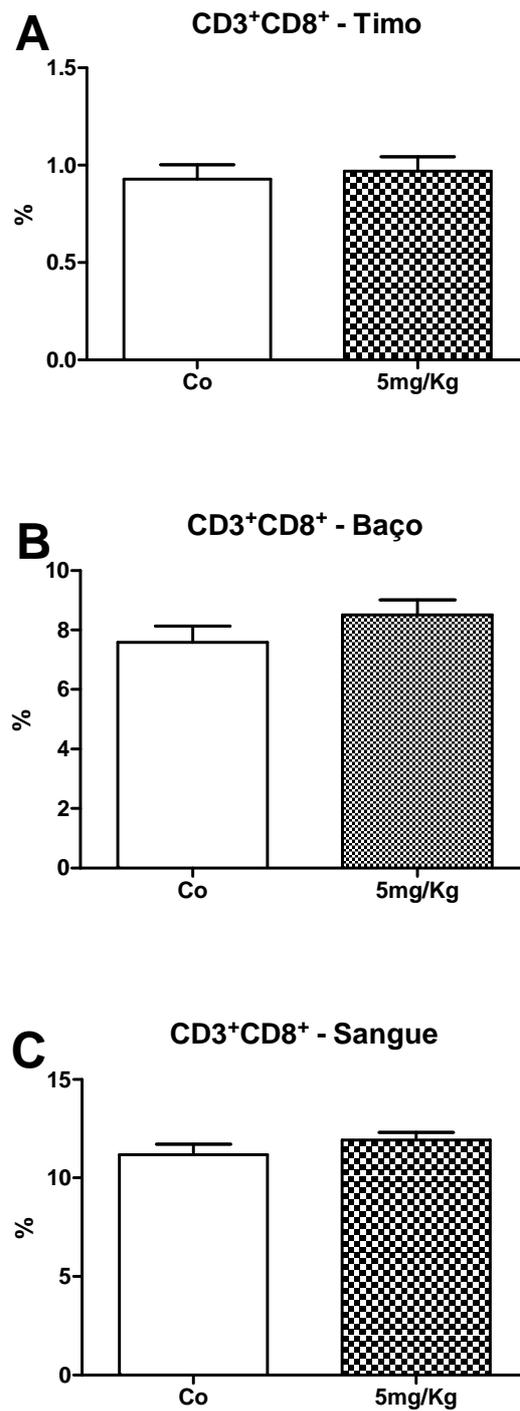


Figura 23 – Porcentagem de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. **A.** Timo. **B.** Baço. **C.** Sangue. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão.

A tabela 21 mostra e a figura 24 ilustra a fenotipagem de linfócitos B (CD45R⁺ IgM⁺) no baço e sangue dos ratos jovens tratados ou não com suainsonina. O teste estatístico empregado (Mann Whitney) revelou haver diminuição significativa desta população celular no baço dos ratos jovens tratados com suainsonina quando comparados com o grupo controle.

Tabela 21 – Porcentagem de linfócitos B (CD45R⁺ IgM⁺) no sangue e baço de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias

	Linfócitos B	
	(%)	
	Controle ^a	5mg/kg ^a
Baço	34,8 ± 0,7	26,8 ± 2,6**
Sangue	19,8 ± 5,7	14,9 ± 1,8

^an= 5 ratos por grupo. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão
 **p<0,01 *versus* grupo controle; teste Mann Whitney.

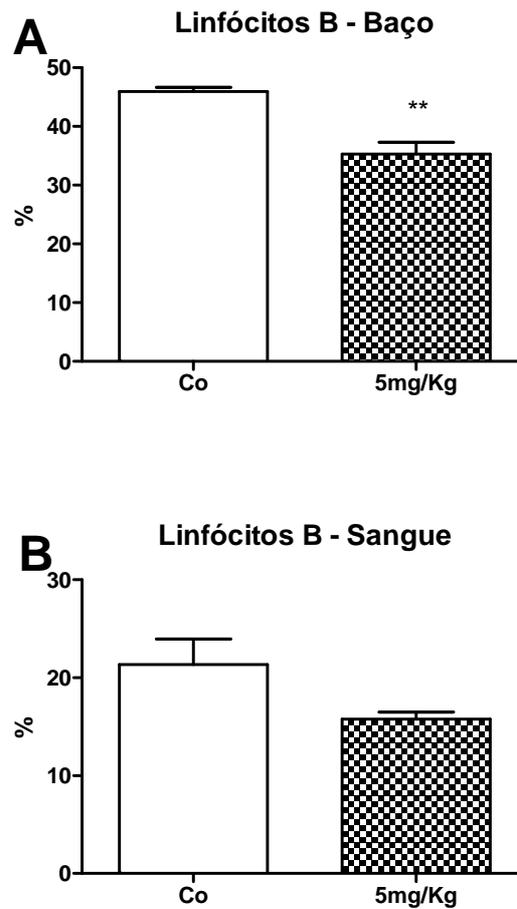


Figura 24 – Porcentagem de linfócitos B ($CD45R^+ IgM^+$) de ratos jovens tratados ou não com 5mg/Kg de suainsonina durante 14 dias. **A.** Baço, **B.** Sangue. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão. ** $p < 0,01$; teste Mann Whitney

As figuras 25 e 26 ilustram a subdivisão da população de linfócitos B ($CD45R^+ IgM^{high}$ e $CD45R^+ IgM^{low}$) presentes no baço de ratos jovens tratados com 5mg/kg de suainsonina. O teste matemático empregado (Mann Whitney) revelou haver diferenças significativas destas populações celulares entre os grupos de animais ($p < 0,05$), com diminuição da porcentagem de linfócitos com alta e baixa expressão de IgM.

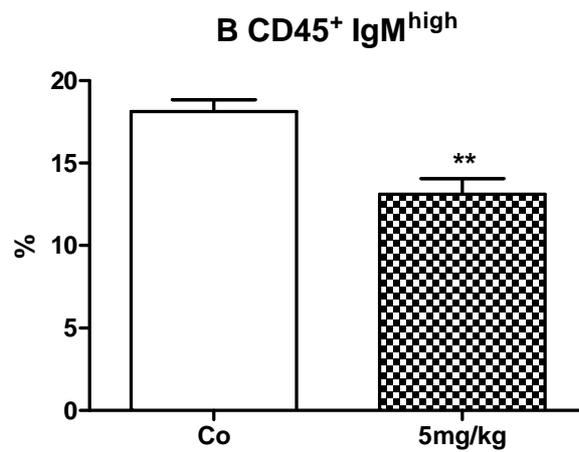


Figura 25 – Porcentagem de linfócitos B esplênicos com alta expressão de IgM em ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão ** $p < 0,01$ teste Mann Whitney

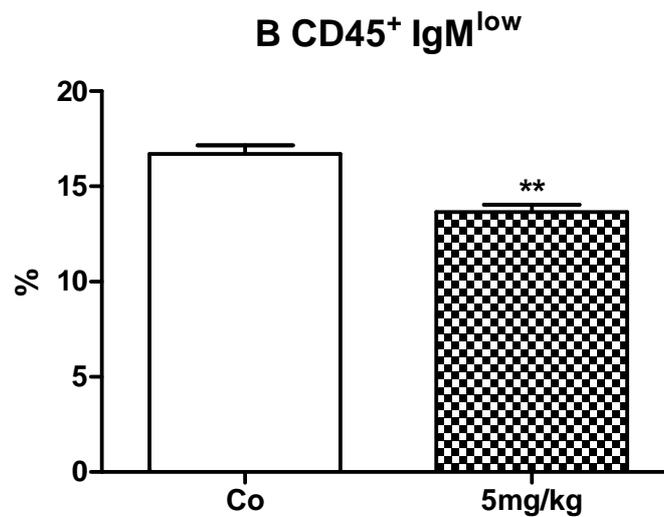


Figura 26 – Porcentagem de linfócitos B esplênicos com baixa expressão de IgM em ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio – padrão ** $p < 0,01$ teste Mann Whitney

4.6 Experimento 6 – Avaliação da atividade proliferativa de linfócitos T: avaliação da expansão clonal de linfócitos T *helper* de ratos jovens tratados com 5mg/kg de suainsonina frente ao desafio com anatoxina tetânica

Foram utilizados 20 ratos jovens divididos em dois grupos iguais: um controle (Co) e outro experimental que receberam, por gavagem, durante 14 dias, a dose de 5mg/kg de suainsonina, enquanto que os animais do grupo controle receberam água pela mesma via e período conforme descrito no item 3.5.5. Ao final do período experimental procedeu-se a avaliação da expansão clonal de linfócitos T, conforme o item 3.5.10. Para o cálculo do índice de proliferação utilizou-se a fórmula abaixo

$$\text{Índice de proliferação} = \frac{\text{Porcentagem de linfócitos estimulados}}{\text{Porcentagem de linfócitos não estimulados}}$$

4.6.1 Resultados

A tabela 22 mostra e a figura 27 ilustra os da avaliação da expansão clonal de linfócitos T helper (CD3⁺CD4⁺) de ratos jovens imunizados com anatoxina tetânica. O teste matemático empregado (Mann Whitney) revelou haver maior indução deste parâmetro entre os ratos tratados com suainsonina na dose de 5mg/kg durante 14 dias quando comparados com o grupo controle.

Tabela 22 – Índice de proliferação de linfócitos T (CD3⁺ CD4⁺) de ratos jovens tratados com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias, imunizados com anatoxina tetânica e desafiados com o mesmo antígeno *in vitro*

Índice de Proliferação		
	Controle ^a	5mg/kg ^a
Mediana	1,8	3,8***
mín –Max	1,5 – 2,1	3,1 – 4,6

^an= 10 animais/grupo. Os dados são apresentados como mediana (mínimo e máximo). *** p< 0, 001 *versus* grupo controle; teste Mann Whitney.

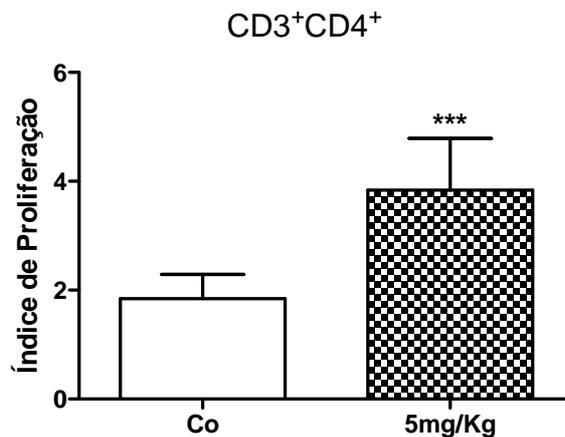


Figura 27 – Índice de proliferação de linfócitos T (CD3⁺ CD4⁺) de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias, imunizados com anatoxina tetânica e desafiados com o mesmo antígeno *in vitro*. Os dados são apresentados como média ± desvio – padrão ***p<0, 001 Mann Whitney

A tabela 23 mostra e a figura 28 ilustra os dados da expansão clonal de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) de ratos jovens imunizados com anatoxina tetânica. O teste estatístico empregado (Mann Whitney) revelou não haver diferenças significativas desta população celular entre os ratos tratados com suainsonina na dose de 5mg/kg durante 14 dias (p>0,05).

Tabela 23 – Índice de proliferação de linfócitos T (CD3⁺ CD8⁺) de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias, imunizados com anatoxina tetânica e desafiados com o mesmo antígeno *in vitro*

	Índice de Proliferação	
	Controle ^a	5mg/kg ^a
Mediana	2,3	3,3
mín –máx	1,3 – 3,3	1,0 – 5,5

^an= 10 animais/grupo. Os dados são apresentados como mediana (mínimo e máximo).

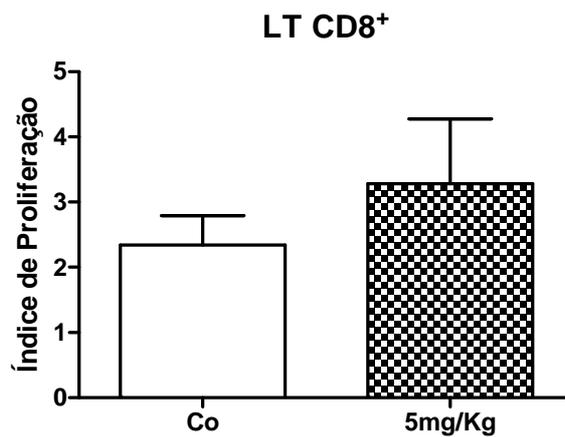


Figura 28 – Índice de proliferação de linfócitos T (CD3⁺ CD8⁺) de ratos jovens tratados ou não com 5mg/kg de suainsonina durante 14 dias, imunizados com anatoxina tetânica e desafiados com o mesmo antígeno *in vitro*. Os dados são apresentados como media ± desvio – padrão

Discussão

5 DISCUSSÃO

Todos os trabalhos realizados até o presente momento, tanto com a *I. carnea*, como com outras plantas que possuem a suainsonina como princípio ativo tóxico e também, com a suainsonina isoladamente, mostraram que um dos primeiros efeitos deletérios observados entre as diferentes espécies de animais tratadas, sejam elas de produção (STEGELMEIER et al., 1994, 1998; SCHUMAHER-HENRIQUE, 2003) ou de laboratório (HUEZA et al., 2005, SCHWARZ et al., 2003) é a ocorrência de perda de peso conseqüente da diminuição da ingesta de alimentos. De fato, vários autores relatam que plantas que possuem a suaisonina como princípio ativo causam efeito anoréxico nos animais expostos a este composto, tendo sido explanado naquele momento que tal efeito anoréxico poderia ser decorrente da inibição da suainsonina sobre algumas enzimas presentes na borda em escova do trato gastrointestinal (PAN; GHIDONI; ELBEIN, 1993; ASANO, 2000); no entanto, se tal fato ocorresse deveria ser observado nos animais aqui tratados, a presença de fezes diarréicas ou pastosas, o que não foi observado em nenhum momento.

Ainda em relação à perda de peso dos animais, outros autores (PRITCHARD et al., 1990) sugerem que tal efeito anorexígeno seja decorrente das alterações vacuolares em tecido do sistema nervoso central, o que poderia vir a ocasionar desequilíbrio de neurotransmissores envolvidos nos centros de saciedade; porém, no presente trabalho, em nenhum grupo de animais, sejam eles jovens ou adultos, tratados com o extrato da planta ou com a suiansonina isoladamente, apresentaram qualquer alteração histológica ao nível cerebral. Para melhor elucidar este efeito anorexígeno, o ideal seria realizar estudos com o objetivo de avaliar o efeito deste alcalóide sobre as diferentes enzimas digestivas *in vitro*, conforme protocolos sugeridos por (AO et al., 2008) ainda, estudar o perfil de neurotransmissores: a serotonina, a dopamina e outros neuropeptídeos (FELICIO et al., 1996) e finalmente, realizar um estudo que visasse quantificar os níveis de cortisol no sangue destes animais, pois sabe-se que este hormônio, quando liberado em excesso, promove nos indivíduos perda de peso acentuada (KNOTT et al.,2010).

Quando se propõe de realizar um estudo de imunotoxicologia, deve-se tomar alguns cuidados para o delineamento experimental a ser realizado, entre estes cuidados cita-se as doses, as quais não devem ser excessivamente tóxicas, uma vez que o estresse da intoxicação e a liberação de cortisol na corrente sanguínea viria a interferir nos parâmetros imunológicos estudados (MENDELSON; STEFAN., 1966) e ainda, a diminuição na ingestão de alimentos, o que sabidamente pode interferir em diferentes parâmetros imunes, como por exemplo a diminuição no aporte de aminoácidos que sabidamente interfere na síntese protéica de células imunes (citocinas, imunoglobulinas entre outros compostos), depleção de microelementos, como por exemplo o zinco (BEACH; GERSHWIN; HURLEY; 1982; TUORMAA, 1995) e vitaminas (BÁEZ-SALDAÑA; ORTEGA, 2004) que podem promover a involução precoce e atrofia do timo.

Assim, quanto à dose a ser empregada, decidiu-se por manter aquelas já de uso em nosso laboratório, ou seja, uma sem efeito tóxico (1,0 g/kg), uma com efeito tóxico moderado (3,0 g/kg) e uma dose sabidamente tóxica aos ratos (7,0 g/kg). Ainda, sabendo-se que a intoxicação por *I. carnea* ou de SU promove efeito anorexígeno, decidiu-se por acrescentar neste estudo um grupo de animais denominado de *pair-feeding* (PF), o qual recebeu apenas a mesma quantidade de ração que aqueles animais pertencentes ao grupo tratado com a maior dose do RAF, possibilitando desta forma, evidenciar se os possíveis efeitos imunotóxicos da planta aqui estudada são decorrentes do efeito da SU ou se são decorrentes de um possível efeito da desnutrição.

Neste estudo, o qual teve como objetivo comparar os efeitos imunotóxicos da *I. carnea* entre ratos adultos e jovens, uma das observações mais interessantes que se verificou foi a diferença existente entre as duas idades no que diz respeito a praticamente todos os parâmetros aqui estudados, mostrando que a fisiologia de animais em desenvolvimento e aqueles maduros difere acentuadamente; não sendo, porém, escopo deste projeto avaliar as possíveis vias metabólicas que poderiam estar sendo comprometidas nos dois grupos de animais.

Em relação ao ganho peso dos ratos, assim como era esperado, houve diminuição deste parâmetro de forma dose-dependente; porém, vale chamar a atenção

neste momento que aqueles animais jovens do grupo PF que tiveram restrição alimentar à semelhança do grupo tratado com 7,0 g/kg do RAF não apresentaram diminuição no ganho de peso, mostrando que mesmo a restrição alimentar destes animais não foi suficiente para comprometer o manutenção e crescimento deste grupo de ratos pré-púberes, ou seja, a demanda de nutrientes aos mesmos parece ter sido suprida, evidenciando, de fato, que a diminuição de ganho de peso dos animais jovens estava diretamente relacionada à intoxicação com a planta. Já em relação ao grupo de animais adultos, apesar da diminuição do ganho de peso do grupo PF ser semelhante àquela observada nos animais tratados com o RAF, não é possível descartar totalmente o efeito da SU neste parâmetro, uma vez que nos animais jovens ela é responsável pela perda de peso.

O timo é um órgão linfóide primário, no qual ocorre a maturação e o desenvolvimento de linfócitos do tipo T (T *helper* – CD3⁺CD4⁺ e T citotóxicos – CD3⁺CD8⁺). Este tecido tem sua organogênese iniciada ainda na vida fetal, quando células imaturas, os timócitos (CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁻CD4⁻CD8⁻) começam a migrar para este órgão linfóide e colonizá-lo (DIETERT et al., 2000; HOLLADAY; SMIALOWICZ, 2000). A maturação dos timócitos ocorre durante toda a vida do indivíduo; porém, com maior expressão na vida pré-púbere; sendo então este órgão, após a maturidade sexual, induzido a uma involução fisiológica de seu peso relativo e atrofia (GOOD et al., 1962).

No presente estudo foi observado que em animais pré-púberes, nem a *I. carnea* e tão pouco a diminuição na ingestão de alimentos foi capaz de promover qualquer alteração no peso relativo do timo; no entanto, em ratos adultos, tanto aqueles tratados com a planta como os submetidos à restrição alimentar apresentaram diminuição no peso relativo deste órgão. Uma possível explicação para a discrepância observada entre animais adultos e jovens, talvez esteja no fato de animais adultos já possuírem a substituição do tecido linfóide por tecido adiposo, sabidamente aquele que se deposita neste órgão em involução (GOOD et al., 1962), sendo assim, a diminuição de seu peso relativo estaria relacionada à perda de peso e conseqüentemente de tecido gorduroso.

Ainda em relação às avaliações relativas aos órgãos linfóides, foi observado, tanto em animais jovens (sem significância estatística) quanto em animais adultos,

aumento do peso relativo do baço. Porém, quando foi realizada a contagem global de células brancas, ou seja, de esplenócitos, não foi detectado nenhum aumento de celularidade que viesse a corroborar com os dados relativos ao peso do baço. No entanto, é importante salientar que, na histopatologia deste órgão linfóide foi observada a ocorrência de congestão, a qual muito provavelmente esteja relacionada à congestão hepática também presente nos animais tratados com a maior dose de *I. carnea*.

Vários são os estudos realizados com a SU, os quais relacionam os efeitos deste alcalóide sobre a manosidase II do Complexo de Golgi com o efeito mieloprotetor e mieloproliferativo em camundongos tratados com este alcalóide (OREDIPE et al., 2003a,b); no entanto, em trabalho recentemente realizado em nosso laboratório (LATORRE et al, 2009) foi verificado que a administração de SU a camundongos isogênicos e *outbreed* não promovia qualquer efeito mieloproliferativo ou mieloprotetor nestes animais, assim, é possível sugerir que a diminuição na celularidade da medula óssea seja de fato decorrente da menor ingestão de alimentos, uma vez que, animais adultos do grupo PF também apresentaram perfil celular semelhante àqueles tratados com a maior dose do RAF, fato este que não foi observado nos animais jovens, nos quais a diminuição na ingestão de nutrientes não comprometeu de forma significativa o ganho de peso e desenvolvimento dos mesmos.

Quando foi realizado o hemograma destes animais, esperava-se uma diminuição tanto na série vermelha quanto na série branca do hemograma, uma vez que, nos animais adultos foi observada a diminuição de células da medula óssea; no entanto, além de não ter sido observado diminuição do número de hemácias, foi ainda verificado um aumento no número de leucócitos circulantes naqueles animais adultos tratados com a 7,0 g/kg do RAF; até o presente momento e com os dados aqui obtidos, não é possível lançar alguma hipótese que venha a explicar tal fenômeno, uma vez que há discrepâncias entre os dados mielóides de adultos e jovens e também diferenças nos resultados do hemograma obtido nas diferentes idades.

No entanto, ainda em relação ao hemograma, chama a atenção, os resultados obtidos dos diferentes grupos de ratos quando se tratou do VCM. O VCM é um parâmetro que pode ser definido como sendo o índice que auxilia na observação do tamanho das hemácias e no diagnóstico de anemias: anemia microcítica ($hg < 80fL$);

macrocítica ($hg > 96fL$) e normocíticas ($80fL < hg < 96fL$) (dados em humanos) (RYAN, 2001). Porém, devido ao fato de ter sido observado apenas alterações no VCM e nenhuma outra alteração hematimétrica que fechassem o diagnóstico para um tipo determinado de anemia, como por exemplo, diminuição no número de hemácias; alterações no hematócrito ou ainda na hemoglobina torna-se difícil neste momento, explanar qualquer hipótese que explique a ocorrência de determinada alteração.

Nos estudos realizados por Hueza (2006), o delineamento empregado foi semelhante aquele aqui utilizado, ou seja, administração das mesmas doses de RAF tanto em animais jovens quanto adultos; e naquele estudo, várias foram as alterações imunes observadas, algumas semelhantes às encontradas neste trabalho e também algumas alterações funcionais do sistema imunológico, como maior produção de anticorpos entre outros parâmetros. No entanto neste estudo realizado por Hueza, não foi idealizada a realização da fenotipagem de células linfóides, já que em seu trabalho também foram verificadas alterações nos pesos relativos de órgãos linfóides e de suas celularidades. Assim, decidiu-se para este estudo, realizar a caracterização das populações celulares que poderiam estar comprometidas com a administração da planta.

Para a realização desta experimentação, fez-se a marcação das seguintes populações de linfócitos, linfócitos T maduros: $CD3^+CD4^+CD8^-$; $CD3^+CD4^-CD8^+$; linfócitos T imaturos: $CD3^+CD4^+CD8^+$; $CD3^+CD4^-CD8^-$; linfócitos B: $CD45R^+IgM^+$, e ainda, linfócitos B com alta e baixa expressão de IgM: IgM^{high} e IgM^{low} , respectivamente.

Quando se avaliou as populações de linfócitos T presentes no timo, foi possível verificar que a única população de células que se encontravam aumentadas em relação aos animais do grupo controle, foram os timócitos imaturos $CD3^+CD4^+CD8^+$, tanto de animais jovens tratados com a maior dose do RAF como seu respectivo grupo PF, evidenciando que tal efeito seja decorrente da diminuição do aporte nutricional; de fato, ao realizar um teste estatístico (*t-Student*) comparando apenas estes dois grupos de animais, este teste matemático não foi capaz de detectar qualquer diferença estatística.

Numa tentativa de explicar o porquê deste fenômeno, vários aspectos relacionados às características dos grupos de animais estudados foram levantados, como: diminuição no consumo de alimentos; estresse da intoxicação e o estresse da

diminuição da ingesta de alimentos (grupo PF), idade dos animais e conseqüentemente presença e ausência de hormônios sexuais e pode-se cogitar do possível efeito do hormônio leptina.

A leptina foi descoberta em 1994 (ZHANG et al., 1994) e foi caracterizada como sendo um hormônio adipostático, o qual possui grande influência na massa total de gorduras no indivíduo, ou seja, sua concentração no sangue reflete o *status* nutricional do organismo, por exemplo, indivíduos bem alimentados possuem altas concentrações de leptina circulante, enquanto aqueles sob desnutrição possuem baixos níveis deste hormônio. Para melhor explicar o efeito deste peptídeo sobre o metabolismo foram desenvolvidos 3 modelos animais: um modelo *knockout* para o gene *ob* (gene da leptina), denominado de camundongo *ob/ob* deficiente na síntese de leptina, outro modelo, o qual era *knockout* para o receptor de leptina camundongo *db/db* e finalmente o rato Zucker, também deficiente em produzir este hormônio. O que estes animais têm em comum além de serem incapazes de responderem a leptina, é o fato de serem obesos (VELLOSO; SAVINO; MANSOUR, 2009).

Estudos realizados com estes animais evidenciaram que a leptina, além de possuir efeito sobre o eixo-hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) e conseqüentemente efeito sobre o metabolismo do animal, ou seja, quando em maior concentração há ativação do centro de saciedade (diminuição da ingesta), maior gasto de energia (termogênica) e maior atividade simpática, enquanto que em baixas concentrações, ocorre inibição do centro de saciedade (maior ingesta de alimentos), menor dissipação de calor e maior atividade parassimpática (TUMBULL; RIVIER, 1999; HADDAD; SAADÉ; SAFIEH-GARABEDIAN, 2002), a leptina promove também efeitos deletérios sobre o sistema imunológico, manifestado por alterações no tecido tímico e em sua celularidade, e também efeito imunomodulador sobre diferentes populações celulares, tanto da resposta imune inata, quanto da adquirida, sendo atualmente atribuído a este hormônio a função de citocina, denominando-a de adipocina (CAVA; MATARESE, 2004).

Estudos realizados com a leptina revelaram que esta adipocina possui importante efeito sobre a celularidade do timo, da proliferação de linfócitos T mediada por IL-2, maior ou menor ativação da reposta imune celular, inibição de células T *helper*

2 (Th2) e ainda efeito anti-apoptótico de linfócitos T imaturos e também de células precursoras hematopoiéticas, (LORD et al., 1998; MATARESE et al., 2002; CAVA; MATARESE, 2004;), assim seria possível supor que as maiores porcentagens nas populações de timócitos CD8 duplo positivos observados nos ratos pré-púberes tratados com a planta e aqueles do grupo PF seja decorrente da ação deste hormônio/citocina e não um efeito direto do RAF da *I. carnea*.

Porém, como explicar o fato de animais adultos, que também apresentaram diminuição, tanto no consumo de ração quanto no ganho de peso, não possuírem o mesmo perfil fenotípico neste órgão linfóide?

Sabe-se que os efeitos neuroimunomoduladores da leptina são mais evidentes em condições como a fome, em que a produção de leptina pelo tecido adiposo é marcadamente reduzida, e também quando sob efeito de hormônios sexuais, uma vez que a testosterona reduz a secreção de leptina, logo aqueles animais adultos, por já se encontrarem em maturidade sexual, não apresentariam o mesmo perfil que os pré-púberes (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

No entanto, uma revisão na literatura para melhor entender os efeitos da leptina sobre as células do sistema imune, não foi possível alicerçar a ocorrência de menores concentrações dos linfócitos maduros TCD3⁺CD8⁺ presentes tanto na circulação periférica quanto no baço; porém, vale lembrar que esta alteração foi verificada apenas nos animais jovens tratados com a planta.

Sabe-se que as células do sistema imunológico se encontram em constante movimento no organismo, saindo de seus órgãos precursores e migrando, por meio da circulação sanguínea, para habitar os órgãos linfóides secundários, o baço, os linfonodos e tecidos linfóides associados às mucosas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). No entanto, estas células circulantes para adentrarem aos órgãos linfóides, necessitam possuir receptores de membrana específicos para um dado órgão e ainda para um local determinado dentro deste órgão. Por exemplo, a arquitetura da polpa branca do baço é constituída de zonas marginais interna e externa e uma zona perifolicular. A segregação de linfócitos T nas bainhas linfóides periarteriolares, e de células B nos folículos e zonas marginais constitui um processo altamente regulado, dependente da produção de diferentes citocinas e quimiocinas pelas células estromais

destas diferentes áreas, análoga ao caso dos linfonodos. A quimiocina CXCL13 e seu receptor CXCR5 são requeridos para migração de células B para dentro dos folículos, e CCL19 e CCL21 e seu receptor CCR7 são requeridos para migração de células T *naïves* para dentro da bainha periarteriolar. O mesmo acontecendo para as outras populações de linfócitos nos diferentes órgãos linfóides (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Assim, uma possível explicação para diminuição da população de linfócitos TCD3⁺CD8⁺, tanto na circulação periférica quanto no baço, esteja relacionada, ou a uma alteração nos receptores de membrana destas células ou da incapacidade de células estromais em produzir as quimiocinas específicas para esta população celular, diminuindo assim a sua presença na circulação e também no órgão linfóide estudado. Vale ainda ressaltar que este deve ser um efeito direto dos alcalóides presentes no RAF da *I. carnea*, os quais poderiam estar interferindo na glicosilação dos resíduos de açúcares presentes tanto nos receptores e/ou nas quimiocinas, que nada mais são do que glicoproteínas, pois sabe-se que a SU ao agir sobre a manosidase II do Complexo de Golgi, produz alterações estruturais nestas moléculas, gerando moléculas defeituosas. Ainda, pouco se sabe a respeito da ação das calisteginas sobre as enzimas β -glicosidase, α - e β -galactosidases em glicoproteínas recém-sintetizadas. Vale lembrar que a presença ou ausência de resíduos de carboidratos na proteína pode interferir na sua função por alterar a conformação tridimensional, estabilidade, solubilidade, adesão, entre outras propriedades físico-químicas (ELBEIN, 1991).

Mais uma vez fazemos a pergunta: Por que animais adultos não apresentaram o mesmo perfil de células circulantes?

Talvez a resposta esteja na própria idade do animal, o qual já é considerado como adulto e imunologicamente dito competente, no qual, tais alterações moleculares não promoveriam efeitos acentuados, uma vez que, a arquitetura de seus órgãos linfóides já se encontra estabelecida.

Quando se avaliou a fenotipagem de linfócitos do tipo B presentes na circulação sanguínea e também no baço dos animais, foi verificado que esta população de células estava diminuída em ambos os compartimentos avaliados, o que imediatamente nos levou a supor, que tal efeito fosse semelhante aquele observado com as células do tipo

T CD8, anteriormente discutidas; porém, ao obtermos os fenótipos de linfócitos B no sangue e no baço de animais do grupo PF, tal conjectura perdeu seu sentido. Como a diminuição na ingestão de alimentos poderia estar interferindo na depleção de uma população celular presente na circulação sanguínea e também na esplênica? Se tal efeito fosse observado apenas naqueles animais tratados com a planta, seria possível conjecturar que as alterações em glicoproteínas de membrana estivessem comprometendo a ligação dos anticorpos marcados para estas populações, uma vez que citocinas, imunoglobulinas, moléculas de adesão são N-glicanos ricos em açúcares, entre eles a manose (ASANO et al., 2000)

Porém, mais uma vez, na tentativa de explicar este fenômeno que envolve a população de linfócitos B lançaremos mão da teoria da leptina; pois, sabe-se que estudos realizados *in vitro* vêm mostrando que tanto células T, quanto célula B, possuem receptores *Ob-Rb* para leptinas. De fato, estudos naqueles animais geneticamente modificados e deficientes em sintetizar a leptina, a suplementação com leptina recombinante promoveu nestes animais um efeito linfopoietico de 3 vezes na população de linfócitos B e 3 vezes na população de pré-linfócitos (FERNÁNDEZ-RIEJOS et al., 2010). Ou seja, no presente estudo, em que os animais possivelmente se encontram depletados desta adipocina, vemos efeito contrário. Corroborando com esta suposição, a menor porcentagem de linfócitos B maduros (IgM^{high}) e também de linfócitos imaturos (pré-B - IgM^{low}) tanto nos animais tratados com a planta quanto aqueles do grupo sob restrição alimentar.

Durante a execução deste trabalho de pesquisa, nosso laboratório recebeu a visita do Dr. Dale Gardner do PPRL-USDA, o qual nos convidou para realizar um estudo toxicocinético da suainsonina e também observar a metodologia de isolamento e quantificação deste alcalóide e seu laboratório. Assim, delineou-se naquele momento, um estudo toxicocinético com o RAF da *I. carnea* administrado oralmente para, nos EUA, realizar a sua biodisponibilidade, tanto em animais jovens quanto em adultos, o que é de extrema importância quando se trata de um estudo que envolve organismos em desenvolvimento (ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Assim, por meio da determinação indireta das concentrações de SU no soro de ratos adultos e jovens, foi possível verificar que a meia-vida deste alcalóide é bastante

curta na circulação, sendo que sua eliminação total ocorre dentro de um período de 9 horas, ou seja, este alcalóide, tanto nos animais jovens quanto nos adultos, é rapidamente excretado do organismo.

Com tais resultados em mãos, lançamos a pergunta: O esquema de tratamento que foi empregado neste experimento foi o mais adequado?

A resposta é não; pois, o ideal seria de que os animais de laboratório, à semelhança daqueles de produção, sejam expostos com mais freqüência ao alcalóide, ou seja, a planta deveria ser administrada via alimento, ou por meio de gavagem, por pelo menos duas vezes ao dia. Tal estudo toxicocinético, veio a trazer como colaboração aos estudos de toxicidade realizados em nosso laboratório, a importância de se realizar tal cinética, quando possível, antes de se estabelecer dose e tempo de tratamento, para que não ocorra descontinuidade da biodisponibilidade do composto a ser estudado.

Ainda, durante a estada no laboratório do PPRL-USDA, foi realizada a quantificação de SU contida no RAF da *I. carnea*, o qual detectou que a concentração deste alcalóide na dose de 7,0 g/kg era equivalente a 5,0 mg/kg de SU. Ainda, foi feito o isolamento deste alcalóide a partir da *Astragalus* spp. e este alcalóide purificado foi gentilmente cedido para dar continuidade aos estudos de imunotoxicidade.

Assim, de volta ao Brasil, decidiu-se executar novamente os estudos anteriormente realizados, empregando-se a SU isolada com o objetivo de verificar se as calisteginas poderiam estar interferindo nas respostas obtidas com o RAF da *I. carnea*. No entanto, ao realizarmos os cálculos de quanto seria utilizado de SU e ainda, o total de anticorpos que seriam necessários para a marcação das diferentes populações celulares, foi verificado que apenas a dose de 5 mg/kg de SU poderia ser empregada e ainda, não seria possível adotar o grupo de animais sob restrição alimentar, e também, para que a quantidade de SU fosse suficiente, apenas animais jovens, ou seja, com menor peso, poderiam ser estudados.

Destarte, quando foi realizado o ganho de peso e o consumo de ração de ratos jovens tratados com 5,0 mg/kg de SU, não foi observada qualquer alteração no consumo de ração dos ratos, no entanto, foi verificada uma diminuição no ganho de peso destes animais. Comparando estes efeitos com aqueles obtidos de ratos jovens tratados com o RAF, pode-se levantar a hipótese que as calisteginas podem possuir

efeito tóxico sinérgico ao da SU, como proposto em trabalho realizado por Hueza et al. (2005), no qual, os alcalóides isoladamente, não promoviam qualquer diminuição no consumo de ração ou no ganho de peso de ratos tratados durante 14 dias; no entanto, o RAF da *I. carnea*, o qual possuía as mesmas concentrações dos alcalóides empregados de forma isolada, promoveu diminuição destes parâmetros citados.

Nos estudos de imunopatologia, ou seja, peso relativo de órgãos linfóides e sua celularidades, bem como o hemograma destes animais tratados com a SU, mostraram-se semelhantes àqueles obtidos dos estudos com a *I. carnea*.

Quando foi realizada a fenotipagem de linfócitos, aquela população de células TCD3⁺CD8⁺, a qual se mostrara aumentada em animais tratados com o RAF, no presente estudo com a SU, esta população celular se encontrou dentro da normalidade, o que poderia vir a reforçar a hipótese de que a leptina diminuída, decorrente da menor ingesta de alimentos, esteja de fato promovendo efeitos imunomodulatórios sobre esta população de células linfóides.

Porém, quando se avaliou as populações de células B de ratos jovens tratados com a SU, foi observado o mesmo perfil fenotípico de células que aqueles ratos tratados com a *I. carnea* e ainda os do grupo PF. Como neste experimento não houve diminuição da ingesta e conseqüentemente diminuição dos níveis de leptina circulante, é possível supor então que aquelas conjecturas acerca dos N-glicanos de superfície e menor ligação de anticorpos de marcação e ainda as alterações quanto à migração de células para os órgãos linfóides anteriormente sugeridas estejam comprometidas devido à ação direta da SU sobre o metabolismo das glicoproteínas.

Finalmente, devido ao fato de vários trabalhos realizados com a SU relatarem que este alcalóide possui efeito proliferativo sobre linfócitos T *helper* (YAGITA; SAKSELA, 1990; MYC et al., 1990; WHITE et al., 2001), idealizou-se realizar um último experimento com a SU com o objetivo de avaliar sua atividade proliferativa em animais jovens. Para ensaios proliferativos, geralmente o que se emprega são mitógenos específicos para linfócitos B (lipopolissacarídeos – LPS) e para linfócitos T (Concanavalina – Con-A ou fitohemaglutinina – PHA); no entanto, sabe-se que a SU ao inibir a enzima manosidase II do Complexo de Golgi, promove em linfócitos do tipo T, alteração nos resíduos manose de receptores proliferativos induzidos pela Con-A

(BOWLIN et al., 1991), o que na verdade não refletiria uma atividade proliferativa antigênica. Assim, para este ensaio decidiu-se por empregar como agente imunogênico a anatoxina tetânica (AT), a qual não possui similaridade estrutural com a Con-A.

Em relação aos resultados obtidos, foi observado que a SU promoveu nos animais tratados maior atividade proliferativa de linfócitos T CD4⁺, ou seja, proliferação de linfócitos T *helper*, independentes da ação de Con-A.

Vários estudos realizados com a SU relatam que este alcalóide é capaz de aumentar a expressão de receptores para IL-2 (IL-2R) (BOWLIN; SUNKARA, 1988; BOWLIN et al., 1991; MYC et al., 1990), assim é possível supor que o tratamento com a SU nos animais promoveu nos mesmos aumento no número IL-2R em linfócitos T CD4⁺, e posteriormente quando foi realizado o desafio *in vitro* com o mesmo antígeno (AT), o reconhecimento antigênico e conseqüentemente ativação desta população celular com produção da citocina IL-2, fez com que o efeito autócrino desta citocina sobre seus IL-2R fossem mais acentuados do que naqueles animais não expostos à este alcalóide e conseqüentemente não apresentassem a mesma taxa proliferativa que aqueles animais tratados com a SU, evidenciando de fato, o potencial imunomodulador que este alcalóide possui, o que o potencializa como molécula farmacológica para indivíduos imunodeprimidos como aqueles portadores de doenças como o HIV em seres humanos e também na FIV e FELV felina, e ainda, em pacientes tanto humanos como animais portadores de imunodeficiências congênitas.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A administração do RAF da *I. carnea* promoveu efeitos diferentes entre os animais jovens e adultos.

- A *I. carnea* promove, em animais adultos, efeito indireto sobre o peso relativo do timo decorrente da menor ingestão de alimentos. Por outro lado, ratos pré-púberes não apresentam qualquer alteração neste órgão linfóide.

- O aumento do peso relativo de baço de ratos adultos e jovens tratados com o RAF da *I. carnea* é decorrente de alterações congestivas observadas neste órgão, uma vez que não houve aumento no número de esplenócitos e tão pouco hemocaterese que justificasse a esplenomegalia.

- A administração da *I. carnea* em ratos adultos promoveu diminuição da celularidade de medula óssea de forma indireta, já que ratos adultos sob restrição alimentar apresentaram o mesmo perfil celular neste órgão hematopoiético.

- A administração da maior dose do RAF da *I. carnea* altera a população de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ no timo de ratos jovens também de forma indireta, decorrente, na verdade, do menor consumo de ração.

- Animais jovens tratados com o RAF de *I. carnea* ou aqueles tratados com a SU apresentam menor porcentagem de linfócitos B na circulação e no baço.

- Tanto animais jovens quanto adultos apresentaram vacuolização do tecido renal devido a exposição ao RAF da *I. carnea* e também decorrente da administração de SU isoladamente.

- A SU administrada isoladamente em ratos jovens não promoveu alteração no peso relativo de órgãos linfóides, nem na celularidade dos mesmos.

- Animais jovens tratados com 5,0 mg/kg de SU durante 14 dias apresentam maior capacidade proliferativa de linfócitos T CD3⁺CD4⁺

- Com o estudo toxicocinético da SU foi possível depreender que a meia-vida na circulação deste alcalóide é curta, sendo sua biodisponibilidade de aproximadamente 9 horas, sugerindo que em experimentos futuros, a administração da SU ou do RAF da *I. carnea* seja feita com maior frequência.

- A administração do RAF de *I. carnea* mostrou promover maior efeito tóxico sobre o consumo de ração e ganho de peso dos animais que a SU isoladamente, evidenciando que as calisteginas podem promover efeito sinérgico na intoxicação

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, SHIV. Células e tecidos do sistema imunológico adquirido. In: ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, SHIV. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008. P. 47-74.
- ALROY, J.; FREDEN, G. O.; GOYAL, V.; RAGHAVAN, S. S.; SCHUNK, K. L. Morphology of leucocytes from cats affected with alpha-mannosidosis and mucopolysaharidosis VI (MPS VI). **Veterinary Pathology**, v. 26, p.294-302, 1989
- AO, T.; CANTOR, A. H.; PESCATORE, A. J.; PIERCE, J. L. *In vitro* evaluation of feed-grade enzyme activity at pH levels simulating various parts of the avian digestive tract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 140, p. 462-468, 2008
- ASANO, N. Water soluble nortropane alkaloids in crude drugs, edible fruits and vegetables: biological activities and therapeutic applications. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 116, p. 155-156, 2000.
- ASANO, N.; KATO, A.; OSEKI, K.; KIZU, H.; MATSUI, K. Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae). Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 229, n. 2, p.369-76, 1995.
- AUSTIN, D. F.; HUAMAN, Z. A synopsis of *Ipomea* (Convolvulaceae) in the Americas. **Taxon**, v. 45, 3-38,1996.
- BÁEZ-SALDAÑA, A.; ORTEGA, E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1970-1977, 2004.
- BEACH, R. S.; GERSHWIN, M. E.; HURLEY, L.S. Gestacional zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. **Science**, v. 218, p. 469-471, 1982.
- BOWLIN, T. L.; SCHROEDER, K. K.; FANGER, B.O.; Swainsonine, an inhibitor of mannosidase II during glycoprotein processing, enhances concanavalin A-induced T cell proliferation and interleukin 2 receptor expression exclusively via the T cell receptor complex. **Cellular Immunology**, v. 137, p. 111-117, 1991.
- BOWLIN, T. L.; SUNKARA, P. S. Swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing, enhances mitogen induced interleukin 2 production and receptor expression in human lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 151, p. 859-864, 1998.
- CAVA, A. L.; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. **Nature Reviews**, v. 4, p. 371-379, 2004.

- DAS, P.C.; ROBERTS, J.D.; WHITE, S.L.; OLDEN, K. Activation of resident tissue-specific macrophages by swainsonine. **Oncology Research**, v. 7, p. 425-433, 1995
- DE BALOGH, K. I. M.; DIMANDE, A. P.; VAN DER LUGT, J. J.; MOLYNEUX, R. J.; NAUDÉ, T. W.; WELMAN, W. G. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 266-273, 1999.
- DESCOTES, J. **An introduction to immunotoxicology**. Abingdon: Taylor & Francis, 1999. 11p
- DIETERT, R. R.; ETZEL, R. A.; CHEN, D.; HALONEN, M.; HOLLADAY, S.D.; JARABEK, A. M.; LANDRETH, K.; PEDEN, D. B.; PINKERTON, K.; SMIALOWICZ, R.J.; ZOETIS, T. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: Immune and respiratory systems work group summary. **Environmental health perspectives**, v. 1008, p. 483-490, 2000.
- DORLING, P. R.; HUXTABLE, C. R.; VOGUEL, P. Lysosomal storage in Swainsona spp. toxicosis: an induced mannosidosis. **Neuropathology Applied neurobiology**, v. 4, p. 285-295, 1978.
- DORLING, P. R. Lysosomal storage diseases in animals. In: DINGLE, J. T.; DEAN, R. T.; SLY, W. (Ed.) **Lysosomes in biology and pathology**. Amsterdam: Elsevier, 1984, p. 347-479.
- ELBEIN, A. D. Glycosidase inhibitors: inhibition of N-linked oligosaccharide processing. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 3055-3063, 1991.
- FARQUHAR, M. G.; HUARI, H. P. Protein sorting and vesicular traffic in the Golgi apparatus. In: BERGER, E.; ROTH, J. (Ed.). **The Golgi apparatus (molecular and cell biology updates)**. Basel: Birkhauser, 1997, p. 63-130.
- FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain research bulletin**, v. 40, n. 4, p. 253-256, 1996.
- FERNÁNDEZ-RIEJOS, P.; NAJIB, S.; SANTOS-ALVAREZ, J.; MARTÍN-ROMERO, C.; PÉREZ-PÉREZ, A.; GONZÁLEZ-YANES, C.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Role of leptin in the activation of Immune cells. **Mediators of inflammation**. V. 2010, p. 1-8, 2010.
- FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, p. 763- 770, 1998
- GARDINER, M. R.; ROYCE, R.; OLDROY, B. *Ipomoea muelleri* intoxication of sheep in Western Australia. **British Veterinary Journal**, v. 121, p. 272-277, 1965.
- GOOD, R.A; DALMASSO, A.P.; MARTINEZ, C.; ARCHER, O. K.; PIERCE, J. C.; PAPERMASTER, B. W. The role of the thymus in development of immunologic

capacity in rabbits and mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 116, p. 773-796, 1962.

GOLDMANN, A.; MESSAGE, B.; TEPFER, D.; MOLYNEUX, R. J.; DUCLOS, O.; BOYER, F. D.; PAN Y. T.; ELBEIN, A. D. Biological activities of the nortropane alkaloid, calystegine B2, and analogs: structure-function relationships. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 1137-1142, 1996.

GONÇALVES, M. L. Convolvulaceae-Custaceae. In: LAUNERT, E. (Ed.). **Flora zambesiaca**. London: Flora Zambesiaca Managing Committee, 1987, v. 8, p. 117-18.

GRZEGORZEWSKI, K.; NEWTON, S.A.; AKIYAMA, S.K.; SHARROW, S.; OLDEN, K.; WHITE, S.L. Induction of macrophages tumoricidal activity, major histocompatibility complex class II antigen (Iak) expression, and interleukin-1 production by swainsonine. **Cancer Communication**, v. 1, p. 373- 379, 1989.

HADDAD, J. J.; SAADÉ, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 1-19, 2002.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; IKEDA, K.; MINAMI, Y.; KATO, A.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; MOLYNEUX, R. J.; ASANO, N. J. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4995-5000, 2003.

HINO, M.; NAKAYAMA, O.; TSURUMI, Y.; ADACHI, K.; SHIBATA, T.; TERANO, H.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. Studies of immunomodulator, swainsonine. Enhancement of immune response by swainsonine in vitro. **Journal of antibiotics**, v. 38, p. 926-935, 1985

HOHENE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, p. 32, 1939.

HOLLADAY, S.D.; SMIALOWICZ, R.J. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 463-473, 2000.

HUEZA, I. M.; DAGLI, M. L. Z.; GÓRNIK, S. L. Toxic effects of prenatal *Ipomoea carnea* administration to rats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, p. 298-302, 2003.

HUEZA, I. M.; GUERRA, J. L.; HARAGUCHI, M.; ASANO, N.; GÓRNIK, S. L. The role of alkaloids in toxicosis: A study in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, n. 1, p. 53-58, 2005.

HUEZA, I. M. **Parâmetros inflamatórios, imunológicos e histopatológicos da administração prolongada da *I. carnea* em ratos: 1. Avaliação em animais adultos**

2. Estudo perinatal. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HUMPHRIES, M.J.; MATSUMOTO, K.; WHITE, R.; MOLINEUX, R.J.; OLDEN, K. Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antimetastatic immunomodulator. **Cancer Research**, v. 48, p. 1410-1415, 1988.

JOLLY, R. D.; WALKLEY, S. U. Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 527-548, 1997.

KARASUNO, T.; KANAYAMA, Y.; NISHIURA, T.; NAKAO, H.; YONEZAWA, T.; TARUI, S. Glycosidase inhibite pokeweed mitogen-induced b-cel maturation. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2003-2008, 1992.

KNOTT, S. A.; CUMMINS, L. J.; DUNSHEA, F. R.; LEURY, B. J. Feed efficiency and body composition are related to cortisol response to adrenocorticotropin hormone and insulin-induced hypoglycemia in rams. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 39, p. 137 -146, 2010.

LATORRE, A. O; HUEZA, I. M; MARIANO-SOUZA; D. P; HARAGUCHI, M; GÓRNIAC. S.L., Immunomodulatory effects of swainsonine from *Ipomoea carnea* in healthy mice. **Journal of pharmacology and toxicology**, v. 4, p. 246-253, 2009.

LORD, G. M; MATARESE, G.; HOWARD, J. K.; BAKER, R. J.; BLOOM, S. R.; LECHLER, R. I., Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, p. 897-901, 1998.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2. ed. Nova Odessa: Editora Platarum, 1991, p. 125.

MALM, D.; HALVORSEN, D. S.; TRANEBJAERG, L.; SJURSEN, H. Immunodeficiency in alpha-mannosidosis: A matched case-control study on immunoglobulins, complement factors, receptor density, phagocytosis and intracellular killing in leucocytes. **European Journal of pediatrics**, v. 159, p. 699-703, 2000.

MATARESE, G.; CAVA, A. L.; SANNA, V.; LORD, G. M.; LECHLER, R. I.; FONTANA, S.; ZAPPACOSTA, S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? **Trends in Immunology**, v. 23, p. 182 – 187, 2002

MATOS, F. J. A. Efeitos psicotrópicos de plantas brasileiras. **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 432-434, 1983.

MENDELSON, J. H.; STEFAN, M. D., Serum cortisol levels in alcoholic and nonalcoholic subjects during experimentally induced ethanol intoxication. **Psychomatic Medicine**, v. 28, p. 616- 626, 1966.

MISAGO, M.; TSUKADA, J.; FUKUDA, M. N.; ETO, S. Suppressive effects os swainsonine and N-butyldeoxynojirimycin on human bone marrow neutrophil

maturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 219-225, 2000.

MOLYNEUX, R. J.; MCKENZIE, R. A.; O'SULLIVAN, B. M.; ELBEIN, A. D. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea sp.* Q6 [aff. *calobra*]) and correlation with toxicity. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 878-886, 1995.

MOREMEN, K. W.; ROBBINS, P. W. Isolation, characterization, and expression of cDNA encoding murine α -mannosidase II, a golgi enzyme that controls conversion of high mannose to complex N-glycans. **Journal of Cell Biology**, v. 115, p. 1521-1534, 1991.

MYC, A.; DEANGELIS, P.; LASSOTA, P.; MELAMED, M.R.; DARZYNKIEWICZ, Z. Effect of swainsonine on interleukin-2 alpha chain receptor expression and proliferation of human lymphocytes. **Clinical experimental Immunology**, v. 84, p. 406-410, 1990.

OREDIPE, O. A.; FURBERT-HARRIS, P. M.; GREEN, W. R.; WHITE, S.L.; OLDEN, K.; LANIYAN, I.; PARISH-GAUSE, D.; SRIDHAR, R. Swainsonine stimulates bone marrow cell proliferation and differentiation in different strains of inbred mice. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 69-74, 2003a.

OREDIPE, O. A.; FURBERT-HARRIS, P. M.; LANIYAN, I.; GREEN, W. R.; WHITE, S.L.; OLDEN, K.; PARISH-GAUSE, D.; SRIDHAR, R. Enhanced proliferation of functionally competent bone marrow cells in different strains of mice treated with swainsonine. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 445-455, 2003b.

PAN, Y. T.; GHIDONI, Y.; ELBEIN, A. D. The effects of castanospermine and swainsonine on the activity and synthesis of intestinal sucrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, p. 134-144, 1993.

PRITCHARD, D. H.; HUXTABLE, C. R.; DORLING, P. R. Swainsonine toxicosis suppresses appetite and retards growth in weanling rats. **Research in Veterinary Science**, v. 46, p. 228 - 230, 1990.

RYAN, D. H. Examination of the blood. In: BEUTLER, E; LICHTMAN, M. A; COLLER, B. S; KIPPS, T. J; SELIGSOHN, U. (Ed.) **Hematology**. United States: Mc Graw-Hill, 2001, p. 9-6.

ROGERS, J.M.; KAVLOCK, J. Developmental toxicology. In: CURTIS, D.K (Ed). **Cassaret & Doull's toxicology: the basic science of poisonous**. New York: McGraw-Hill, 2001. P. 301-333.

SCHNEIDER, M. J.; UNGMACH, F. S.; BROQUIST, H. P.; HARRIS, T. M. (1S2R8R8aR)-1,2,8-trihydroxy-octahydroindolizidine (swainsonine), an α -mannosidase inhibitor from *rhizoctonia lebuminicola*. **Tetrahedron**, v. 39, p. 29-32, 1983.

SCHUMAHER-HENRIQUE, B.; GÓRNIK, S. L.; DALGLI, M. L. Z.; SPINOSA, H. S. Toxicity of Long- term Administrati of *Ipomoea carnea* to Growing Goats: Clinical, Biochemical, Haematological and Pathological Alterations. **Veterinary Research**, v. 27, p. 311-319, 2003.

SCHUMAHER-HENRIQUE, B. **Efeitos tóxicos da Ipomoea carnea em caprinos: estudos de teratogenicidade.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

SCHWARZ, A.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M.; DALGLI, M. L. Z.; SPINOSA, H. S. Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development rat offspring. **Neurotoxicology Teratology**, v. 25, p.615-626, 2003.

SHARMA, R. P.; JAMES, L.F.; MOLINEUX, R.J. Effect of repeated locoweed feeding on peripheral lymphocytic function and plasma protein in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 2090- 2093, 1984.

SRILATHA, C. H.; GOPAL-NAIDU, N. R.; RAMA-RAO, P. Pathology of *Ipomoea carnea* toxicity in goats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 67, p. 253-254, 1997.

STEGELMEIER, B. L.; RALPHS, M. H.; GARDNER, D. R.; MOLYNEUX, R. J.; JAMES, L. F. Serum α -mannosidase and the clinicopathologic alterations of locoweed (*Astragalus mollissimus*) intoxication in range cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 473-479, 1994.

STEGELMEIER, B. L.; JAMES, L. F.; PANTER, K. E.; GARDNER, D. R.; RALPHS, M.; PFISTER, J. A. Tissue swainsonine clearance in sheep chronically poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1140-1144, 1998.

TIRKEY, K.; YADAVA, K. P.; MANDAL, T. K. Effect of aqueous fraction of *Ipomoea carnea* on the haematological and biochemical parameters in goats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 57, p. 1019-1023, 1987.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas que causam perturbações nervosas. In TOKARNIA, C. H. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, 2000 p. 120-123.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Estudo experimental sobre a toxidez do “canudo” (*Ipomoea carnea* Mart.) em ruminantes. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v. 3, p. 59-71, 1960.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transaction British Mycology Society**, v. 66, p. 407-411, 1976.

- TULSIANI, D. R.; BROQUIST, H. P.; JAMES, L. F.; TOUSTER, O. Production of hybrid glycoproteins and accumulation of oligosaccharides in the brain of sheep and pigs administered swainsonine or locoweed. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 264, p. 607-617, 1988.
- TUMBULL, A.V; RIVIER, C.L; Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol. Rev.** v. 79, p. 1-71, 1999.
- TUORMAA, T.E. The adverse effects of zinc deficiency. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 10, p. 149-164, 1995.
- VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. Sequential development of cytoplasmatic vacuolation in tissues. **Pathology Veterinary**, v. 7, p. 503-508, 1970.
- VELLOSO, L. A.; SAVINO, W.; MANSOUR, E. Leptin action in the thymus. **Neuroimmunomodulation**, v. 1153, p. 29-34, 2009
- WHINCHESTER, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. **Glycobiology**, v. 15, p. 1-15, 2005.
- WHITE, S. L.; SCHWEITZER, K.; HUMPHRIES, M. J.; OLDEN, K. Stimulation of DNA synthesis in immune lymphocytes by the drug swainsonine: immunomodulatory properties. **Biochemical and Biophysical Research communications**, v. 150, p. 615-625, 1998
- YAGITA, M.; SAKSELA, E. Swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing, enhances cytotoxicity of large granular lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 31, p. 275-282, 1990.
- ZHANG, Y; PROENCA, R; MAFFEI, M; BARONE, M; LEOPOLD, L; FRIEDMAN, JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.