The background of the entire page is a photograph of Ipomoea carnea flowers. The flowers are large, trumpet-shaped, and have a light pink or lavender color with a darker pink center. They are surrounded by green, heart-shaped leaves. The image is slightly blurred, giving it a soft, artistic feel.

LUCIANA LUCINIO LIPPI

Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário

**São Paulo
2009**

LUCIANA LUCINIO LIPPI

Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário

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. Silvana Lima Górnjak

São Paulo
2009

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.2163
FMVZ

Lippi, Luciana Lucinio
Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário / Luciana Lucinio Lippi. – São Paulo : L. L. Lippi, 2009.
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

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

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górniak.

1. *Ipomoea cárnea*. 2. Toxicologia do desenvolvimento. 3. Placenta.
4. Lectina-histoquímica. 5. Ratos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário", protocolado sob o nº1091/2007, utilizando 120 (cento e vinte) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, 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 "Toxicity study of *Ipomoea carnea* in rats during perinatal period. Evaluation of the possible injurious effects on placental tissue", protocol number 1091/2007, utilizing 120 (one hundred-twenty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 03 de maio de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIPPI, Luciana Lucinio

Título: Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário

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: _____

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de mestrado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"O mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa
o reflexo de seus próprios pensamentos.
A maneira como você encara a vida é que faz toda
diferença."

Luís Fernando Veríssimo

Agradecimentos

À minha mãe, pela paciência, apoio, carinho, amor e compreensão em todos os momentos da realização deste trabalho, sendo sempre o meu "porto seguro" e a fortaleza em que me espelho. Não tenho palavras pra dizer o quanto te amo.

Ao meu pai (*in memoriam*) por todo o seu carinho, dedicação, amor e por ter sido o melhor pai do mundo. Com certeza grande parte do que hoje sou, devo a você que sempre me incentivou nos estudos, dizendo que devemos ser o melhor no que fazemos.

Ao meu irmão Lucas, pessoa que tem o coração maior que o peito e que sempre me faz rir quando quero chorar. Você é fundamental em minha vida.

Ao meu namorado Maciel, por todo amor e compreensão, pelo o incentivo de nunca desistir dos meus sonhos e principalmente por sempre estar ao meu lado. Te amo.

À minha orientadora Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, confiança, paciência, apoio e exemplo de dedicação ao trabalho.

À Prof. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua do Instituto de Ciências Biomédicas pela amizade, ensinamentos transmitidos e por toda paciência e tempo dispensado no imprescindível auxílio na análise histológica do tecido placentário.

À Dra. Isis Machado Hueza, pela grande amizade, apoio e incentivo, sempre colaborando com boas idéias que muito auxiliaram para a execução deste trabalho e principalmente pela paciência e tempo dispensado na elaboração desta dissertação.

À Profa. Dra. Lílian Rose Marques de Sá do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ-USP, pela paciência, e disponibilidade de tempo no imprescindível auxílio na análise histopatológica.

Aos demais professores do VPT, especialmente Jorge Camilo Flório, Paulo César Maiorka e Helenice de Souza Spinosa pela idéias e pelo auxílio quando necessário.

Ao meu grande amigo Felipe Santos uma pessoa simplesmente incrível, presente em todos os momentos, sempre disposto a ajudar, até mesmo nos experimentos durante muitos finais de semanas e intermináveis procedimentos dentro do biotério, além de ter sido imprescindível sua ajuda intelectual, cada passo deste trabalho com certeza tem a sua impressão. Obrigada por tudo.

À Camila Moreira, pela grande amizade, apoio e incentivo, por toda ajuda nos experimentos e ensinamentos transmitidos e principalmente pelas longas conversas sobre a toxicologia do desenvolvimento. Você foi fundamental para a execução deste trabalho. Muito obrigada.

À Camila Lima e Luciana Cunha por dividir comigo momentos muito agradáveis regados de muitas risadas, sempre dispostas a ajudar em qualquer situação e excelentes conselheiras. Amigas muito obrigada por participarem deste trabalho.

À Andréia Latorre por ser um exemplo de profissionalismo, uma pessoa extremamente comprometida a ajudar todos sem medir esforços, pelo grande auxílio no desenvolvimento intelectual deste trabalho e principalmente pela amizade construída ao longo destes anos.

Aos meus irmãos científicos: Domenica, Beatriz, Aline, Juliana, Fernando, Vânius e André que de diferentes formas contribuíram com a minha vida acadêmica.

A todos os colegas do VPT que contribuíram com alguma etapa deste trabalho: Mônica, Wanderley, Alisson, Viviane, Luciana Vismari, Milena, Thiago, Esther, Eduardo, Silvia, Dudu, Alexandre, Altamir, Renato, Carol, Daniel Cohn, Daniel Sanches, Denise, Ricardo Garé, Ricardo Lazzarini, Karin, Caio Silvestre, Glaucie, Heidge e Lucas.

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 e Ricardo, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do VPT Luciano e Cláudio, pela confecção das lâminas estudadas e pela amizade.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT Cláudia, Sílvia, Adriana, 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.

Aos demais familiares e amigos, especialmente minha madrinha Sueli, Cecela, Sérgio, Cacalo, Patrícia, Ana Lúcia, Paulo, Andréia, Marcelo, Vanessa, Marcelo, Maurício, Tia Lalá e Tio Jaime.

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

RESUMO

LIPPI, L. L. **Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário.** [*Ipomoea carnea* toxicity study in rats during perinatal period. Evaluation of possible harmful effects on the placental tissue]. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A *Ipomoea carnea* é uma planta tóxica amplamente distribuída no Brasil e em outros países tropicais. Durante os períodos de seca esta planta se mantém verde, podendo servir como fonte de alimento para os animais de produção. A intoxicação natural é de caráter crônico e ocorre quando ruminantes particularmente, caprinos ingerem a planta, estes animais desenvolvem, principalmente, sintomatologia de origem nervosa. Dois tipos de princípios ativos tóxicos foram isolados desta planta, um alcalóide nortropânico, as calisteginas B₁, B₂, B₃ e C₁ e principalmente o alcalóide indolizidínico, a suainsonina, cujo mecanismo de ação tóxico se estabelece por inibição de duas enzimas a α -manosidase lisossomal, levando ao acúmulo de oligossacarídeos não metabolizados no interior de lisossomos, promovendo a degeneração vacuolar intracitoplasmática, perda de função e até mesmo morte celular e a manosidase II do Complexo de Golgi, causando alterações na síntese, no processamento e no transporte de glicoproteínas. Histologicamente esta intoxicação é caracterizada pela presença de vacúolos lisossomais no sistema nervoso central (SNC), tireóide, fígado, pâncreas e rins. Recentemente, pesquisas, relativas à toxicidade perinatal desta planta, vêm mostrando que a *Ipomoea carnea* possui efeitos teratogênicos, em ratos, caprinos e coelhos, porém até o momento não se sabe se a placenta poderia estar envolvida na gênese desta patologia ou se os efeitos deletérios no feto seriam devidos diretamente à passagem transplacentária do princípio ativo tóxico. Portanto o principal objetivo desta pesquisa foi verificar o possível efeito placentotóxico da planta. Assim, o resíduo aquoso final da planta (RAF) foi administrado, via oral, por *gavage* para ratas Wistar gestantes, nas doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg no período do 6º ao 19º dias de gestação, já os animais do grupo controle e *peer-feeding*, receberam apenas água pela mesma via e período que os animais tratados. Durante o período de tratamento estes animais foram

inspecionados diariamente e o consumo de água e ração, bem como o ganho de peso mensurados à cada 3 dias. No final da gestação parte dos animais foram, destinados a secção cesariana, para principalmente avaliação do tecido placentário e os outros animais seguiram a gestação até o nascimento a termo para análise das proles. Dos animais provenientes da secção cesariana, foram coletados os fetos e suas respectivas placentas, sendo estas encaminhadas para análise anatomopatológica, histoquímica (lectinas e TUNEL) e morfométrica, assim como os fetos mensurados quanto ao seu tamanho e peso e avaliados para malformações externas e análise óssea e visceral e realizado o desempenho reprodutivo destas fêmeas. As gestantes que seguiram até o nascimento de suas prole, as quais foram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento físico e reflexológico diariamente e nos dias 4, 8, 15 e 22 de lactação, um filhote de cada mãe foi eutanasiado para coleta de fragmentos representativos do fígado, rim, SNC e pâncreas para avaliação histopatológica, este procedimento também foi realizado naquelas mães submetidas a secção cesariana no 20º dia de gestação, bem como nas mães lactantes no 22º dia de lactação. Os resultados obtidos evidenciam claramente o potencial teratogênico produzido pela *Ipomoea carnea*, visto que tanto os fetos quanto os filhotes apresentaram algumas anomalias congênitas, diminuição do peso ao nascimento e também o retardo na geotaxia negativa. No fígado e nos rins das mães e dos filhotes foi observada a degeneração vacuolar, evidenciando a toxicidade materna e fetal promovida pela planta expostos durante o período gestacional. Um dado importante aqui observado se refere à avaliação do tecido placentário, o qual apresentou algumas alterações histopatológicas, como o espessamento da zona de labirinto e a redução de espessura da zona juncional, porém a degeneração vacuolar não fora observada neste órgão, porém quando realizada a técnica de lectina-histoquímica, foi possível observar o acúmulo de alguns açúcares nas células em diversas regiões da placenta, evidenciando desta forma que este tecido também sofreu injúria promovida pela ação da planta, não sendo mais possível considerar este órgão apenas como um local de passagem para estes princípios ativos tóxicos.

Palavras-chaves: *Ipomoea carnea*. Toxicologia do desenvolvimento. Placenta. Lectina-histoquímica. Ratos.

ABSTRACT

LIPPI, L. L. ***Ipomoea carnea* toxicity study in rats during perinatal period. Evaluation of possible harmful effects on the placental tissue.** [Estudo da toxicidade da *Ipomoea carnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário]. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Ipomoea carnea is a toxic plant widely distributed in Brazil and other tropical countries. During periods of drought, animals graze on this plant which grows even in the presence of adverse climatic conditions. After prolonged periods of plant intake, the animals exhibit a variety of clinical signs as depression, general weakness, body weight loss, staggering gait, muscle tremors, ataxia, posterior paresis, and paralysis. Two kinds of toxic principles were isolated from the plant, the nortropane alkaloids calystegines B1, B2, B3 and C1 and mainly the indolizidine alkaloid swainsonine. The latter alkaloid is a potent inhibitor of two distinct intracellular enzymes, the lysosomal α -mannosidase which results in lysosomal accumulation of incompletely processed oligosaccharides moieties inside vacuoles, which progresses to cellular function loss and, ultimately, to cell death and the Golgi mannosidase II enzyme causes alteration of the N-linked glycoprotein process, modifying the glycoprotein synthesis, processing and carrier. Histologically, cellular vacuolization of Purkinje cells, thyroid follicles, exocrine pancreas, liver and kidney cells have been observed. Recently, many studies in our laboratory have shown that *Ipomoea carnea* have teratogenic effects in rats, goats and rabbits. However, it is not known yet if the alterations observed in the fetuses are due to alterations in the placenta or if they can be directly related to the transplacental transfer of the active principle. The present study was performed to evaluate the effects of *Ipomoea carnea* in the placental tissue and in the litter of female rats treated during. Pregnant rats of the experimental groups were treated orally by gavage, once a day from GD6 to GD19, with 1,0; 3,0; 7,0 g/kg of *Ipomoea carnea* AF. The control and *peer-feeding* group received tap water by gavage. Total body weight gain, water and food consumption were measured each three days during the experimental period. At the end of pregnancy period some animals were, for cesarean section, mainly for evaluation of placental

tissue and the other animals followed the pregnancy until the birth to the term analysis of offspring. From the animals that came from the cesarean section, were collected the fetuses and their placental, those being collected for anatomopathological, histochemistry (lectins and TUNEL) and morphometric analysis, as the fetuses measured about their sizes and weight and assessed to external malformation and bone and visceral analysis and performed the reproductive performance of those females. The pregnant rats that followed up to the birth of their offspring, which were assessed regarding their physical and reflexology development daily and at days 4, 8, 15 e 22 of lactation, an offspring of each mother was euthanized so representatives fragments of the liver, kidney, SNC and pancreas could be collected for a histopathological assessment, this procedure was also performed at those mothers submitted to the cesarean section at the 20th pregnancy day, as well as at the breastfeeding at the 22nd lactation day. The obtained results clearly show the teratogenic potential produced by the *Ipomoea carnea*, because both the fetuses as the pups had some congenital anomalies, decrease in birth weight and the delayed negative geotaxis. At both the mother and offsprings' liver and kidneys was observed a vacuolar degeneration, showing the maternal and fetal toxicity promoted by the plant exposed during the pregnancy period. An important data noted here refers to the placental tissue assessment, which showed some histopathological alterations, as the labyrinth zone thickening and the reduction of the junctional zone thickness, however the vacuolar degeneration was not observed in this organ, although when performed the lectin-histochemistry technique, it was possible to observe the accumulation of some sugars in some cells located at several regions of the placenta, this way showing that this tissue has also suffered some injury promoted by the plant action, not being possible anymore to consider this organs just as a plac of passage for these toxic active principle.

Key words: *Ipomoea carnea*. Developmental toxicology. Placental. Lectin-histochemistry. Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 A <i>Ipomoea carnea</i>.....	18
1.2 Formação da placenta.....	24
1.3 Sobre a teratogenicidade.....	27
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais.....	34
3.2 Reagentes e equipamentos.....	34
3.3 Matéria vegetal.....	36
3.4 Procedimentos.....	36
3.4.1 Extração de princípios ativos da <i>Ipomoea carnea</i>	36
3.4.2 Determinação quantitativa dos alcalóides.....	37
3.4.3 Administração do resíduo aquoso final.....	37
3.4.4 Acasalamento e confirmação da prenhez.....	38
3.4.5 Avaliação do ganho de peso, do consumo de ração e água de ratas.....	38
3.4.6 Cesariana.....	38
3.4.7 Coleta de sangue.....	39
3.4.8 Dosagem bioquímica.....	40
3.4.9 Necropsia e coleta de materiais.....	40
3.4.10 Avaliação anatomopatológica e avaliação morfométrica dos órgãos e da placenta.....	41
3.3.10.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina.....	41
3.3.10.2 Avaliação morfométrica do tecido placentário.....	41
3.3.10.3 Lectina-histoquímica.....	42

3.3.10.4 Detecção de apoptose por coloração TUNEL através de microscopia de luz.....	44
3.4.11 Análise dos fetos no 20º dia de gestação: avaliação de malformações ósseas e viscerais.....	44
3.4.12 Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal.....	45
3.5 Delineamento experimental.....	49
3.5.1 Avaliação da administração do RAF da <i>I. carnea</i> a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e feto durante o período pré-natal.....	49
3.5.2 Avaliação da administração do RAF da <i>I. carnea</i> a ratas gestantes: estudo do tecido placentário.....	50
3.5.3 Avaliação da administração do RAF da <i>I. carnea</i> a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e prole durante o período pós-natal.....	50
3.5.4 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Quantificação de alguns princípios ativos presentes na <i>I. carnea</i>	53
4.2 Avaliação da administração do RAF da <i>I. carnea</i> a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e feto durante o período pré-natal.....	55
4.3 Avaliação da administração do RAF da <i>I. carnea</i> a ratas gestantes: estudo do tecido placentário.....	67
4.4 Avaliação da administração do RAF da <i>I. carnea</i> a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e prole durante o período pós-natal.....	71
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	99

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 (8-10mm de comprimento), intensamente recobertas por pêlos ferrugíneos (HOEHNE, 1939; LORENZI, 1991) (Figura 1).

Esta planta pode ser encontrada, por todo o Brasil, e 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 *Ipomoea 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 *Ipomoea carnea* mantêm-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 *Ipomoea 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).

No Brasil, Schumacher-Henrique (2005), também mostrou em estudo conduzido em cabras tratadas com a *Ipomoea carnea* os sintomas clínicos e os achados histopatológicos descritos no quadro de intoxicação, contudo ao contrário dos achados de De Balogh et al. (1999), que realizaram a pesquisa em Moçambique, este autor observou ingestão compulsiva dos animais à planta brasileira.

Os primeiros a isolar os princípios ativos tóxicos da *Ipomoea 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 *Ipomoea 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 atividade enzima β -glicosidase e por fim a calistegina B₃ é um inibidor moderado das 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.

A suainsonina, principal composto ativo tóxico encontrado na *Ipomoea carnea*, possui o seu mecanismo de ação há muito tempo conhecido, já que este alcalóide não é encontrado exclusivamente na *Ipomoea carnea*, 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 *Ipomoea carne*. Assim, a suainsonina pode ser encontrada em plantas da família das Leguminosae, como a *Swainsona canescens*, originária da Austrália (DORLING; HUXTABLE; VOGUEL, 1978), em algumas espécies do gênero *Astragalus* e *Oxytropis*, nativas da América do Norte e conhecidas 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, 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 ser 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; SCHUMAHER-HENRIQUE, 2005; HUEZA et al., 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 glicolisação em glicoproteínas, cabendo a esta manosidase remover ou alterar os padrões de resíduos de manose de glicoproteínas (N-glicanos) recém sintetizados 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).

Devido ao fato das glicoproteínas participarem dos mais diferentes tipos de atividade celular, não é de se surpreender que vários são os sistemas sobre os quais a suainsonina pode promover seus efeitos. Desta forma, diversos são os relatos que a intoxicação por plantas que possuem a suainsonina como princípio ativo promove alterações em múltiplos sistemas, levando ao aparecimento de alterações gastrointestinais, com modificações estruturais nas enzimas presentes na borda em escova do intestino delgado (PAN; GHIDONI; ELBEIN, 1993); alterações reprodutivas, com comprometimento da produção de espermatozoas, espermátides e espermatócitos primários e secundários (TULSIANI; SKUDLAREK; ORGEBIN-CRIST, 1990); embriogênicas, com reabsorção fetal ou proles reduzidas com menor peso ao nascimento (NELSON; JAMES; SHARMA, 1980; SCHWARZ et al., 2003; SCHUMAHHER-HENRIQUE, 2005; HUEZA, 2006) e imunológicas (KARASUNO et al., 1992; HUEZA et al., 2003, 2007).

1.2 Formação da placenta

Quando o embrião de roedores atinge o estágio de 8 a 32 células (blastômeros), sob a forma de uma mórula compactada ou em processo de compactação, ainda revestido pela zona pelúcida, ele é transportado para dentro do útero, por volta do 4º dia de gestação, onde continua a proliferar. O tempo que o embrião permanece no oviduto permite que o útero se prepare para a função de nutrição a partir de sua instalação. O desenvolvimento de firmes junções intracelulares na mórula, durante a compactação, é seguida pelo bombeio da mesma de íons e água para o interior da vesícula embrionária que contribui para o acúmulo de fluído na cavidade central chamada de blastocele. O embrião, agora denominado de blastocisto, apresenta-se constituído por células de revestimento, o trofoblasto e pela massa celular interna ou embrioblasto, que está revestida pelos trofoblastos, assim com a blastocele. A diferenciação dessas duas lâminas de células específicas origina as células iniciais que, eventualmente, contribuem para a formação da placenta e do embrião. A massa celular interna desenvolve três lâminas germinativas primárias do embrião (ectoderma, mesoderma, endoderma) durante o processo chamado de gastrulação. O blastocisto segue seu desenvolvimento com a eclosão da zona pelúcida e iniciando o processo de implantação embrionária, a saída do blastocisto da zona pelúcida proporciona o primeiro contato celular entre o conceito e o epitélio uterino materno, este contato é essencial para a troca de nutrientes e para a aderência placentária (GEISERT; MALAYER, 2004). Chama-se de pólo embrionário aquele que mantém proximidade com o embrioblasto, e de abembrionário, o pólo oposto. O trofoblasto que reveste o embrioblasto é denominado de polar em oposição ao que reveste a blastocele que é chamado de mural (GARDNER, 1973).

São as células trofoblásticas que fazem contato e interagem com o organismo materno durante todo o período gestacional, desta forma as células trofoblásticas murais e abembrionárias, são as que inicialmente participam do processo de implantação embrionária, tornando-se firmemente aderidas ao epitélio uterino e iniciam a invasão do endométrio. Estas células, também denominadas células trofoblásticas gigantes primárias, sofrem um processo de diferenciação, tornando-se poliplóides, passam a apresentar grandes dimensões, exibindo características de células produtoras de proteínas e esteróides e passam a exibir atividades adesiva, invasiva e também fagocítica (DICKSON, 1963; KAUFMAN, 1983; BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988, 1989). As demais células trofoblásticas localizadas no pólo embrionário (trofoblasto polar) mantêm sua capacidade proliferativa e forma uma excrescência denominada de cone ectoplacentário, no qual apenas as células mais periféricas desta estrutura se diferenciam em células gigantes secundárias e as mais internas dão origem a tipos celulares específicos que vão formar as diferentes regiões da placenta (GARDNER, 1973, 1983).

A interação estabelecida entre as células trofoblásticas e epiteliais uterina é uma característica geral entre os mamíferos. Em roedores e primatas, o processo de implantação embrionária prossegue com uma etapa invasiva, na qual as células trofoblásticas fagocitam e digerem o epitélio uterino à medida que migram para dentro do estroma, alcançam o endométrio e rompem os vasos endometriais de modo que o sangue materno extravasado passa a banhar a superfície destas células (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988).

Ainda, em relação aos roedores, o processo de gastrulação se inicia ao redor do 6º dia de gestação, envolvendo, assim como em outros mamíferos, eventos de proliferação e migração celular no ectoderma primitivo. O aumento do número de células e o movimento destas células em direção à região mediana caudal do disco germinativo levam à formação da linha primitiva, ocorrendo também neste momento à formação de um terceiro folheto, o mesodérmico, a partir das células ectodérmicas.

As células mesodérmicas também participam da formação dos anexos embrionários (âmnio, alantóide, córion e saco vitelino). O alantóide se desenvolve como uma evaginação mesodérmica a partir da margem posterior do ectoderma embrionário, onde a linha primitiva se origina. Esta estrutura se expande e cresce em direção ao cone ectoplacentário, estabelece ligações de contato com as células da base desta estrutura (placa coriônica) e torna-se ricamente vascularizada (GARDNER, 1983). As células trofoblásticas que repousam sobre este tecido formam colunas de arranjo aleatório que se projetam para espaços preenchidos por sangue materno e em cujo interior há mesênquima alantoideano vascularizado. Em conjunto esta região é chamada de labirinto placentário, na qual ocorrem as trocas materno/fetal (ENDERS; SCHLAFKE, 1969; HERNANDEZ-VERDUN, 1974).

Entre o labirinto e as células gigantes periféricas, forma-se também uma terceira população celular, o espongiotrofoblasto. Juntamente com as células gigantes esta região forma a zona juncional da placenta (ROSSANT; TAMURA-LIS, 1981). Nesta região, o arranjo labiríntico é perdido e substituído por uma camada de células de pequenas dimensões de citoplasma basófilo, dispostas sob a forma de ninhos (células do espongiotrofoblasto), onde também coexistem células que acumulam glicogênio (células de glicogênio). Permeando as células da região juncional também há sangue materno extravasado. Células gigantes predominam na interface materno-fetal e regularmente adentram extensões variáveis de vasos maternos, que descarregam seu conteúdo diretamente nos interstícios da malha trofoblástica e está envolvida na secreção de hormônios e de fatores angiogênicos, de crescimento vascular endotelial e de remodelamento tecidual (DAI et al., 2002). A placenta de ratos e camundongos em relação ao tipo de união das porções materno-fetais é definida como hemocorial, na qual o trofoblasto rompe os vasos sangüíneos endometriais e interage diretamente com o sangue materno, durante toda a gestação e está completamente formada ao redor do 14º dia de gestação e constituída pelas zonas: placa coriônica, labirinto e zona juncional (MÜNTENER; HSU, 1977) (Figura 2).

Figura 2 - Placenta de camundongo. *Physiology*, 2005, 20:180-193

1.3 Sobre a teratogenicidade

O interesse pelas malformações congênitas data da antiguidade da civilização. Há relatos de que antigas civilizações, como a grega, acreditavam que a presença de indivíduos malformados, então denominados de *teratos* (monstros) eram resultantes de punições divinas de pecados (GILDEN; BODEWITZ, 1991). No entanto, as malformações só passaram a despertar o interesse da comunidade científica recentemente. Desta maneira, até meados do século passado os cientistas se atinham, praticamente, à incidência de malformações em condições laboratoriais e, só esporadicamente, estas alterações eram associadas a situações cotidianas (por exemplo, com a exposição ao vírus da rubéola e à radiação). Foi o desastre com a talidomida, na década de 60, aquele que alterou o curso destas pesquisas e,

desde então, são muitos os laboratórios e pesquisadores mobilizados na pesquisa de efeitos tóxicos de xenobióticos sobre o desenvolvimento fetal.

Atualmente, esta área da ciência está bem desenvolvida, sendo a mesma denominada de “Toxicologia do Desenvolvimento”, a qual é parte da toxicologia reprodutiva, e é, ainda, subdividida em toxicologia pré e pós-natal (PETERS, 1998). A toxicologia do desenvolvimento abrange o estudo da cinética, mecanismo de ação tóxico, patogênese e as conseqüências da exposição a agentes tóxicos ou condições que levam ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Vários estudos, utilizando-se diferentes modelos animais vêm mostrando, inequivocamente, o potencial risco de agentes físicos, como raios-X e a anóxia, infecções, como aquelas causadas pelo *Toxoplasma sp*, endotoxinas, e, principalmente as substâncias químicas, em produzirem efeitos dismorfogênicos (ROGERS; KAVLOCK, 2001); no entanto, a placenta raramente vem sendo apontada como um possível local da gênese de indução de teratogenicidade (GOODMAN; JAMES; HARBISON, 1982; MARANGHI et al., 1998).

O desenvolvimento embrio/fetal de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos. O período de implantação, que compreende desde a fusão do óvulo e do espermatozóide até o implante do blastocisto no útero. A exposição a um agente tóxico nesta fase pode levar a embrioletalidade, sendo rara a ocorrência de teratogênese. O período de organogênese, organogenético ou embriogênico abrange desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares. Já neste período, a exposição a um xenobiótico poderá promover a ocorrência da teratogênese, se as lesões produzidas por este agente forem compatíveis à vida; por outro lado, se não forem, haverá embrioletalidade. Finalmente, o período fetal e o neonatal, no qual todos os tecidos estão formados, e ocorre o crescimento e maturação fisiológica do animal e humana, não havendo

mais neste período, suscetibilidade do feto em desenvolver malformações induzidas por toxicantes (ROGERS; KAVLOCK, 2001; BERNARDI, 2006).

Por outro lado, deve-se considerar que a placenta é a mais importante estrutura acessória embrionário/fetal, sendo considerado um órgão materno fetal, constituído por dois componentes: uma porção fetal originária do saco coriônico e uma porção materna derivada do endométrio. Assim, durante o período gestacional, a placenta, desempenha um papel fundamental na manutenção da nutrição do embrião/feto e nas funções secretórias e regulatórias, as quais são condições fundamentais para a manutenção da gestação. Assim sendo, todos os suprimentos do embrião/feto, a saber: oxigênio, água, eletrólitos, nutrientes, hormônios e anticorpos, em algumas espécies de animais, devem passar pela placenta. Além disto, várias enzimas, envolvidas nos quatro processos básicos de biotransformação: oxidação, redução, hidrólise e conjugação, estão presentes na placenta (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004; MOORE; PERSAUD, 2008; GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Desta forma, se o funcionamento da placenta não estiver adequado, pode haver um comprometimento não somente para a nutrição fetal, mas também na troca materno-fetal de constituintes fisiológicos e produtos de excreção, podendo, assim, representar um risco de injúria no feto e, conseqüentemente, o aparecimento de efeitos teratogênicos. Portanto, a placenta não deverá mais ser vista apenas como um passivo "condutor" de substâncias para a nutrição fetal, sendo necessário avaliar o seu papel na dismorfogênese, inclusive para melhor entender os mecanismos de teratogenicidade dos diferentes xenobióticos. Assim, a presente pesquisa visa avaliar o possível efeito placentotóxico da planta.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Verificar os possíveis efeitos tóxicos produzidos pela administração do resíduo aquoso final (RAF) obtido da *I. carnea* em ratas durante o período gestacional: avaliação materno-fetal e no tecido placentário.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a possível ocorrência de toxicidade materna promovida pela administração do RAF da *I. carnea* em diferentes doses, durante a gestação. Avaliação por meio da mensuração do ganho de peso, do consumo de água e ração e da análise histopatológica de diferentes tecidos.

- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração do RAF da *I. carnea* em diferentes doses, sobre o desempenho reprodutivo de ratas tratadas durante a gestação.

- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração do RAF da *I. carnea* em diferentes doses, sobre o tecido placentário de ratas tratadas durante a gestação, utilizando-se para tal análises morfométricas e histopatológicas pelas técnicas de hematoxilina e eosina, lectina-histoquímica e TUNEL.

- Verificar os possíveis efeitos teratogênicos promovidos pela administração do RAF da *I. carnea*, em diferentes doses, na prole de ratas tratadas durante a

gestação. I- Avaliação pré-natal, por meio da observação de alterações morfológicas (análise óssea e visceral). II- Avaliação pós-natal por meio da aferição do ganho de peso, da observação do desenvolvimento físico e reflexológico e da análise histopatológica de alguns tecidos.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – 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 constantes (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

- Acetona 99,5% (Sinth[®])
- Álcool benzílico 99,5% (Haloquímica[®])
- Álcool etílico 95° GL (Dinâmica[®])
- Álcool butílico (Vetec[®])
- Glicerina 99,5% (Sinth[®])
- Paraformaldeído (Sinth[®])

- Alizarina (Sinth[®])
- Hidróxido de potássio (Nuclear[®])
- Cloreto de sódio (Dinâmica[®])
- Soro albumina bovina – fração V (Gibco[®])
- Diaminobenzidina – DAB (Dako Cytomation[®])
- “Kits” comerciais para dosagem bioquímica: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), proteína total (PT), albumina, glicose, colesterol, uréia e creatinina (Celm[®])
- *Biotinylated lectin* kit I e kit II (Vector[®])
- *In Situ* Cell Death Detection kit, POD (Roche[®])
- Seringas descartáveis de 1,0 e 3,0 mL (Rynco[®])
- Freezer -20°C
- Microscópio eletrônico modelo Philips EM-120
- Microscópio de luz modelo Nikon
- CELM SBA-200 utilizado para as determinações bioquímicas
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf[®])
- Rotaevaporador (Fisaton[®])

3.3 Matéria vegetal

As folhas frescas da *Ipomoea carnea* (*I. carnea*), foram colhidas, em maio de 2004 e em maio de 2007 da cultura existente no Centro de Pesquisas Toxicológicas – CEPTOX – do Departamento de Patologia da FMVZ, Campus de Pirassununga, USP.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Extração de princípios ativos da *Ipomoea 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.

3.4.2 Determinação quantitativa dos alcalóides

Porções do RAF da *I. carnea*, sob os cuidados da Dra. Mitsue Haraguchi, foram encaminhadas ao laboratório do Professor Dr. Dale Gardner do Utah State University (USDA-ARS Poisonous Plants Research Laboratory-EUA), onde foram analisadas quantitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado a espectrômetro de massas (MS).

3.4.3 Administração do resíduo aquoso final

A administração do RAF da *I. carnea* que foi diluído com água potável às fêmeas gestantes foi realizada do 6º ao 19º dia de gestação (DG), via oral por *gavage*, nas doses de 1,0 (IC1); 3,0 (IC3) e 7,0 (IC7) g/kg, para os grupos experimentais. As ratas pertencentes aos respectivos grupos *peer-feeding* (PF) e controle receberam, pela mesma via, apenas o mesmo volume de água de bebida durante o mesmo período que os diferentes grupos experimentais, sendo que o primeiro recebeu a quantidade média de ração consumida pelo grupo que recebeu a maior dose mensurada a cada três dias. As doses aqui empregadas foram estabelecidas em estudos anteriores (HUEZA, 2006) nos quais tomou-se como medida para administração a quantidade de folhas secas presentes no RAF da *Ipomoea carnea* e não a de suainsonina ou de calisteginas. Para cada partida de RAF utilizada, amostras foram enviadas aos cuidados do Dr. Dale Gardner para quantificação dos princípios ativos da planta.

3.4.4 Acasalamento e confirmação da prenhez

As fêmeas foram colocadas com os machos para o acasalamento, no período noturno (das 18:00 às 8:00 h). A confirmação de prenhez foi realizada pela presença de espermatozóide no lavado vaginal, sendo esta verificada por meio de observação microscópica do esfregaço vaginal (VICKERY; BENNETT, 1970), que foi diariamente colhido pela manhã. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi considerada como indicador do dia 0 de gestação (DG).

3.4.5 Avaliação do ganho de peso, do consumo de ração e água de ratas

As ratas foram pesadas no dia 0 de gestação para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. O consumo de ração e água, bem como o peso dos animais, foram mensurados a cada três dias, durante o período de tratamento.

3.4.6 Cesariana

No 20º DG, as fêmeas foram anestesiadas com xilazina e quetamina e logo após, foi realizada a laparotomia exploratória com exposição dos cornos uterinos, para a contagem de pontos de implantações, de reabsorções, número de fetos vivos e mortos e em seguida a retirada das placentas e dos fetos para posterior análise morfológica dos mesmos. Os ovários também foram retirados para contagem de corpos lúteos.

As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação, foram calculadas por meio da seguinte proporção:

$$\% \text{ perda pré-implantação} = (CL-IM) \times 100/CL$$

$$\% \text{ perda pós-implantação} = (IM-FV) \times 100/IM$$

onde:

CL = número de corpos lúteos;

IM = número de implantações;

FV = número de fetos vivos.

3.4.7 Coleta de sangue

Para a coleta de sangue, as ratas foram anestesiadas com xilazina e quetamina, fixadas em decúbito dorsal em uma prancha de parafina e realizou-se um corte longitudinal, desde a região pélvica até a cartilagem xifóide, coletando-se em seguida o sangue por punção intracardíaca em seringas descartáveis não heparinizadas. Após este procedimento, este material biológico foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm em centrífuga refrigerada e o sobrenadante, o soro, foi acondicionado individualmente em tubos plásticos devidamente identificados e estocados em freezer a -20°C até o processamento.

3.4.8 Dosagem bioquímica

As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), e os níveis séricos da uréia, creatinina, glicose, colesterol, albumina e proteína total (PT) dos animais experimentais, *peer-feeding* e controle foram dosados por meio de sistema automatizado, utilizando aparelho CELM SBA-200.

3.4.9 Necropsia e coleta de materiais

No 20º DG após a retirada do útero gravídico, foram removidos os filhotes e suas respectivas placentas, as quais foram mantidas em formol a 10% até o momento do processamento e também, procedeu-se à coleta dos órgãos tais como: fígado, rins e sistema nervoso central (SNC) para pesagem e logo após, coletou-se fragmentos representativos destes órgãos que foram conservados em formol a 10%, até o momento do processamento.

No 22º dia pós-parto, mães e um filhote de cada ninhada foram anestesiados com xilazina e quetamina para coleta de fragmentos representativos do fígado, rins, pâncreas e SNC que foram conservados em formol a 10%, até o momento do processamento. Nos dias 3, 7 e 14 de vida um filhote de cada mãe foi decaptado, e procedeu-se o mesmo procedimento citado acima.

3.4.10 Avaliação anatomopatológica e avaliação morfométrica dos órgãos e da placenta

Em todos os experimentos foram coletados os órgãos: SNC, fígado, rins e pâncreas, tanto das fêmeas quanto dos filhotes, para avaliação anatomopatológica de possíveis alterações. Assim como as placentas dos animais submetidos à cesariana.

3.4.10.1 *Coloração com Hematoxilina-Eosina*

Os fragmentos provenientes da coleta à necropsia foram fixados em formol a 10%; posteriormente, o material foi emblocado, cortado e corado com hematoxilina-eosina (HE), para observação de possíveis alterações à microscopia óptica. As placentas foram cortadas em pequenos fragmentos, colocadas em cassetes e fixadas em formol diluído a 10% em PBS, realizando-se procedimento idêntico àquele anteriormente descrito para coloração com HE de outros tecidos.

3.4.10.2 *Avaliação morfométrica do tecido placentário*

Para quantificação da zona juncional da placenta procedeu-se a análise morfométrica no sistema Image-Pro Plus, version 4.5 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD, USA), sendo circundadas com uma caneta eletrônica a área total do tecido placentário e a zona juncional e as respectivas áreas calculadas automaticamente pelo programa, posteriormente foi realizado o cálculo de proporção da área em estudo em relação à área total das placentas.

3.4.10.3 *Lectina-histoquímica*

A lectina-histoquímica (LHQ) consiste em realizar uma prova histoquímica que reconhece com grande especificidade resíduos de açúcares nas células e seus congêneres, desta forma, existem inúmeras lectinas no universo biológico, sendo estas proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que estão presentes tanto em animais quanto em vegetais. Para o presente estudo foram utilizadas seis lectinas que estão representadas no quadro 1 e aplicada a técnica nas placentas, as quais foram cortadas em pequenos fragmentos, colocadas em cassetes e fixadas em formol diluído a 10% em PBS, o material foi emblocado, cortado em micrótomo e colocadas em lâminas de vidro preparadas para a técnica. A análise por *score* procedeu-se por avaliação de duplo cego através de microscopia de luz, para tal foram analisados todos os campos de quatro fragmentos do tecido placentário por lâmina, o qual representa uma fêmea, sendo que foram observadas cinco lâminas por grupo. A escala do *score* varia entre 0 (não reativo) à 3 (alta intensidade).

Lectina	Acrônimo	Especificidade por Carboidrato
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNac
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	$[\beta$ -(1-4)-D-GlcNac] ² e NeuNac
<i>Succinyl- Triticum vulgaris</i>	sWGA	$[\beta$ -(1-4)-D- GlcNac] ²
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Gal- β -(1-3)-GalNac
<i>Ricinus communis</i>	RCA-1	β -D- Gal
<i>Bandeirea simplicifolia</i>	BS-1	α -D-Gal

Gal = Galactose; GalNac = N-acetil-galactosamina; Glc = Glicose; GlcNac = N-acetil-glicosamina; Man = Manose; NeuNac = N-acetil-ácido-neuroamínico

Quadro 1 - Tipos de lectinas e suas respectivas especificidades

As lâminas foram colocadas em 2 banhos de xilol por 10 minutos à temperatura ambiente para retirada da parafina, seguido de 2 banhos em álcool etílico 100% por 3 minutos cada, neste ponto os cortes foram colados em uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio à 3% por 30 minutos protegidos da luz, após serem retiradas da última solução para inativação da peroxidase endógena as lâminas seguiram em 2 banhos de álcool etílico 95% por 3 minutos cada seguido de um último banho de álcool etílico 70%. Após a passagem pelos alcoóis as lâminas foram colocadas em 3 banhos de PBS 0,01M por 3 minutos cada, logo após procedeu-se à secagem de cada lâmina com o auxílio de papel higiênico absorvente mantendo os cortes úmidos. Com os cortes ainda úmidos foi aplicado sobre estes BSA a 1% em PBS, por 30 minutos, para inativação de uniões inespecíficas, passado este tempo as lâminas foram posicionadas na câmara úmida, sendo aplicado aproximadamente 100 microlitros de cada lectina diluída para a incubação por toda a noite a 4°C ou por 2 horas em temperatura ambiente.

Terminado o período de incubação os cortes foram lavados em 3 banhos de PBS 0,01M por 5 minutos cada, sendo que as lâminas marcadas com cada lectina foram lavadas separadas uma das outras e mais uma vez os cortes foram posicionadas na câmara úmida, o excesso de PBS 0,01M ao redor dos cortes foi retirado com o auxílio de papel higiênico absorvente mantendo os cortes úmidos. Com os cortes ainda úmidos foi aplicado sobre as lâminas o complexo estreptavidina-biotina, por 30 minutos. Terminado o período de incubação os cortes foram novamente lavados em 3 banhos de PBS 0,01M por 5 minutos cada e lâminas foram individualmente separadas para a aplicação do revelador a base de diaminobenzidina (DAB). O tempo de revelação foi modulado para cada tecido com a finalidade de obter uma marcação otimizada. O aparecimento da cor amarronzada nos cortes indicou a presença de marcação positiva.

3.4.10.4 Detecção de apoptose por coloração TUNEL através de microscopia de luz

Durante a apoptose, ocorre fragmentação internucleossômica do DNA, sem especificidade de sequência, porém mais intensa na cromatina em configuração aberta, em consequência da atividade de uma endonuclease. Esta fragmentação característica do genoma pode ser identificada “in situ” pela técnica de TUNEL, assim para avaliação da presença de células apoptóticas no tecido placentário foi utilizado esta técnica com o Kit *In Situ Cell Death Detection*, POD, Roche®, segundo as normas do fabricante. A porcentagem de células apoptóticas foi calculada a partir da contagem de 1000 células da zona juncional do tecido placentário por lâmina, utilizando o sistema Image-Pro Plus, version 4.5 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD, USA), sendo considerado, como marcação positiva os núcleos acastanhados e negativa os azuis.

3.4.11 Análise dos fetos no 20º dia de gestação: avaliação de malformações ósseas e viscerais

Após a cesariana, os fetos foram contados no útero e marcadas suas posições. Em seguida, o útero foi extraído inteiro e pesado. Posteriormente, os filhotes foram retirados do útero e examinados. Assim, os fetos e suas respectivas placentas, após secagem em papel toalha, foram pesados individualmente e os filhotes mensurados quanto ao tamanho.

Para a análise óssea quatro filhotes de cada mãe foram colocados em acetona, permanecendo nesta solução por uma noite. No dia seguinte, o palato de cada animal foi examinado e realizado a evisceração. Em seguida, procedeu-se o procedimento de diafanização que constitui em colocar os fetos em uma solução de KOH 0,8%, preparada diariamente com água destilada e alizarina, conforme o

método proposto por Staples e Schenell (1964). Posteriormente, os fetos foram conservados em solução clareadora até o dia da análise esquelética, segundo Taylor (1986).

Para a análise visceral quatro filhotes de cada mãe foram colocados em solução de Harrison para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos por um período de quatro dias. Em seguida, os fetos foram colocados em álcool 80° por dois dias e, posteriormente, em álcool 90° até o dia da leitura.

3.4.12 Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal

Com o objetivo de diminuir qualquer estresse das gestantes devido à excessiva manipulação das mesmas, que poderia promover alguma alteração nos filhotes, as fêmeas foram tratadas e manuseadas até o 19º DG e depois apenas no dia seguinte ao nascimento (PND1), no qual foi realizada a pesagem geral da ninhada, juntamente com a inspeção para detectar possíveis malformações, seguida da pesagem individual de dois filhotes por ninhada (um macho e uma fêmea). Anotou-se o número de filhotes e a proporção de machos e fêmeas em cada ninhada.

Procurou-se padronizar as ninhadas em quatro machos e quatro fêmeas, sendo os demais sacrificados após análise de possíveis malformações. As ratas que tiveram um número inferior a oito filhotes foram desprezadas.

Durante a observação de todos os parâmetros do desempenho reprodutivo e dos parâmetros observados nos desenvolvimentos físico e reflexológico, o observador manuseou os animais com delicadeza e sempre se teve o cuidado de passar as mãos enluvadas pela maravalha da gaiola em seguida pela ração, antes de manusear os filhotes.

Os parâmetros utilizados para avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico da prole foram observados a partir do PND1 e foram os mesmos

propostos e definidos por Zbinden (1981), Norton (1989) e Schwarz et al. (2003). Para tanto, um macho e uma fêmea, foram aleatoriamente escolhidos e identificados cortando-se a ponta da cauda com uma lâmina de bisturi quente. Apenas os animais marcados foram manipulados nestes procedimentos, realizados diariamente até a verificação de cada parâmetro.

A – Desenvolvimento físico

a) Aparecimento dos pêlos: o período provável de aparecimento de pêlos compreende do 5° ao 8° dias de vida. Se diferem da penugem, que aparece logo no 1° ou 2° dia após o nascimento, pelo comprimento. Foi observado nos filhotes a partir do 2° dia de vida.

b) Desdobramento das orelhas: este parâmetro ocorre geralmente entre o 2° e 3° dias de vida. Foi observado a partir do 2° dia de vida pós-natal.

c) Erupção dos dentes: foi observado a partir do 3° dia de vida, sendo que geralmente, este parâmetro aparece do 3° ao 8° dia de vida pós-natal.

d) Abertura dos olhos: este parâmetro geralmente ocorre entre o 12° e 16° dias de vida, e foi observado a partir do 10° dia, sendo considerado o dia da abertura quando da observação de uma fissura longitudinal nas pálpebras.

e) Abertura dos ouvidos: foi considerado como abertura dos ouvidos quando se visualizou um orifício que corresponde ao ducto auditivo. Esse parâmetro foi observado a partir do 10° dia de vida. Geralmente ocorre por volta do 12° e 15° dias de vida pós-natal.

B – Desenvolvimento reflexológico

a) Reflexo postural: este parâmetro é observado ao se colocar o filhote em posição de decúbito dorsal sobre uma área plana e este responde virando o corpo

para a posição de decúbito ventral, apoiando-se nas quatro patas. Foi observado do 4º ao 9º dias de vida por um período máximo de 30 segundos.

b) Geotaxia negativa: é realizada colocando-se o animal sobre uma plataforma com inclinação de 45° e posicionando-se o filhote com a cabeça voltada para a base. Mede-se o tempo de latência para o animal dar uma volta de 180° e ficar na posição oposta. Para que se considere este reflexo, é necessário que este tempo de latência seja inferior a 30 segundos. Este parâmetro foi observado a partir do 5º dia de vida (Figura 3).

c) Andar adulto: este parâmetro foi observado a partir do 10º dia de vida pós-natal até o momento que o animal passasse a andar com as quatro patas sem encostar o ventre na superfície. Geralmente ocorre entre o 12º e 15º dias de vida.

d) Reflexo de sobressalto: este parâmetro foi observado a partir do 10º dia de vida pós-natal e consiste em colocar o filhote dentro de um béquer contendo maravalha, sendo neste momento realizado um ruído acima do béquer, porém sem tocar o animal e a observação de alguma resposta corporal.

Figura 3 - Plataforma utilizada para avaliação da geotaxia negativa

3.5 Delineamento experimental

3.5.1 Avaliação da administração do RAF da *I. carnea* a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e feto durante o período pré-natal

Foram utilizadas 49 fêmeas prenhes que foram acasaladas conforme descrito no item 3.4.5. No DG 0, estas fêmeas foram pesadas e divididas em cinco grupos: um controle (n=10), três experimentais, que receberam o RAF da *I. carnea* na dose de 1,0 g/kg (n=12), 3,0 g/kg (n=11) e 7,0 g/kg (n=11) e um *peer-feeding* (n=5). Cada animal dos diferentes grupos experimentais recebeu, diariamente, por *gavage*, as doses de 1,0; 3,0; 7,0 g/kg de folha seca da *Ipomoea carnea* presente no RAF do 6° ao 19° DG (item 3.4.3). As ratas pertencentes ao grupo controle e *peer-feeding* receberam, apenas água pela mesma via e período.

Durante o período gestacional foram verificados o estado geral dos animais e a ocorrência de abortos. O peso das fêmeas foi aferido nos dias 0, 6, 9, 12, 15, 18 de gestação, enquanto que o consumo de ração foi analisado nos períodos, em dias, de 6-9, 9-12, 12-15, 15-18 de prenhez.

No 20° DG, estes animais foram anestesiados e submetidos à cesariana, conforme descrito no item 3.4.6, neste momento procedeu-se a coleta de sangue (item 3.4.7) para dosagem bioquímica (item 3.4.8) e a coleta de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 3.4.10). Foi realizada a exposição dos cornos uterinos, para a contagem de pontos de implantações, de reabsorções, número de fetos vivos e mortos e em seguida a retirada das placentas e dos fetos para posterior análise morfológica dos mesmos. Os ovários também foram retirados para contagem de corpos lúteos, conforme descrito no item 3.4.6.

Após a cesariana, os fetos foram contados no útero e marcadas suas posições. Em seguida, o útero foi extraído inteiro e pesado. Posteriormente, os

filhotes foram retirados do útero e examinados. Assim, os fetos e suas respectivas placentas, após secagem em papel toalha, foram pesados individualmente e os filhotes mensurados quanto ao tamanho e encaminhados para análise óssea e visceral (item 3.4.11).

3.5.2 Avaliação da administração do RAF da *I. carnea* a ratas gestantes: estudo do tecido placentário

Foram utilizadas as placentas provenientes do experimento acima citado, as quais, logo após a cesariana foram pesadas, sendo que destas foram escolhidas aleatoriamente apenas cinco fêmeas de cada grupo, que tiveram suas placentas encaminhadas para análise histopatológica e morfométrica (item 3.4.10).

3.5.3 Avaliação da administração do RAF da *I. carnea* a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e prole durante o período pós-natal

Foram utilizadas 40 fêmeas prenhes que foram acasaladas conforme descrito no item 3.4.5. No DG0, estas fêmeas foram pesadas e divididas em quatro grupos: um controle (n=9) e três experimentais, que receberam o RAF da *Ipomoea carnea* na dose de 1,0 g/kg (n=12), 3,0 g/kg (n=11) e 7,0 g/kg (n=8). Cada animal dos diferentes grupos experimentais recebeu, diariamente, por *gavage*, as doses de 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg de folha seca da *Ipomoea carnea* presente no RAF do 6° ao 19° DG (item 3.4.3). As ratas pertencentes ao grupo controle receberam apenas água pela mesma via e período.

Durante o período gestacional foram verificados o estado geral dos animais e a ocorrência de abortos. O peso das fêmeas foi aferido nos dias 0, 6, 9, 12, 15, 18 de gestação, enquanto que o consumo de ração foi analisado nos períodos, em dias, de 6-9, 9-12, 12-15, 15-18 de prenhez.

No dia seguinte ao nascimento (PND1), fez-se a pesagem geral da ninhada, procurando-se padronizar as ninhadas em quatro machos e quatro fêmeas, conforme descrito no item 3.4.12. Nos dias 1, 3, 7 e 14 de vida, registrou-se o número de filhotes por ninhada, o peso das ninhadas e dos filhotes machos e fêmeas, calculando-se o ganho de peso das proles. Os parâmetros referentes ao estudo do desenvolvimento físico e reflexológico foram também observados diariamente, anotando-se o dia exato de seu surgimento, conforme descrito no item 3.4.12.

No 22º dia pós-parto (PND21), mães e um filhote de cada ninhada foram anestesiados com xilazina e quetamina para coleta de fragmentos representativos de fígado, rins, pâncreas e SNC que foram conservados em formol a 10%, até o momento do processamento. Nos dias 3, 7 e 14 de vida um filhote de cada mãe foi decaptado, e procedeu-se o mesmo procedimento citado acima.

3.5.4 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 significativas as análises que apresentaram nível de

significância $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e os dados de porcentagem estão expressos como mediana (mínimo – máximo).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação de alguns princípios ativos presentes na *I. carnea*

O cromatograma das amostras do RAF da planta indicou a presença de 0,14% de suainsonina, 0,07% de calistegina B₂, 0,03% de calistegina B₁ e 0,03% de calistegina C₁. A partir destes valores, e levando-se em conta que as folhas possuem 75% de umidade, concluímos, de acordo com as tabelas 1 e 2, a real concentração em miligramas do RAF por quilo de peso corpóreo do animal, dos alcalóides suainsonina e calisteginas B₁, B₂ e C₁, nas pré-estimadas doses de 1,0, 3,0 e 7,0 g/kg/dia.

Tabela 1 - Proporção dos princípios ativos (em mg/kg/dia), contidos nas diferentes doses do RAF da *I. carnea* coletada em maio de 2004, em Pirassununga, SP. Estes valores foram calculados a partir da matéria seca proveniente das folhas frescas da planta

	1,0 g/kg	3,0 g/kg	7,0 g/kg
Suainsonina	0,25	0,76	1,78
Calistegina B1	0,07	0,22	0,50
Calistegina B2	0,19	0,60	1,33
Calistegina C1	0,05	0,15	0,35

Tabela 2 - Proporção dos princípios ativos (mg/kg/dia), contidos nas diferentes doses do RAF da *I. carnea* coletada em maio de 2007, em Pirassununga, SP. Estes valores foram calculados a partir da matéria seca proveniente das folhas frescas da planta

	1,0 g/kg	3,0 g/kg	7,0 g/kg
Suainsonina	0,28	0,84	1,96
Calistegina B1	0,08	0,24	0,56
Calistegina B2	0,21	0,63	1,47
Calistegina C1	0,05	0,15	0,35

4.2 Avaliação da administração do RAF da *I. carnea* a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e feto durante o período pré-natal

A tabela 3 mostra o consumo total de ração e água avaliado do 6º ao 18º dia de gestação (DG) de fêmeas tratadas com as diferentes doses do RAF de *I. carnea* do 6º ao 19º DG e de fêmeas pertencentes ao grupo *peer-feeding* em relação ao grupo controle. A análise de variância ANOVA, empregada para avaliar possíveis diferenças entre os grupos, não foi capaz de detectar qualquer diferença significativa entre os mesmos.

A tabela 4 mostra e a figura 4 ilustra o ganho de peso total avaliado do 6º ao 20º DG de fêmeas tratadas ou não com a planta do 6º ao 19º DG. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos ($F=9,35$; $df=4/44$; $p<0,01$). O teste de Dunnett mostrou diminuição significativa no ganho de peso total de fêmeas que receberam a maior dose do RAF da *I. carnea* durante o período gestacional, quando comparado aos animais do grupo controle.

Quanto ao peso relativo dos órgãos das fêmeas gestantes tratadas ou não com a planta durante a gestação, não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 5).

A tabela 6 mostra e a figura 5 ilustra o nível sérico de proteína total de fêmeas tratadas do 6º ao 19º DG com as diferentes doses do RAF da *I. carnea* e de fêmeas pertencentes ao grupo *peer-feeding*. A análise de variância mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F=13,95$; $df=4/31$; $p<0,0001$). A aplicação subsequente do teste de Dunnett mostrou diminuição significativa no nível sérico de proteína total de fêmeas dos grupos IC3 e IC7, quando comparado com os animais do grupo controle.

A tabela 6 mostra e a figura 5 ilustra o nível sérico de albumina de fêmeas tratadas do 6º ao 19º DG com as diferentes doses do RAF da *I. carnea*, bem como o de fêmeas pertencentes ao grupo *peer-feeding*. A aplicação da análise de variância mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F=15,77$; $df=4/31$; $p<0,001$) e a análise estatística utilizada a seguir detectou diminuição significativa no nível sérico

de albumina de fêmeas dos grupos IC3 e IC7 , quando comparado com os animais do grupo controle.

A tabela 6 mostra e a figura 5 ilustra o nível sérico de uréia de fêmeas tratadas ou não com a planta durante o 6º ao 19º DG e de fêmeas pertencentes ao grupo *peer-feeding*. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos ($F=12,60$; $df=4/31$; $p<0,001$). Quando aplicou-se o teste de Dunnett este revelou diminuição significativa no nível sérico de uréia de fêmeas dos grupos IC3 e IC7, em relação ao grupo controle.

A tabela 6 mostra e a figura 5 ilustra o nível sérico de creatinina de fêmeas tratadas, ou não, durante o 6º ao 19º DG com as diferentes doses do RAF da *I. carnea*, bem como o de fêmeas pertencentes ao grupo *peer-feeding*. A análise de variância indicou diferenças significantes entre os grupos ($F=9,24$; $df=4/31$; $p<0,001$). Ao aplicar-se o teste estatístico subsequente verificou-se aumento significativo no nível sérico de creatinina das fêmeas do grupo *peer-feeding*, quando comparado com aquele obtido dos animais do grupo controle.

A aplicação do teste estatístico, comparando-se os valores da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), bem como nos níveis séricos da creatinina, glicose e colesterol obtidos fêmeas provenientes dos diferentes grupos, mostrou não haver diferença significativa entre os mesmos (Tabela 6).

A tabela 7 ilustra os resultados obtidos do estudo do desempenho reprodutivo entre os grupos tratados ou não com a planta do 6º ao 19º DG. A análise de variância mostrou não haver diferenças significantes.

Algumas ninhadas provenientes de fêmeas gestantes que receberam o RAF da planta revelaram alterações nas articulações das patas, as quais se apresentaram hiper-flexionadas. Além disso, verificou-se que alguns filhotes, cujas mães receberam a maior dose do RAF da planta, apresentavam hidropsia e também micrognatismo. Sendo estes animais encaminhados para a análise óssea e visceral.

A tabela 8 mostra o resultado relativo ao exame esquelético dos fetos provenientes de ratas tratadas ou não com a planta do 6º ao 19º DG. Assim, pode-se verificar que houve apenas um feto afetado por malformações ósseas proveniente de uma rata pertencente ao grupo IC7. Esta tabela apresenta também as porcentagens de variações esqueléticas por feto e por ninhada; assim como os tipos de variações esqueléticas por feto tais como: variações de costela e esternóbrio. A análise de variância ANOVA não detectou qualquer diferença entre os grupos.

Em relação ao exame visceral, verificou-se que não houve o aparecimento malformações viscerais, bem como também não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes nas variações viscerais observadas nos fetos provenientes de fêmeas tratadas ou não com a planta do 6º ao 19º DG quando comparado ao grupo controle. O teste estatístico empregado revelou não haver diferenças significantes nos fetos e nas ninhadas com variações viscerais (Tabela 9)

Em relação às possíveis lesões macroscópicas resultantes da ingestão do RAF da *I. carnea* nas ratas, à necropsia, não se observou nenhuma alteração digna de nota, nos diferentes órgãos avaliados.

Por outro lado, pode-se verificar efeitos tóxicos na histopatologia. Assim, a figura 6 ilustra os achados histopatológicos de ratas que durante a gestação foram tratadas com diferentes doses do RAF da *I. carnea* do 6º ao 19º DG. Especial enfoque foi atribuído aos efeitos observados nos animais que receberam a maior dose de RAF (7,0 g/kg), sendo que estes apresentaram vacuolização citoplasmática nas células do tecido hepático e renal.

Tabela 3 - Consumo total de ração (em gramas) e consumo total de água (em mL) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=10) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=11) ^a	PF (n=5) ^a
Consumo total de ração (g)	256,0±8,1	252,6±8,5	246,0±9,5	225,4±12,4	—
Consumo total de água (mL)	546,0±13,6	531,8±30,6	553,2±31,5	549,8±42,8	528,0±20,5

^a número de animais; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF

Tabela 4 - Ganho de peso total (em gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=10) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=11) ^a	PF (n=5) ^a
Ganho de peso total (g)	29,0±4,42	27,2±2,76	25,8±2,45	8,8±2,48***	27,5±4,44

^a número de animais; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF

** p<0,01 *versus* grupo controle; teste de Dunnett

Figura 4 - Ganho de peso total (em gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF. *** $p < 0,001$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 5 - Peso relativo dos órgãos (em gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=8) ^a	1,0 g/kg (n=9) ^a	3,0 g/kg (n=6) ^a	7,0 g/kg (n=9) ^a	PF (n=5) ^a
SNC (g)	0,77±0,02	0,76±0,02	0,76±0,01	0,83±0,02	0,77±0,77
Fígado (g)	4,65±0,15	5,16±0,18	4,29±0,78	5,06±0,12	5,07±0,12
Rim direito (g)	0,36±0,01	0,37±0,01	0,39±0,01	0,36±0,01	0,38±0,01
Rim esquerdo (g)	0,35±0,01	0,38±0,01	0,37±0,01	0,37±0,01	0,37±0,01

^a número de animais; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF; teste de Dunnett

Tabela 6 - Bioquímica sérica de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6º ao 19º DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=10) ^a	1,0 g/kg (n=9) ^a	3,0 g/kg (n=5) ^a	7,0 g/kg (n=7) ^a	PF (n=5) ^a
AST (U/L)	185,7±18,9	167,0±11,3	121,0±15,6	171,4±25,1	131,3±22,6
FA (U/L)	148,5±12,6	184,6±29,4	142,6±11,4	146,2±6,84	130,0±6,72
ALT (U/L)	55,4±5,0	49,9±2,78	37,9±2,76	42,2±5,06	35,0±2,18
GGT (U/L)	1,02±0,47	1,06±0,16	0,76±0,37	1,54±0,30	5,21±3,51
Glicose (mg/dL)	111,8±13,5	130,7±13,1	141,1±12,8	137,7±7,21	125,3±7,41
Colesterol (mg/dL)	65,1±5,12	62,1±4,90	51,3±4,56	57,6±5,04	51,6±8,77
Uréia (mg/dL)	39,5±1,78	37,4±1,73	31,7±2,24*	26,7±1,95***	46,4±2,00
Creatinina (mg/dL)	0,78±0,10	0,74±0,03	0,65±0,10	0,72±0,04	1,34±0,05*
Proteína total (g/dL)	5,94±0,20	5,51±0,12	4,27±0,30***	4,46±0,16***	5,53±0,17
Albumina (g/dL)	2,96±0,09	2,92±0,06	2,17±0,13***	2,24±0,07***	2,74±0,09

^a número de animais; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *versus* grupo controle; teste de Dunnett

Figura 5 - Nível sérico de proteína total, albumina e uréia de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6º ao 19º DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. PF= *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ *versus* grupo controle; teste de Dunnet

Tabela 7 - Desempenho reprodutivo de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão e as mediana (mínimo – máximo)

	Controle (n=10) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=11) ^a	PF (n=5) ^a
PM	300,6±8,6	296,7±7,6	303,4±5,2	283±7,5	293,7±7,6
PU	60,3±3,04	58,8±2,73	57,8±4,67	64,5±2,62	47,3±2,76
PM-U	240,3±7,32	238±5,86	239,2±3,92	220,4±5,96	246,3±7,74
PP	0,44±0,01	0,45±0,01	0,44±0,01	0,44±0,02	0,44±0,01
PF	3,52±0,08	3,51±0,06	3,57±0,07	3,38±0,07	3,46±0,10
CF	3,66±0,01	3,63±0,02	3,62±0,02	3,56±0,03	3,54±0,05
NFv	10,4±0,47	10,58±0,41	11,45±0,54	11,63±0,51	9,00±0,63
SI	100 (69,2-100)	100 (83,4-100)	100 (73,3-100)	100 (80-100)	90,91 (64,30-100)
Fv	89,9 (75-100)	90,91 (71,4-100)	93,3 (81,8-100)	91,6 (76,9-100)	100 (88,9-100)
Pré-I	0 (0-30,76)	0 (0-16,6)	0 (0-26,6)	0 (0-20)	0 (0-35,7)
Pós-I	10,1 (0-25)	9,09 (0-28,57)	6,6 (0-18,18)	8,33 (0-23,07)	0 (0-11,1)

^a número de animais; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF

PM= peso materno no 20ºDG (g); PU= peso do útero (g); PM-U= peso materno – peso do útero (g); PP= peso placentário por ninhada (g); PF= peso fetal por ninhada (g); CF= comprimento fetal por ninhada (g); NFv= número de fetos vivos por ninhada; SI= sítios de implantação por ninhada (%); Fv= porcentagem de fetos vivo por ninhada (%); Pré-I= perda pré-implantação por ninhada (%); Pós-I= perda pós-implantação por ninhada (%)

Tabela 8 - Exame esquelético dos fetos provenientes das ratas tratadas ou não com a planta, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados o número total de fetos e ninhadas avaliadas e a porcentagem relativa à proporção de fetos e ninhadas acometidas

	Controle	7,0 g/kg	PF
Malformações esqueléticas por feto (%)	0(31) ^a 0%	1(44) ^a 2,3%	0(17) ^a 0%
Malformações esqueléticas por ninhada (%)	0(8) ^b 0%	1(11) ^b 9,1%	0(5) ^b 0%
Variações esqueléticas por feto (%)	16(31) ^a 51,6%	32(44) ^a 72,7%	12(17) ^a 70,6%
Variações esqueléticas por ninhada (%)	7(8) ^b 87,5%	11(11) ^b 100%	5(5) ^b 100%
Costela ondulada por feto (%)	2(31) ^a 6,4%	2(44) ^a 4,5%	0(17) ^a 0%
13ª costela reduzida por feto (%)	0(31) ^a 0%	1(44) ^a 2,3%	0(17) ^a 0%
Esternébrio rudimentar por feto (%)	7(31) ^a 22,6%	9(44) ^a 20,4%	8(17) ^a 47,0%
Esternébrio assimétrico por feto (%)	7(31) ^a 22,6%	20(44) ^a 45,4%	2(17) ^a 11,7%
Esternébrio atrofiado por feto (%)	6(31) ^a 19,3%	8(44) ^a 18,2%	3(17) ^a 17,6%
Esternébrio bipartido por feto (%)	0(31) ^a 0%	1(44) ^a 2,3%	0(17) ^a 0%

^a número de fetos analisados por grupo; ^b número de ninhadas avaliadas; o número de fetos acometidos está representado fora do parênteses; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF; teste de Dunnett

Tabela 9 - Exame visceral dos fetos proveniente das ratas tratadas ou não com a planta, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados o número total de fetos e ninhadas avaliadas e a porcentagem relativa à proporção de fetos e ninhadas acometidas

	Controle	7,0 g/kg	PF
Malformações viscerais por ninhada (%)	0(10) ^b 0%	0(10) ^b 0%	0(5) ^b 0%
Variações viscerais por feto (%)	1(44) ^a 2,2%	7(50) ^a 14%	3(19) ^a 15,8%
Variações viscerais por ninhada (%)	1(10) ^b 10%	4(10) ^b 40%	2(5) ^b 40%
Ureter sinuoso por feto (%)	1(44) ^a 2,2%	2(50) ^a 4%	2(19) ^a 10,5%
Hemorragia peritoneal por feto (%)	0(44) ^a 0%	5(50) ^a 10%	1(19) ^a 5,2%

^a número de fetos analisados por grupo; ^b número de ninhadas avaliadas; o número de fetos acometidos está representado fora do parênteses; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF; teste de Kruskal-Wall

Figura 6 - Corte histológico de fígado de rata do grupo controle (A) e rata exposta durante a gestação à maior dose do RAF da *I. carnea* (B), observar discreta degeneração vacuolar citoplasmática. H.E. (40x). Corte histológico de rim de rata do grupo controle (C) e rata exposta à maior dose do RAF da *I. carnea* (D), observar a presença de vacúolos citoplasmáticos de forma difusa em túbulos renais da região cortical. H.E. (20x)

4.3 Avaliação da administração do RAF da *I. carnea* a ratas gestantes: estudo do tecido placentário

A Figura 7 ilustra os achados histopatológicos do tecido placentário de ratas que durante a gestação foram tratadas com diferentes doses do RAF da *I. carnea*. Especial enfoque foi atribuído aos efeitos observados nas placentas daqueles animais provenientes do grupo IC7, no qual, pôde-se observar um espessamento do labirinto e uma diminuição da espessura da camada juncional. Esta última alteração relatada pôde ser confirmada através de análise morfométrica desta área, a qual se mostrou aproximadamente 4% reduzida quando comparada com as placentas dos animais do grupo controle, utilizando-se para análise o sistema Image-Pro Plus, version 4.5 (Tabela 10), porém a análise de variância ANOVA, empregada para avaliar possíveis diferenças entre os grupos, não foi capaz de detectar qualquer diferença significativa entre os mesmos.

A tabela 11 mostra a intensidade de ligação de diferentes lectinas às células do tecido placentário de ratas tratadas com 0,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6º ao 19º DG. As lectinas utilizadas foram: PN A, sWGA, WGA, DBA, RCA-1 e BS-1, a avaliação da intensidade de reação das lectinas em cada lâmina foi realizada por *score*. Foi possível verificar que, com exceção dos açúcares ligados pelas lectinas PNA no labirinto (R2), sWGA na placa coriônica (R3), WGA também na placa coriônica (R3), DBA no labirinto (R2) e RCA-1 e BS-1 em todas as zonas estudadas, o tratamento com o RAF promoveu diferentes graus de acúmulos de açúcares nas diferentes zonas placentárias, os quais não foram observados com a mesma intensidade no tecido placentário de fêmeas do grupo controle.

A tabela 12 mostra a porcentagem de células apoptóticas calculada a partir da contagem de 1000 células da camada juncional do tecido placentário por lâmina, utilizando o sistema Image-Pro Plus, version 4.5 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD, USA), sendo considerado como marcação positiva os núcleos acastanhados e negativa os azuis. O teste Kruskal-Wallis, empregado para avaliar possíveis diferenças entre os grupos, não foi capaz de detectar qualquer diferença significativa entre os mesmos.

Figura 7 - Corte histológico de placenta de rata do grupo controle (A) e rata exposta durante a gestação à maior dose do RAF da *I. carnea* (B), observar o espessamento do labirinto (HE, 10x). Corte histológico de placenta de rata do grupo controle (C) e rata exposta à maior dose do RAF da *I. carnea* (D), observar a diminuição da espessura da camada juncional (HE, 4x)

Tabela 10 - Análise morfométrica do tecido placentário de ratas prenhes tratadas com 0,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentadas as medianas (mínimo – máximo)

	Controle (n=5) ^a	7,0 g/kg (n=5) ^a	PF (n=5) ^a
Área da camada juncional (%)	17,40 (14,4- 21,3)	13,04 (9,3- 15,5)	15,64 (10,7-19,5)

^a número de animais; PF = *peer-feeding*, grupo de animais que receberam a mesma quantidade média de ração que aqueles do grupo tratado com a maior dose de RAF; teste de Kruskal-Wallis

Tabela 11 - Intensidade de ligação das lectinas com as células da placenta de ratas prenhes tratadas com 0,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. As lectinas utilizadas foram: PNA, sW GA, WGA, DBA, RCA-1 e BS-1, a avaliação da intensidade de reação das lectinas em cada lâmina foi realizada por *score*

Lectinas	R1	R2	R3
PNA	2 (0)	0 (0)	3 (2)
sWGA	1 (0)	2 (0)	0 (0)
WGA	3 (1)	2 (1)	2 (2)
DBA	1 (0)	0 (0)	3 (2)
RCA-1	2 (2)	1 (1)	2 (2)
BS-1	3 (3)	1 (1)	1 (1)

A escala do *score* varia entre 0 (não reativo) à 3 (alta intensidade). *Score* de tecido placentário de ratas do grupo controle representados entre parênteses e *score* atribuído para corte histológicos placentário de mães tratadas com RAF. R1= zona juncional; R2= labirinto e R3= placa corônica

Tabela 12 - Porcentagem de células apoptóticas na camada juncional da placenta de ratas prenhes tratadas com 0,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as medianas e o s valores mínimos e máximos

	Controle (n=5) ^a	7,0 g/kg (n=5) ^a
Células apoptóticas na camada juncional (%)	73,5 (58,7- 84,6)	77,4 (62,1- 84,4)

^a número de animais; teste de Mann Whitney

4.4 Avaliação da administração do RAF da *I. carnea* a ratas gestantes: estudo dos efeitos, na mãe e prole durante o período pós-natal

A tabela 13 mostra o ganho de peso total avaliado do 6º ao 18º DG de fêmeas tratadas com as diferentes doses do RAF da *I. carnea* do 6º ao 19º DG. A análise de variância ANOVA, empregada para avaliar possíveis diferenças entre os grupos, não foi capaz de detectar qualquer diferença significativa entre os mesmos. De maneira semelhante o mesmo teste estatístico também não foi capaz de evidenciar diferenças estatísticas significantes entres os grupos tratados ou não com a planta quanto ao consumo total de ração e água (Tabela 13).

A tabela 14 mostra e a figura 8 ilustra os resultados obtidos do estudo do desempenho reprodutivo entre os grupos tratados ou não com a planta do 6º ao 19º DG. A análise de variância mostrou haver diferenças significantes entre os grupos no peso do filhote macho ($F=2,947$; $df=3/36$; $p<0,05$) e peso do filhote fêmea ($F=2,931$; $df=3/36$; $p<0,05$) no PND1. O teste Dunnett mostrou diminuição no peso do filhote macho e fêmea por ninhada provenientes do grupo IC7, quando comparado aos animais do grupo controle.

Nos parâmetros: tempo de prenhez, número total de filhotes, número de filhotes machos, número de filhotes fêmeas, peso total das ninhadas, peso dos oito filhotes escolhidos aleatoriamente por ninhada e morte perinatal no PND1, a análise estatística revelou não haver diferenças significantes (Tabela 14).

Algumas ninhadas provenientes de fêmeas gestantes que receberam a dose intermediária da planta revelaram alterações nas articulações das patas, as quais se apresentaram hiper-flexionadas. Os animais que sobreviveram, apresentaram regressão deste quadro, sendo que nos testes subseqüentes nada foi revelado.

Para avaliação dos dados referentes ao estudo dos parâmetros físicos e reflexológicos foi escolhido um filhote macho e uma fêmea por ninhada como representante de cada prole. A tabela 15 mostra os dados referentes ao peso e o ganho de peso do filhote macho e fêmea respectivamente, do PND1 ao PND21, a análise estatística revelou não haver diferenças significantes.

A tabela 16 mostra e a figura 9 ilustra, respectivamente, os parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico do filhote macho e fêmea das ratas tratadas do 6º ao 19º DG, por *gavage*, com diferentes doses do RAF da *I. carnea*. A análise de variância mostrou haver diferenças significantes entre os grupos apenas na geotaxia negativa do filhote fêmea ($F=5,489$; $df=3/36$; $p<0,01$). O teste Dunnett mostrou retardo na geotaxia negativa do filhote fêmea, proveniente do grupo IC7 em relação ao grupo controle.

Em relação às possíveis lesões macroscópicas resultantes da ingestão do RAF da *I. carnea* nas ratas e suas respectivas proles, à necropsia, não se observou nenhuma alteração digna de nota, nos diferentes órgãos avaliados.

Por outro lado, a Figura 10 ilustra os achados histopatológicos da prole exposta durante o período gestacional do 6º ao 19º DG ao RAF da *I. carnea*, em diferentes doses. Especial enfoque foi atribuído aos efeitos observados nos animais dos grupos IC3 e IC7, no qual foi observada discreta degeneração vacuolar nos tecidos das proles provenientes do PND7. Este aspecto foi observado nas células do tecido hepático e renal. Estas alterações também foram observadas no PND14 e PND21, porém com menor intensidade.

Tabela 13 - Ganho de peso total (em gramas) e consumo de água (mL) e ração (g) totais de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=9) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=8) ^a
Ganho de peso total (g)	54,9±3,86	52,7±4,94	51,4±3,22	44,6±2,26
Consumo total de ração (g)	275,1±3,27	266,4±9,27	259,6±7,18	249,8±6,68
Consumo total de água (mL)	636,7±43,4	626,3±24,1	597,7±25,6	677,1±44,0

^a número de animais; teste de Dunnett

Tabela 14 - Desempenho reprodutivo de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=9) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=8) ^a
DP	22,8±0,15	22,7±0,14	22,7±0,14	22,9±0,12
NFt	10,3±0,57	11,6±0,38	10,2±0,55	10,1±0,58
NF♂	4,9±0,67	6,4±0,41	5,1±0,41	4,1±0,48
NF♀	5,4±0,83	5,0±0,35	5,1±0,54	6,0±0,73
PN1	69,3±2,86	72,1±2,57	62,8±3,97	59,6±3,35
P♂1 ^b	7,2±0,23	6,6±0,23	6,5±0,19	6,2±0,23*
P♀1 ^b	6,6±0,15	6,1±0,24	6,1±0,18	5,6±0,23*
P8	53,5±1,26	49,6±1,57	50,1±2,04	47,4± 1,43
MP	0,0±0,0	0,25±0,18	0,41± 0,33	0,0±0,0

^a número de animais

^b Foram pesados apenas um filhote macho ou fêmea por ninhada

* p<0,05 *versus* grupo controle; teste de Dunnett

DP= duração da prenhez (dias); NFt= número total de filhotes por ninhada; NF♂= número de filhotes machos por ninhada; NF♀= número de filhotes fêmeas por ninhada; PF= peso total das ninhadas no dia 1 de vida (g); P♂1= peso do filhote macho no dia 1 de vida (g); P♀1= peso do filhote fêmea no dia 1 de vida (g); P8= peso dos oito filhotes no dia 1 de vida (g); MP= morte perinatal

Figura 8 - Desempenho reprodutivo de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por gavagem, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. * $p < 0,05$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 15 - Peso e ganho de peso do filhote macho e da fêmea do PND1 ao PND21 de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=9) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=8) ^a
P♂7	17,4±0,68	16,4±0,32	16,4±0,43	15,6±0,46
P♀7	15,8±0,35	16,0±0,50	15,4±0,44	14,5±0,51
P♂14	35,3±1,05	32,8±0,97	33,3±0,94	32,1±0,64
P♀14	32,1±0,54	31,8±1,14	31,6±0,82	30,6±0,55
P♂21	55,7±1,46	51,6±1,01	52,6±1,29	51,8±1,27
P♀21	51,1±0,91	49,9±1,42	49,3±1,17	48,1±0,93
GP♂1-7	11,3±1,04	11,3±0,92	10,3±0,49	10,7±0,98
GP♀1-7	9,58±0,36	9,90±0,26	9,21±0,29	8,81±0,33
GP♂7-14	17,8±0,48	16,0±0,88	16,9±0,69	16,5±0,22
GP♀7-14	16,2±0,27	15,9±0,84	16,2±0,51	16,1±0,38
GP♂14-21	21,0±0,76	19,3±0,81	19,5±1,06	19,7±0,84
GP♀14-21	19,3±0,29	18,0±1,13	17,6±0,87	17,5±0,83

^a número de animais; teste de Dunnett

P♂7 e P♀7= peso do filhote macho e fêmea no PND7 por ninhada; P♂14 e P♀14= peso do filhote macho e fêmea no PND14 por ninhada; P♂21 e P♀21= peso do filhote macho e fêmea no PND21 por ninhada; GP♂1-7 e GP♀1-7= ganho de peso do filhote macho e fêmea do PND1 ao PND7 por ninhada; GP♂7-14 e GP♀7-14= ganho de peso do filhote macho e fêmea do PND7 ao PND14 por ninhada; GP♂14-21 e GP♀14-21= ganho de peso do filhote macho e fêmea do PND14 ao PND21 por ninhada

Tabela 16 - Paramêtros de desenvolvimento físico e reflexológico (em dia de aparecimento) dos filhotes machos e fêmeas de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6º ao 19º DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão

	Controle (n=9) ^a	1,0 g/kg (n=12) ^a	3,0 g/kg (n=11) ^a	7,0 g/kg (n=8) ^a
AP ♂	4,66±0,16	4,58±0,15	4,82±0,12	5,0±0,0
♀	4,66±0,16	4,58±0,15	4,82±0,12	5,0±0,0
DO ♂	2,33±0,16	2,58±0,14	2,45±0,15	2,25±0,25
♀	2,33±0,16	2,75±0,21	2,45±0,15	2,25±0,25
ED ♂	7,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0
♀	7,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0
AOU ♂	11,9±0,20	12,1±0,19	11,9±0,21	11,7±0,16
♀	11,9±0,20	11,8±0,24	11,5±0,28	11,7±0,16
AO ♂	13,4±0,24	12,6±0,33	13,2±0,32	12,4±0,32
♀	13,4±0,17	13,6±0,31	13,6±0,20	13,6±0,18
GEO ♂	7,44±0,62	9,08±0,49	9,09±0,61	9,37±0,53
♀	6,89±0,61	9,33±0,49*	10,0±0,46**	9,12±0,74*
AA ♂	13,2±0,27	13,4±0,14	13,6±0,24	13,6±0,26
♀	13,2±0,27	13,6±0,14	13,5±0,15	13,5±0,19
RP ♂	4,22±0,15	4,25±0,13	4,18±0,12	4,37±0,18
♀	4,55±0,24	4,41±0,26	4,18±0,12	4,75±0,25
RS ♂	12,3±0,16	12,2±0,18	12,3±0,20	12,2±0,25
♀	12,2±0,14	12,3±0,14	12,2±0,18	12,2±0,25

^a número de animais

*p<0,05; **p<0,01 *versus* grupo controle; teste de Dunnett

AP= aparecimento de pêlos; DO= desdobramento das orelhas; ED= erupção dos dentes incisivos; AOU= abertura dos ouvidos; AO= abertura dos olhos; GEO= geotaxia negativa; AA= andar adulto; RP= reflexo postural; RS= reflexo de sobressalto

Figura 9 - Geotaxia negativa (em dia de aparecimento) dos filhotes fêmeas de ratas prenhes tratadas com 0,0; 1,0; 3,0 e 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea*, por *gavage*, do 6° ao 19° DG. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Figura 10 - Corte histológico de fígado de filhote controle no PND7 (A) e filhote exposto durante a gestação a dose de 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea* (B), observar discreta degeneração vacuolar em hepatócitos. H.E. (40x). Corte histológico de rim de filhote controle no PND7 (C) e filhote exposto durante a gestação as doses de 7,0 g/kg do RAF da *I. carnea* (D), observar discreta degeneração vacuolar em epitélio de túbulo cortical. H.E. (20x)

Discussão

5 DISCUSSÃO

Embora muitos estudos venham sendo realizados procurando melhor verificar os efeitos tóxicos da *I. carnea* e, particularmente, da suainsonina, o principal composto ativo tóxico desta planta, pouco se sabe sobre os efeitos destes na reprodução. Assim, já há alguns anos, pesquisas vêm sendo realizadas neste laboratório, objetivando melhor conhecer estes efeitos, utilizando-se para tal, caprinos (SCHUMAHER-HENRIQUE, 2005, GOTARDO, 2009), já que se sabe que este animal é o mais sensível à toxicidade da *I. carnea* (SRILATHA; GOPAL-NAIDU; RAMA-RAO, 2000); como em ratos (SCHWARZ et al., 2005; HUEZA, 2006; HOSOMI et al., 1997), que é a espécie animal de laboratório de escolha para a avaliação de toxicidade (GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Em todas estas pesquisas, foi possível verificar claramente que a *I. carnea* produziu efeitos teratogênicos. Da mesma maneira, diferentes estudos, realizados em outros países, nos quais se administrou a gestantes plantas que contêm a suainsonina como princípio ativo tóxico como, por exemplo, aquelas do gênero *Astragalus* e *Oxytropis*, vêm igualmente mostrando efeitos teratogênicos nestes filhotes (COLEGATE; MOLYNEAUX, 1993; BUNCH et al., 1992); por outro lado, até o presente momento, não se sabe se os efeitos deletérios no feto seriam devido diretamente à passagem transplacentária dos princípios ativos tóxicos e/ou se haveria uma ação indireta na placenta, refletindo, assim, secundariamente no desenvolvimento fetal. Portanto, nesta pesquisa propôs-se verificar o possível efeito placentotóxico da planta.

Para os estudos experimentais relacionados aos efeitos de xenobióticos sobre a indução de anomalias e ou malformações fetais, é importante salientar que as doses preconizadas/utilizadas não devem causar toxicidade materna exacerbada, uma vez que o próprio estresse da intoxicação poderia causar efeitos deletérios ao conceito, interferindo, destarte, com a interpretação correta dos reais efeitos do xenobiótico (BERNARDI, 2006; GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

Em relação à administração de *I. carnea* em fêmeas gestantes, determinou-se que estas receberiam a planta do 6º ao 19º DG. Este período foi escolhido, pois sabe-se que, em ratas, no 6º dia de prenhez já houve a implantação do embrião no útero materno (SZABO, 1989), permitindo, desta maneira, que os efeitos da planta ocorressem somente durante o período de organogênese e desenvolvimento fetal, descartando-se assim a possibilidade de toxicidade na pré-implantação. As doses do RAF de *I. carnea* foram estabelecidas no presente estudo, baseando-se naquelas utilizadas anteriormente, numa pesquisa realizada por Hueza (2006), que também estudou a toxicidade deste resíduo da planta em ratas prenhes.

A avaliação do parâmetro peso é muito utilizada em toxicologia para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância nos animais (STEVENS; GALLO, 1889). Assim, neste estudo, quando se avaliou o ganho de peso total das fêmeas gestantes, tratadas ou não com a planta, foi possível observar diminuição significativa no peso daquelas ratas que receberam a maior dose do RAF. Uma vez que o número de filhotes vivos destas gestantes não diferiu daquele das fêmeas do grupo controle, pode-se relacionar esta diminuição verificada no ganho de peso com o efeito tóxico direto da *I. carnea*.

Pritchard et al. (1990) sugerem que a perda de peso de ratos tratados com a suainsonina é decorrente de alterações neurológicas que resultariam em anorexia de origem nervosa devido aos efeitos que este alcalóide pode promover no SNC dos animais. Apesar de, no presente estudo, ter sido verificado diminuição no consumo de ração naquelas fêmeas expostas à planta, este não diferiu significativamente entre os diferentes grupos; além disto, nenhuma lesão vacuolar foi observada no tecido nervoso das ratas tratadas com as diferentes doses de RAF. Corroborar com esta observação aquele estudo realizado por Hueza et al. (2005), no qual ratas expostas às diferentes doses de suainsonina, semelhantes àsquelas utilizadas neste estudo, também não foi observada qualquer lesão degenerativa no SNC.

Outra possibilidade para explicar a diminuição no ganho de peso dos animais aqui verificada, estaria relacionada à ação inibitória dos alcalóides da planta sobre

algumas sucrases, presentes na borda em escova das células do intestino delgado, como as enzimas α -glicosidases e α e β -galactosidases. Assim, esta inibição acarretaria em uma menor absorção de carboidratos e, conseqüentemente, menor ganho de peso (PAN; GHIDONI; ELBEIN, 1993; ASANO, 2000). De fato, durante as avaliações clínicas diárias realizadas nos animais foi possível observar, esporadicamente, a presença de fezes pastosas, provavelmente devido à presença destes açúcares, o que viria a confirmar a hipótese acima sugerida.

Como observou-se que as fêmeas tratadas com a maior dose do RAF estavam consumindo menor quantidade de ração e ganhando menos peso que aquelas ratas do grupo controle, decidiu-se por acrescentar mais um grupo de ratas ao protocolo experimental, denominado de *peer-feeding*, no qual as gestantes receberiam apenas a mesma quantidade média de alimentos consumida pelas ratas prenhes pertencentes ao grupo tratado com a maior dose da planta. Tal estratégia teve como objetivo confirmar a suposição de que a alteração (isto é, queda no ganho de peso) que foi observada nas fêmeas tratadas com o RAF da planta seria induzida pelos princípios ativos tóxicos da planta, pois caso contrário, esta seria resultante de uma possível desnutrição.

De fato, quando os resultados obtidos foram estatisticamente analisados, verificou-se que aquelas fêmeas tratadas com o RAF da *I. carnea* tiveram uma diminuição no ganho de peso, enquanto que aquelas pertencentes ao grupo *peer-feeding*, apesar de ingerirem menor quantidade de ração, apresentaram ganho de peso semelhante às ratas do grupo controle, evidenciando que a queda dos valores neste parâmetro, verificados nas gestantes expostas à planta foi resultante da ação tóxica direta da mesma.

A histologia de diferentes órgãos de fêmeas submetidas à cesariana revelou que aquelas tratadas com 7,0 g/kg do RAF de *I. carnea* apresentaram alterações características produzidas pela suainsonina, ou seja, a degeneração vacuolar em hepatócitos bem como no parênquima renal, particularmente em células tubulares da região cortical. Apesar da lesão renal observada, esta não foi suficiente para

promover aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina, diferente do que foi verificado no que se refere aos níveis séricos de albumina e de proteína total.

Neste momento poderia levantar-se a hipótese que as fêmeas tratadas com o RAF apresentaram menor concentração de proteínas séricas devido à menor ingestão de alimentos. No entanto, esta hipótese pode ser descartada, uma vez que fêmeas pertencentes ao grupo *peer-feeding* não apresentaram alterações nestes mesmos parâmetros. Portanto, pode-se sugerir que tais alterações nos níveis séricos de albumina e proteína total, verificado naquelas fêmeas tratadas com a maior dose da planta, foram decorrentes do efeito hepatotóxico produzido pela suainsonina e já relatado em diferentes espécies animais, inclusive no rato (SCHWARZ et al., 2003; HUEZA et al., 2005; HOSOMI et al., 2007)

Um dado interessante proveniente da análise bioquímica se refere àquele resultado relativo ao aumento nos níveis creatinina, verificado somente nas ratas pertencentes ao grupo *peer-feeding*. A avaliação dos níveis de creatinina e uréia são importantes parâmetros para diagnosticar vários tipos de afecções renais. A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não-protéico, formado a partir da desidratação da creatina. A interconversão de fosfocreatina e creatina é uma característica particular do processo metabólico da contração muscular. Uma parte da creatina livre no músculo não participa da reação e é convertida espontaneamente em creatinina. Aumentos séricos desta substância, além de presumir um diagnóstico para lesão renal, pode também indicar aumento do catabolismo protéico muscular.

No presente estudo, verificou-se que ratas do grupo *peer-feeding* não tiveram perda de peso, logo, é possível presumir que não houve catabolismo protéico, portanto, neste momento não seria possível, levantar qualquer hipótese que venha a esclarecer tal fenômeno observado.

Em relação aos efeitos vacuolares promovidos pela suainsonina, tem sido relatado que esta toxina promove degeneração lisossomal em células neuronais, principalmente naquela cerebelar: a célula de Purkinje. De fato, experimentos

realizados, tanto com a *I. carnea* quanto com a própria suainsonina, bem como com outras plantas que possuem este alcalóide como princípio ativo, mostram que a vacuolização no SNC é bastante evidente (TOKARNIA; DOBEREINER; CANELLA, 1960; VAN KAMPEN; JAMES, 1970; DORLING; HUXTABLE; VOGUEL, 1978; MATOS, 1983; SCHUMAHHER-HENRIQUE et al., 2003). No presente estudo, em nenhum dos tratamentos ou delineamentos experimentais, a histologia foi capaz de revelar qualquer indício de acúmulo lisossomal em células neuronais. No entanto, nos experimentos mencionados acima, realizados por outros pesquisadores, os sujeitos experimentais empregados foram caprinos, ovinos e bovinos. Assim, não restam dúvidas que a suscetibilidade do SNC às ações tóxicas da suainsonina são espécie-específicas. Apóia esta teoria os experimentos realizados, em ratos, por Hueza (2006), nos quais, mesmo utilizando doses duas vezes maiores que aquelas aqui empregadas pelo mesmo período, não foi evidenciada nenhuma alteração vacuolar ao nível do SNC.

As alterações que ocorrerem em um organismo em desenvolvimento, podem ser de natureza funcional ou estrutural e ocasionadas em qualquer período entre a fertilização e a maturação pós-natal. (BERNARDI, 2006).

Na presente pesquisa, verificou-se que aqueles fetos de mães tratadas com a planta não apresentaram nenhuma alteração, nem no tamanho e nem no peso, avaliado imediatamente após a secção cesariana, sendo este um importante parâmetro no estudo de teratologia (WHO, 1967; USEPA, 1991). No entanto, foi observado dentro das ninhadas destas fêmeas expostas aos princípios ativos da *I. carnea*, a presença de micrognatismo e de natimortos hidrópicos; além destas alterações, verificou-se também, em alguns fetos, hiperflexão das articulações (artrogripose) do carpo dos membros torácicos. A ocorrência desta alteração articular já fora anteriormente reportada por outros autores, em diferentes espécies animais, expostas àquelas plantas que possuem a suainsonina, tais como ovinos (JAMES, 1972; KEELER, 1988) e caprinos, tendo sido observado ainda nesta última espécie animal, micrognatismo (SCHUMAHHER-HENRIQUE, 2005). Também, em

estudos com ratos, a artrocripse foi observada (SCHWARZ, 2002). Embora o micrognatismo quanto à artrocripse, sejam alterações estruturais compatíveis com a vida, estas não deixam de ser um efeito teratogênico ocasionado pela planta.

Além destas alterações externas, as análises viscerais e ósseas realizadas neste estudo mostraram o aparecimento de apenas um feto, proveniente de uma fêmea tratada com a maior dose da planta, com malformação óssea, sendo esta caracterizada pela ausência unilateral da 13ª costela. Esta análise revelou também a presença de variações, tanto ósseas como viscerais; porém a análise estatística destes dados não indicou haver diferenças entre os fetos provenientes das mães do grupo controle quando comparados aos dos grupos experimentais e *peer-feeding*. Estes resultados aqui encontrados diferem de um estudo conduzido por Hosomi et al. (2007), no qual os autores verificaram alterações significantes, em alguns parâmetros, nos fetos de ratas expostas a 15,0 mg/kg do RAF de *I.carnea* durante o período que compreendeu da implantação ao final da gestação; portanto, tratadas na mesma fase da prenhez que as ratas da presente pesquisa. As alterações nos fetos referidas naquela pesquisa relacionavam-se particularmente às anormalidades ao nível dos rins. No que se refere à análise esquelética, foram observadas anormalidades ósseas, tais como redução na ossificação do metacarpo e vértebras caudais, alterações de crânio, esternóbrio e vértebras, enquanto que na análise visceral, observou-se apenas assimetria renal.

Uma possível explicação para justificar a discrepância entre os dados obtidos naquele estudo conduzido por Hosomi et al. (2007) e os obtidos na presente pesquisa pode estar relacionada à dose administrada; assim, embora não seja possível comparar a concentração de princípios ativos (particularmente suainsonina) presentes nas duas preparações de plantas, já que naquele estudo não foi realizada a dosagem de suainsonina no RAF de *I.carnea* empregada, é provável que naquele trabalho anterior havia uma maior concentração de suainsonina e outros princípios ativos tóxicos que no resíduo aquoso da planta aqui utilizado.

Sabe-se que glicoproteínas são extremamente importantes, não só para a fisiologia celular e do organismo como um todo, como também para o desenvolvimento fetal. De fato, vários são os estudos que relacionam malformações fetais a glicoproteínas defeituosas processadas por enzimas alteradas ou inibidas que fazem a glicolisação destas macromoléculas, ou seja, removem ou alteram os padrões de resíduos de açúcares de glicoproteínas (*N* e *O*-glicanos) recém-sintetizadas (SCHACHTER, 2002; JAMES et al., 2001). Apesar das enzimas α -manosidase II do Complexo de Golgi, α -glicosidade e as α e β -galactosidases participarem no processamento final da biossíntese de glicoproteínas recém-formadas, é possível teorizar que apenas a ação da suainsonina sobre a primeira enzima citada é a que promova as alterações macro e microscópicas aqui observadas, uma vez que estudos perinatais realizados com plantas tóxicas que possuem apenas este alcalóide como princípio ativo, mostraram alterações fetais semelhantes às aquelas reportadas nesta pesquisa. (KERRIGAN et al., 1998).

Vários estudos vêm apontando que muitas substâncias podem alterar a transferência placentária de nutrientes da mãe para o conceito; neste sentido, sabe-se que distúrbios na circulação materno-fetal podem promover lesões do tecido placentário, alterando o metabolismo endócrino e influenciando no desenvolvimento embrionário/fetal (GOODMAN; JAMES; HARBISON, 1982)

Quando se analisou, à microscopia óptica, o tecido placentário daquelas fêmeas tratadas com a maior dose do RAF da planta, foi possível verificar que houve o espessamento na zona de labirinto, com aparente diminuição de espessura dos sinusóides. Neste local encontram-se os sinusóides maternos, os quais estão delimitados por células trofoblásticas formando lacunas preenchidas por sangue materno e também capilares fetais. O labirinto se localiza na interface fetal e corresponde à área de trocas materno-fetais (ENDERS, 1969; HERNANDEZ-VERDUN, 1974; SOARES et al., 1987). A diminuição de espessura destes sinusóides maternos desta região pode ser indicativa de diminuição da circulação sangüínea placentária, resultando, desta forma, em comprometimento daquelas

trocas de substâncias entre mãe e feto. De fato, a diminuição do aporte de oxigênio ou de substratos ao feto, em geral, decorrente de alterações do fluxo sanguíneo uteroplacentário, ou mesmo modificações no crescimento e nas funções placentárias freqüentemente está associado à restrição de crescimento intrauterino (GLUCKMAN, 1989; MOORE, PERSAUD, 2008).

O aporte de nutrientes é um dos fatores mais importantes que regula o desenvolvimento e crescimento fetal. Sendo assim, a desnutrição fetal pode ocorrer no momento em que a demanda é maior que a oferta de nutrientes ao feto. Esta oferta pode estar comprometida quando a mãe é desnutrida ou na vigência de uma insuficiência placentária. Por outro lado, a demanda pode elevar-se em resposta a um crescimento fetal acelerado (BARKER, 2001).

Smith et al. (1997), observaram, em placentas humanas, que a apoptose pode ser um importante determinante no peso e função da placenta e no crescimento fetal. A maioria dos casos de restrição de crescimento intrauterino é atribuída a um inapropriado crescimento placentário (HEINONEN et al., 2001; REGNAULT et al., 2002). Estudos evidenciaram que o aumento da apoptose placentária pode estar associada a alterações no tamanho e arquitetura interna do órgão (SIBLEY et al., 2005). Pesquisas conduzidas em ovelhas indicam que o baixo peso ao nascimento também está relacionado à diminuição do crescimento da placenta (WALLACE et al., 1996), devido a alguns fatores como a diminuição da proliferação celular placentária e/ou aumento de apoptose na fase de crescimento placentário (LEA et al., 2005).

Em relação à análise da camada juncional da placenta realizada nesta pesquisa, pode-se observar uma diminuição de 4% da sua espessura, apenas naqueles animais submetidos ao tratamento com a maior dose (7,0 g/kg) do RAF da planta. Uma hipótese que pode ser levantada seria de que a suainsonina e/ou outros princípios ativos promoveriam uma alteração na arquitetura deste tecido; porém com as ferramentas utilizadas na presente pesquisa, seria difícil, neste momento, esclarecer esta observação, haja vista que quando realizada a técnica de TUNEL

neste material, a fim de se quantificar o número de células apoptóticas desta camada, não foi possível notar diferença entre as placentas oriundas das fêmeas do grupo controle com aquelas provenientes de gestantes exposta à planta.

Embora, tenham sido detectadas estas alterações no tecido placentário, nenhuma lesão vacuolar, característica da intoxicação por *I. carnea*, foi observada; assim, tornou-se imprescindível, utilizar-se um método de diagnóstico específico para a detecção de resíduos de açúcares, os quais poderiam estar armazenados, porém não evidenciados pela técnica do HE, e, para tal, foi utilizada a metodologia de lectina-histoquímica (LHQ).

De fato, o emprego da técnica de LHQ permitiu verificar várias alterações na placenta daquelas fêmeas provenientes do grupo tratado com a maior dose do RAF. Assim, foi possível observar que na zona juncional, especificamente nas células gigantes trofoblásticas e também na placa coriônica, houve um acúmulo de galactose- β -(1-3)-*N*-acetilgalactosamina (marcação pelo PNA), o que vem a ser indicativo da ação inibitória das calisteginas B₁ e B₂ sobre as enzimas α e β -galactosidases. O acúmulo deste mesmo açúcar também foi encontrado no estudo conduzido por Cholic et al. (2009) nas células pancreáticas de cobaias tratadas com *I. carnea*, nas doses de 5 mg/kg/dia de suainsonina e 13,24 mg/kg/dia de calisteginas por 45 dias e também naquele estudo em caprinos realizado por Armien et al. (2007), que observou a marcação positiva com esta lectina em células perivasculares do cérebro e no epitélio tubular renal de cabras intoxicadas com *I. carnea*.

A análise do tecido placentário pela lectina DBA revelou uma alteração muito semelhante àquela observada pela marcação com PNA, pois nesta avaliação também foi possível verificar uma diferença de marcação entre os animais que receberam 7,0 g/kg do RAF de *I. carnea*, em relação à placenta proveniente dos animais do grupo controle, nas mesmas zonas da placenta, ou seja, nas células trofoblásticas gigantes e na placa coriônica. Sabe-se que o DBA possui afinidade pelo carboidrato α -D-*N*-acetil-galactosamina; portanto, como aqui neste estudo

pôde-se evidenciar a presença deste açúcar em maior quantidade na placenta dos animais intoxicados, supõe-se que houve a ação inibitória das enzimas α e β -galactosidases pelas calisteginas B₁ e B₂, presentes no RAF da planta. Deve-se ressaltar que este é o primeiro trabalho que evidenciou a marcação por DBA, na intoxicação por *I. carnea*. Portanto, pode-se sugerir que a utilização deste marcador deva ser utilizada em pesquisas, que visem avaliar a toxicidade da *I. carnea* ou outras plantas que contenham calisteginas B₁ e B₂.

A técnica da LHQ realizada e que tem como princípio as ligações das lectinas WGA e s-WGA em oligossacarídeos são comumente utilizadas para detecção destes açúcares não metabolizados, ricos em resíduos de β -*N*-acetilglicosamina e *N*-acetil-ácido-neuroamínico, que se acumulam no interior de lisossomos, levando ao processo de degeneração vacuolar lisossomal; alteração esta característica da intoxicação por *I. carnea* e promovida pela ação da suainsonina (TULSIANI, 1988). Este método histoquímico é também muito utilizado no diagnóstico de outras doenças do armazenamento como a α -manosidose, doença genética de caráter autossômico recessivo, na qual ocorre o acúmulo de oligossacarídeos contendo resíduos α -manose, que possui afinidade de ligação pela lectina Con-A e β -*N*-acetilglicosamina (ALROY et al., 1984; JOLLY, WALKLEY, 1997) bem como em outras intoxicações por plantas que possuem como princípio ativo tóxico a suainsonina.

No presente estudo, quando se utilizou a marcação do WGA e o s-WGA, foi possível observar uma maior concentração dos oligossacarídeos no tecido placentário dos animais do grupo que recebeu a maior dose do RAF (7,0 g/kg), quando comparado às ratas pertencentes ao grupo controle, sendo esta marcação evidenciada em células do espongiotrofoblasto e no interior de células trofoblásticas gigantes (zona juncional), bem como na superfície do espaço labiríntico (marcação com WGA) e também em zona juncional e trofoblastos na região em contato com o sangue materno no labirinto (marcação com s-WGA). Este achado evidencia claramente o aumento na quantidade de β -*N*-acetilglicosamina e *N*-acetil-ácido-

neuroamínico, um dos principais carboidratos acumulados nesta toxicose. Corroborando este achado dois estudos, nos quais observou-se, a marcação positiva de WGA e sWGA em vacúolos presentes, respectivamente, em neurônios de caprinos e cobaias intoxicados por *I. carnea* (ARMIÉN et al., 2007; CHOLICH et al., 2009)

Vale ressaltar que o tecido placentário não deve ser considerado como uma “barreira protetora” do embrião/feto contra substâncias tóxicas exógenas, visto que este tem propriedades de uma membrana lipídica normal (BERNARDI, 2006); desta forma, substâncias lipossolúveis poderiam atravessá-la, da mesma maneira que ocorre em outros tecidos. Além disto, deve-se considerar que o transporte de substâncias, em ambas as direções, entre a placenta e o sangue materno é facilitado pela grande superfície da membrana placentária. Se, por um lado, a placenta não possui capacidade de promover a proteção completa da exposição do concepto aos xenobióticos, por outro, este órgão tem funções vitais para o desenvolvimento fetal, dentre estas citam-se o transporte de substâncias (por exemplo, oxigênio, água, aminoácidos, glicose, ácidos graxos etc); a excreção de uréia, bem como o papel fundamental na produção de estrógeno, progesterona e hormônios polipeptídeos (MOE, 1995; WATSON; CROSS; 2005; MOORE; PERSAUD, 2008). Neste sentido, deve-se supor que a injúria no tecido placentário poderá acarretar em comprometimento no desenvolvimento embrio/fetal.

De fato, neste estudo, evidenciaram-se alterações na prole de ratas expostas durante o período gestacional com o RAF da *I. carnea*. Deve-se ressaltar que esta pesquisa foi aquela que primeiro correlacionou a alteração do tecido placentário de gestantes expostas a uma determinada planta tóxica e a alteração nos filhotes provenientes destas fêmeas. Sem dúvidas, este resultado fornece importante colaboração para a toxicologia do desenvolvimento. Assim sendo, seria importante incorporar, também aos protocolos de teratogenicidade, o estudo do tecido placentário, o que certamente auxiliaria no esclarecimento de possíveis alterações verificadas no concepto.

O tamanho e peso dos filhotes ao nascimento são variáveis importantes que podem alterar o desenvolvimento físico e o comportamento animal (LEONARD, 1982). Os resultados relativos ao desempenho reprodutivo das fêmeas tratadas durante a gestação com a maior dose do RAF de *I. carnea* evidenciou diminuição do peso dos filhotes machos e fêmeas no PND1; porém esta mesma avaliação no 7º dia pós-parto, não revelou alteração entre as prole de gestantes tratadas ou não com a planta. Este mesmo dado também foi relatado por Hueza (2006), estudando os efeitos da *I. carnea* em ratas gestantes.

Uma possível explicação para justificar o baixo peso dos filhotes de mães expostas à *I. carnea* se relaciona à possível dificuldade de mamar. Corrobora com esta conjectura um estudo recente, conduzido por Gotardo (2009), o qual verificou que filhotes de cabras tratadas com a *I. carnea* durante o período gestacional apresentavam significantes alterações comportamentais, quando avaliados nas primeiras horas após o nascimento. Assim, naquela pesquisa verificou-se que os filhotes provenientes de gestantes expostas à planta, apresentavam-se debilitados, com maior dificuldade de se colocarem em estação, dificultando sobremaneira o acesso à mãe e, conseqüentemente, praticamente não mamando e com isto também não ganhando peso.

Além disto, o estudo neurocomportamental dos filhotes realizado nesta pesquisa, também evidenciou alterações. Assim, empregou-se o modelo de reflexo da geotaxia negativa de filhotes, o qual reflete o grau de maturação, principalmente do sistema vestibular, o qual está envolvido com a relação espacial dos animais, ou seja, com o desenvolvimento motor (CHIAVEGATTO, 1997; PATIN, et al., 2004). Este experimento permitiu verificar, que a exposição das gestantes à maior dose do RAF de *I. carnea*, provocou retardo no aparecimento deste parâmetro na prole fêmea, sugerindo um atraso na maturação das estruturas nervosas envolvidas na habilidade motora, particularmente do cerebelo.

Neste momento pouco poderia ser especulado no que se refere a não alteração deste teste nos filhotes machos; no entanto, pode-se sugerir que a ação

da testosterona sobre os filhotes machos, que se inicia nos últimos dias de gestação e se estende até próximo aos 10 primeiros dias de vida pós-natal, produziria ações neuroquímicas (FERNANDES, 1999) que protegeria os filhotes machos dos possíveis efeitos do RAF da planta no sistema vestibular, favorecendo uma maturação normal.

Ainda, reforça a hipótese de que os filhotes apresentaram dificuldade de mamar e por isto, apresentaram menor peso, o fato de que fetos provenientes das cesarianas não mostraram diferença significativa entre os pesos, quando se comparou os valores obtidos nos diferentes grupos; portanto, a diminuição de peso observada após o nascimento, está provavelmente relacionada à diminuição da quantidade de leite ingerida por estes filhotes nos primeiros momentos de vida.

Em relação às alterações externas observadas no 1º dia pós-parto do estudo em questão, notou-se em alguns filhotes daquelas fêmeas tratadas com o RAF de *I. carnea*, a hiperflexão das articulações do carpo; no entanto, com o passar do tempo houve regressão deste quadro. Estes achados também foram observados por outros autores, em diferentes espécies animais, ao estudarem os efeitos perinatais de locoweeds em carneiros (JAMES, 1972; KEELER, 1988), bem como em caprinos e ratos tratados com a *I. carnea* durante a gestação (SCHWARZ, 2002; SCHUMAHER-HENRIQUE, 2005). Na tentativa de explicar estas alterações verificadas nas articulações, Schumacher-Henrique (2005), associou estas malformações observadas em alguns filhotes de cabras expostas à *I. carnea* durante a gestação, com a diminuição acentuada nos movimentos fetais em períodos críticos de desenvolvimento fetal, efeito este detectado por ultrassonografia, realizada em diferentes fases da gestação.

Um importante achado refere-se à avaliação histopatológica destes filhotes, desta maneira, ao se avaliar o tecido renal e hepático das proles de mãe tratadas com a dose intermediária e a maior do RAF de *I. carnea* coletados no 8º dia de vida (PND7), foi possível observar claramente o efeito tóxico característico promovido por esta planta; ou seja, a presença de vacúolos citoplasmáticos nestes tecidos. Esta

mesma alteração também foi observada nestes mesmos órgãos nos filhotes com 15 e 22 dias de vida; porém em menor intensidade. Esta observação permite levantar duas hipóteses, primeira: que após a retirada da planta, as lesões ocasionadas pela *I. carnea* são reversíveis, mesmo que a exposição à mesma tenha sido durante a vida intrauterina. Reforça esta suposição, os dados obtidos no estudo histopatológico dos órgãos coletados no 22º dia de lactação de fêmeas dos diferentes grupos experimentais, o qual não revelou haver qualquer sinal de vacuolizações celulares nos diferentes órgãos avaliados, o que permite concluir que houve a recuperação destes animais após a retirada do tratamento. Além disto, este achado fortemente indica a passagem transplacentária dos princípios ativos tóxicos da planta. Entretanto, deve-se também considerar que as lesões encontradas naqueles animais submetidos à eutanásia no PND7, podem estar relacionadas tanto a passagem transplacentária como pela transmamária dos princípios ativos tóxicos da *I. carnea*, pois sabe-se que a suainsonina é excretada pelo leite por mais oito dias após a última administração deste princípio ativo (STEGELMEIER et al., 1994), fato este que poderia explicar a maior intensidade de lesão nestes filhotes.

Concluindo, os dados obtidos na presente pesquisa auxiliaram na compreensão do mecanismo de ação tóxico da *I. carnea*, particularmente no que se refere aos efeitos tóxicos durante a gestação, evidenciando claramente o potencial teratogênico promovido por esta planta. Particularmente aqueles achados relativos ao estudo da placenta contribuíram de maneira significativa, não somente para o melhor entendimento dos efeitos teratogênicos produzidos pela *I. carnea*, mas principalmente por propiciar um novo foco na pesquisa referente à toxicologia do desenvolvimento; desta forma, pode-se afirmar que a partir deste momento a placenta não poderá mais ser vista apenas como um local de passagem de princípios ativos tóxicos. Desta maneira, considerando-se que este é um órgão fundamental para a sobrevivência do conceito e sendo passível de ação tóxica produzida por diferentes substâncias, deve-se supor que alterações no tecido

placentário possam levar ao aparecimento de efeitos teratogênicos e, portanto, deve também ser alvo de investigações quando do estudo de toxicologia reprodutiva.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A administração da maior dose do RAF da *I. carnea* a ratas do 6º ao 19º DG, promoveu a toxidade materna, evidenciada pela diminuição do ganho de peso total e também pela presença de degenerações vacuolares em fígado e rim, com exceção do SNC.

- A administração da maior dose do RAF da *I. carnea*, promoveu o efeito placentotóxico, verificado pelas alterações histopatológicas encontradas neste tecido, caracterizadas pela diminuição de espessura da zona juncional, bem como o espessamento do labirinto.

- A utilização da técnica de LHQ permitiu evidenciar claramente o acúmulo de alguns açúcares não metabolizados no tecido placentário, alteração esta característica promovida pela ação dos princípios ativos tóxicos da *I. carnea*.

- A administração das diferentes doses do RAF da *I. carnea* a ratas do 6º ao 19º DG promoveu:

- O aparecimento de alguns fetos com alterações morfológicas tais como: artrogripose, micrognatismo e hidropsia, indicando a teratogenicidade promovida pela RAF de *I. carnea*.
- O aparecimento de vacuolizações em alguns órgãos de filhotes. Esta alteração foi observada em diferentes dias de vida; no entanto, foram bem mais evidentes no início da vida.
- Menor peso naqueles filhotes de fêmeas expostas durante a gestação à maior dose do RAF da planta (7,0 g/kg) no PND1 e atraso na geotaxia negativa, da prole fêmea provenientes de ratas tratadas com as diferentes doses do RAF da *I. carnea*.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALROY, J.; ORGAD, U.; UCCI A. A.; PEREIRA M. E. A. Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 32, p.1280-1284, 1984.
- ARMIÓN, A. G.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; FRESE, K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 170-184, 2007.
- 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.
- BARKER, D. J. P. The malnourished baby and infant. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 69-88, 2001.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI M. M. (Ed.) **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 807-816.
- BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure of trophoblastic giant cell transformation during the invasive stage of the mouse embryo. **Journal of Morphology**, v. 198, p. 341-351, 1988.
- BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Archives de Biologia y Medine Experimentales**, v. 22, p. 107-118, 1989.
- BUNCH, D. T.; PANTER, K. E.; JAMES, L. F. Ultrasound Studies of the Effects of Certain Poisonous Plants on Uterine Function and Fetal Development in Livestock. **Journal of Animal Sciences**, v. 70 p. 1639-1643, 1992.
- CHOLICH, L. A.; GIMENO, E. J.; TEIBLER, P. G.; JORGE, N. L.; ACOSTA DE PÉREZ, O. C. The guinea pig as na animal model for *Ipomoea carnea* induced α -mannosidosis. **Toxicon**, p. 1-7, 2009.

COLEGATE, M. S.; MOLYNEUX, J. R. Ultrasound Imaging: **A bioassay technique to monitor fetotoxicity of natural toxicants and teratogens**. 1th ed. CRC, 1993, p. 465-480.

DAI, G.; LU, L.; TANG, S.; PEAL, M. J.; SOARES, M. J. The prolactin family miniarray: a tool for evaluating uteroplacental/trophoblast endocrine phenotypes. **Reproduction**, v. 124, p. 755-765, 2002.

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.

DICKSON, A. D. Trophoblastic giant cell transformation of mouse blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 6, p. 465-466, 1963.

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.

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.

ELBEIN, A. D. The effects of plant indolizidine alkaloids and related compounds in glycoprotein processing. In: JAMES, L. F.; ELBEIN, A. D.; MOLYNEUX, R. J.; WARREN, C. D. (Ed.) **Swainsonine and related glycosidase inhibitors**. Ames: Iowa University Press. 1989, p. 155-87.

ELBEIN, A. D. Glycosidase inhibitors: inhibition of N-linked oligosaccharide processing. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 3055-3063, 1991.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. **The American Journal of Anatomy**, v. 125, p. 1-29, 1969.

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.

FERNANDES, C.; GONZÁLES, M. I.; WILSON, C. A.; FILE, S. E. Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 64, p. 731-738, 1999.

GARDINER, M. R.; ROYCE, R.; OLDROY, B. *Ipomoea muelleri* intoxication of sheep in Western Australia. **British Veterinary Journal**, v. 121, p. 272-277, 1965.

GARDNER, R. L. Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. **International Review of Experimental Pathology**, v. 24, p. 63-133, 1983.

GARDNER, R. L.; PAPAIOANNOU, V. E.; BARTON, S. C. Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 30, p. 561-572, 1973.

GEISERT, R. D.; MALAYER, J. R. Implantação. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Barueri, Manole: 2004, p. 127-140.

GILDEN, N.; BODEWITZ, H. Regulating teratogenicity as a health risk. **Social Science & Medicine**, v. 32, n. 10, p. 1191-1198, 1991.

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

GOLDSTEIN I. J.; HAYES C. E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. **Advances Carbohydride Chemistry Biochemistr**, v. 35, p. 127-340, 1978.

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

GOODMAN, D. R.; JAMES R. C.; HARBISON, R. D. Placental Toxicology. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 20, p. 123-128, 1982.

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri, Manole: 2008, p. 701-731.

GOTARDO, A. T. **Avaliação da toxicidade da *Ipomoea carnea* em caprinos durante o período perinatal: estudos de neuroteratologia**. 2009. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

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.

HEINONEN, S.; TAIPALE, P.; SAARIKOSKI, S. Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. **Placenta**, v. 22, p. 399-404, 2001.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Morphogenesis of the syncytium in the mouse placenta. Ultrastructural study. **Cell and Tissue Research**, v. 148, p. 381-396, 1974.

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

HOSOMI, R. Z.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; HABR, S. F.; PENTEADO, S. W.; VAROLI, F. M. F.; BERNARDI, M. M. Embriotoxic effects of prenatal treatment with *Ipomoea carnea* aqueous fraction in rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 67-75, 2007.

HUEZA, I. M.; GUERRA, J.; HARAGUCHI, M.; GARDNER, D.; ASANO, N.; IKEDA, K.; GÓRNIK, S. L. Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of *Ipomoea carnea* in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, p. 439-446, 2007.

HUEZA, I. M. **Parâmetros inflamatórios, imunológicos e histopatológicos da administração prolongada da *I. carnea* em ratos: 1. Avaliação em animais adultos 2. Estudo perinatal**. 2006. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

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.; 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.

HUXTABLE, C. R.; DORLING, P. R. Nephrotic syndrome and collagenizing glomerulopathy in PVG/c rats treated with the alfa-mannosidase inhibitor "Swainsonine". **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 727-736, 1983.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Barueri, Manole: 2004, p. 141-154.

JAMES, L.F. Syndromes of locoweed poisoning in livestock. **Clinical Toxicology**, v.5, p. 567-573, 1972.

JAMES, W. D.; WARREN, C. E.; GRANOVSKY, M.; DEMETRIOU, M. Genetic defects in *N*-glycosylation and cellular diversity in mammals. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 601-607, 2001.

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-cell maturation. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2003-2008, 1992.

KAUFMAN, M. H. Occlusion of the neural lumen in early mouse embryos analysed by light and electron microscopy. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 78, p. 211-228, 1983.

KEELER, R. F. Livestock models of human birth defects, reviewed in relation to poisonous plants. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 2414-2427, 1988.

KERRIGAN, J. J.; MCGILL, J. T.; DAVIES, J. A.; ANDREWS, L.; SANDY, I. R. The role of cell adhesion molecules in craniofacial development. **Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh**, v. 43, p. 223-229, 1998.

KING, N. W.; ALROY, J. Deposições intracelulares e extracelulares; degenerações. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. (Ed.). **Patologia veterinária**. Barueri: Editora Manole, 2000, p. 27-61.

LEA, R. G.; HANNAH, L. T.; REDMER, D. A.; AITKEN, R. P.; MILNE, J. S.; FOWLER, P. A.; MURRAY, J. F.; WALLACE, J. M. Developmental indices of nutritionally induced placental growth restriction in the adolescent sheep. **Pediatric Research**, v. 57, p. 599-604, 2005

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

MARANGHI, F. C.; MACRI, C.; RICCIARDI, A.; STAZI, V.; MANTOVANI, A. Evaluation of the Placenta: Suggestions for a Greater Role in Developmental Toxicology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 44, p. 129-136, 1998.

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

MOE, A. J. Placental amino acid transport. **The american Journal of Physiology**, v. 268, p. 1321-1331, 1995.

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.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Placenta e membranas fetais. In: MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 2008 , p. 131-171.

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.

MÜNTENER, M.; HSU, Y. C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. A reinvestigation with regard to the in vitro culture of mouse trophoblast and placenta. **Acta Anatomica**, v. 98, p. 241-252, 1977.

NELSON B. K.; JAMES L.F.; SHARMA R. P.; CHENEY, C. D. Locoweed embryotoxicity in rats. **Clinical Toxicology**, v. 16, p. 149-166, 1980.

NORTON, S. Methods for behavioral toxicology. In HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**, 2. Ed. New York: Raven Press, 1989, p. 553-571.

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.

PANTER, K. E.; JAMES, L. F.; HARTLEY, W. J. Transient testicular degeneration in rams fed locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Veterinary and Human Toxicology**, v. 31, p. 42-46, 1989.

PANTIN, V.; VINCENT, A.; LORDI, B.; CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? **Developmental Brain Research**, v. 149, p. 85-92, 2004.

PETERS, P. W. J. Developmental toxicology: adequacy of current methods. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 1, p. 55-62, 1998.

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

REGNAULT, T. R.; GALAN, H. L.; PARKER, T. A.; ANTHONY, R. V. Placental developmental in normal and compromised pregnancies: a review. **Placental**, v. 23, p. 119-129, 2002.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001, p. 351-386.

ROSSANT, J.; TAMURA-LIS, W. Effect of culture conditions on diploid to giant-cell transformation in postimplantation mouse trophoblast. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 62, p. 217-227, 1981.

SCHACHTER, H. The role of the GlcNAc β 1,2Man α - moiety in mammalian development. Null mutations of the genes encoding UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3- β -mannoside β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I and UDP-*N*-acetylglucosamine: α - β -mannoside β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I.2 cause embryonic lethality and congenital muscular dystrophy in mice and men, respectively. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, p. 292-300, 2002.

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

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.

SCHWARZ, A. **Efeitos da exposição gestacional à fração aquosa da *Ipomoea carnea* no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole de ratos.** 2002. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

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

SIBLEY, C. P.; TURNER, M. A.; CETIN, I.; AYUK, P.; BOYD, C. A.; D'SOUZA, S. W.; GLAZIER, J. D.; GREENWOOD, S. L.; JANSON, T.; POWELL, T. Placental phenotypes of intrauterine growth. **Pediatric Research**, v. 58, p. 827-832, 2005.

SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 177, p. 1395-1401, 1997.

SOARES, M. J.; SCHABERG, K. D.; PINAL C. S.; DE, S. K.; BHATIA, P.; ANDREWS, J. K. Establishment of a rat placental cell line expressing characteristics of extraembryonic membranes. **Developmental Biology**, v. 124, p. 134-144, 1987.

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.

STAPLES, R. E.; SCHENELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in KOH-alizarin S method for fetal bone. **Stain Technology**, v.39, n.1, p.61-63, 1964.

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.

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.

STEVENS, G.; GALLO, M. Practical considerations in the conduct chronic toxicity studies. In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1889, p. 237-250.

SZABO, K. T. **Congenital malformations in laboratory and farm animals**. San Diego: Academic Press, 1989, p. 313.

TAYLOR, J. B.; STRICKLAND, J. R. In vitro effect of swainsonine on bovine and ovine lymphoblastogenesis. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2857-2862, 1998.

TAYLOR, P. Skeletal examination. **Practical teratology**. London: Academic Press, 1986, p. 77-100.

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.; SKUDLAREK, M. D.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Swainsonine induces the production of hybrid glycoproteins and accumulation of oligodaccharides in male reproductive tissues of the rat. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 130-138, 1990.

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.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Risk assessment forum. **Federal Register**, v. 56, n. 234, p. 63798-63826, 1991. Disponível em: <http://www.epa.gov/ncea/raf/pdfs/devtox.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2007.

VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. Sequential development of cytoplasmatic vacuolation in tissues. **Pathology Veterinary**, v. 7, p. 503-508, 1970.

VICHERY, B. H.; BENNET, J. P. Rats and mice. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia Lea & Febiger, 1970, p.229-315.

ZBINDEN, G. Experimental methods in behavioral teratology. **Archives of Toxicology**, v. 438, 1981

WALLACE, J. M.; AITKEN, R. P.; CHEYNE, M. A. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent: consequences for the fetus. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1055-1062, 2004.

WHINCHESTER, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. **Glycobiology**, v. 15, p. 1-15, 2005.

WHO-World Health Organization. **Principles for the testing of drugs for teratogenicity**. Geneva: World Health Organization, 1967, p. 364 (Technical Report Series).