ALESSANDRA VAZ FERNANDES FIUZA TELES

**Estabelecimento e implementação de protocolo de
hematotoxicidade para utilização em ensaios pré-clínicos
de medicamentos: estudo em ratos.**

**São Paulo
2017**

Alessandra Vaz Fernandes Fiuza Teles

**Estabelecimento e implementação de protocolo de
hematotoxicidade para utilização em ensaios pré-clínicos de
medicamentos: estudo em ratos.**

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dra Silvana Lima Górnaiak

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3495
FMVZ

Teles, Alessandra Vaz Fernandes Fiuza
Estabelecimento e implementação de protocolo de hematotoxicidade para
utilização em ensaios pré-clínicos de medicamentos: estudo em ratos /
Alessandra Vaz Fernandes Fiuza Teles. – 2017.
113 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnjak.

1. Senna occidentalis. 2. Hematotoxicidade. 3. Medula óssea. 4. Hiperplasia
eritróide. 5. Hemossiderina I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Implementação e estabelecimento do protocolo de hematotoxicidade para utilização de ensaios pré-clínicos de medicamentos. Estudo em ratos.", protocolado sob o nº 2692/2012, utilizando 210 (duzentos e dez) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Implementation and haematotoxicity establishment protocol for use in pre-clinical testing of drugs. Study in rats", protocol number 2692/2012, utilizing 210 (two hundred,ten) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TELES, Alessandra Vaz Fernandes Fiuza

Título: Estabelecimento e implementação de protocolo de hematotoxicidade para utilização em ensaios pré-clínicos de medicamentos: estudo em ratos.

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Agradecimientos

Aos meus pais Omar e Cidinha, as minhas irmãs Andrea e Adriana, aos meus sobrinhos-irmãos Thiago e Felipe, pela paciência, carinho, amor e compreensão em todos os momentos da realização deste trabalho. Amo vocês!

Agradeço ao meu marido Wladimir, pelo apoio, paciência, confiança e amizade, que carinhosamente demonstrou para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu pequeno filho Lucas, pela diversão nas horas mais difíceis na elaboração deste trabalho. Mamãe te ama!

A minha orientadora Profa. Dra. Silvana Lima Górnica, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, apoio, paciência.

Ao Departamento de Patologia (VPT), Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), local onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao professor Dr. Ricardo A. Fock, Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), pelo incentivo e auxílio na execução deste trabalho, contribuindo para a publicação do artigo.

Aos funcionários do biotério do VPT 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 pela paciência e auxílio nos experimentos.

A todas as funcionárias da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

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

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

TELES, A. V. F. F. Estabelecimento e implementação de protocolo de hematotoxicidade para utilização em ensaios pré-clínicos de medicamentos: estudo em ratos. [Establishment and implementation hematotoxicity protocol for use in pre-clinical trials of medicaments: studies in rats]. 2017. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

O objetivo do presente estudo foi o de investigar, pela primeira vez: os efeitos da administração prolongada de sementes *Senna occidentalis* (*S. occidentalis*) em órgãos hematopoiéticos de ratos, utilizando metodologias que poderão ser sugeridas para estudo pré-clínico de medicamentos. Avaliou-se nestes animais: consumo de ração e água; peso médio semanal; parâmetros hematológicos e bioquímicos; padrões histopatológicos; estoque de ferro e ensaios clonogênicos. O estudo foi realizado em ratos Wistar machos de 90 dias de idade, os quais foram expostos a diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração, a saber: 0% (controle), 0,5% (So0,5%), 1% (So1%) e 2% (So2%) durante 90 dias. Foi importante incluir um grupo pair-fed (PF), o qual recebeu a mesma quantidade de ração consumida pelo grupo So2%, porém, isenta da planta, uma vez que a *S. occidentalis* é sabidamente anorexígena. O presente estudo demonstrou que os ratos do grupo So2% apresentaram diminuição no número de leucócitos totais bem como alterações nos parâmetros referentes a série vermelha, tais como diminuição do VCM e HCM, caracterizando uma anemia microcítica hipocrômica. Os dados do hemograma corroboram as alterações observadas no mielograma destes animais, uma vez que foi constatada a redução significativa da relação Mielóide/Eritróide (M/E) e, portanto, um possível efeito tóxico da *S. occidentalis* sobre a medula óssea durante o tratamento de 90 dias. A redução significativa da relação M/E nos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ocorreu devido ao aumento progressivo de eritroblastos jovens e policromáticos na medula óssea destes animais. Índices baixos da relação M/E podem estar associados a uma anemia regenerativa em função de hemólise extravascular ou, ainda, à eritropoiese ineficaz. A partir do mielograma observou-se, também, redução significativa de células blásticas e de todos os tipos celulares, especialmente, da linhagem granulocítica, com predomínio da linhagem linfocitária. No entanto, uma vez que os linfócitos estão, continuamente, recirculando, o aumento ou a diminuição destas células não reflete, necessariamente, alteração na linfopoiese. A análise anatomopatológica da medula óssea de animais dos grupos experimentais apontou um aumento progressivo da celularidade, caracterizando hiperplasia medular. Estes resultados se correlacionam aos dados do mielograma. Na anemia regenerativa ocorre diminuição da sobrevivência das hemácias na circulação, resultante de hemólise extravascular realizada por macrófagos, especialmente, do tecido esplênico. Assim, o tratamento prolongado com *S. occidentalis* poderia estar associado ao um processo hemolítico, haja vista a observação de aumento do peso relativo deste órgão; acúmulo de hemossiderina no baço e ainda, reticulocitose em animais tratados com esta planta. O tratamento de 90 dias com *S. occidentalis* promoveu, também, redução significativa na celularidade do baço bem como alterações anatomopatológicas, incluindo espessamento de cápsula e rarefação celular. Os ensaios clonogênicos

padronizados neste estudo apontaram redução da porcentagem de colônias BFU-E e CFU-E em animais do grupo So2%, indicando uma provável ação tóxica da *S.occidentalis* sobre os progenitores medulares. A partir dos dados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que o tratamento por 90 dias com *S. occidentalis* na ração é hematotóxico. Além disto, os resultados aqui obtidos bem como as metodologias empregadas poderão contribuir para o estabelecimento de um protocolo de hematotoxicidade, haja vista que informações relacionadas aso mecanismos de hematopoiese; metabolismo de ferro; características histológicas e citológicas de órgãos hematopoiéticos (baço e medula óssea) de ratos foram levadas em consideração para a realização deste estudo.

Palavras-chaves: *Senna occidentalis*, hematotoxicidade, medula óssea, hiperplasia eritróide, hemossiderina.

ABSTRACT

TELES, A. V. F. F. Establishment and implementation hematotoxicity protocol for use in pre-clinical trials of medicaments: studies in rats [Estabelecimento e implementação de protocolo de hematotoxicidade para utilização em ensaios pré-clínicos de medicamentos: estudo em ratos]. 2017. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The purpose of this study was to investigate, for the first time: the effects of long term administration of *Senna occidentalis* (*S. occidentalis*) seeds in hematopoietic organs of rats, using methodology that can be suggested for pre-clinical studies. We evaluated some parameters in these animals: feed intake and water; weight body; hematological and biochemical parameters; histopathology; iron stores and clonogenic assays. The study was conducted in 90-day-old male Wistar rats, which were exposed to different concentrations of *S. occidentalis* in feed, ie: 0% (control), 0.5% (So0.5%), 1% (So1%) and 2 % (So2%) for 90 days. It was important to include a pair-fed group (PF), which received the same amount of feed consumed by So2% group, however, without the plant, once *S. occidentalis* is known anorectic. This study showed that rats from So2% group presented a decrease in the number of total leukocytes as well as changes in the parameters for the red series, such as decrease in MCV and MCH values, featuring a hypochromic anemia. The blood count results corroborate the findings from bone marrow smears of these animals, since it was found the significant reduction ratio Myeloid / Erythroid (M / L) and, therefore, a possible toxic effect of the *S. occidentalis* on the bone marrow during the treatment of 90 days. The significant reduction in the ratio M / E in animals belonging to different experimental groups occurred due to the progressive increase of young and polychromatic erythrocytes in the bone marrow of these animals. Low levels of M / E ratio may be associated with a regenerative anemia in extravascular hemolysis function or even the ineffective erythropoiesis. From the myelogram there was also a significant reduction of blast cells and all cell types, especially of granulocytic lineage, with a predominance of lymphoid lineage. However, since lymphocytes are, continuously by recirculating the increase or decrease in these cells do not necessarily reflect changes in lymphopoiesis. The pathological examination of the bone marrow of the experimental group animals showed a progressive increase in cellularity, featuring medullary hyperplasia. These results correlate to myelogram. In the regenerative anemia occurs a decreased survival of red blood cells in the circulation, resulting from extravascular hemolysis performed by macrophages, especially in the splenic tissue. Thus, the long term administration of *S. occidentalis* seeds could be associated with hemolytic process, due to the observation of an increase in the relative weight of this body; hemosiderin accumulation in the spleen and also increased reticulocytes in animals treated with this plant. The treatment with *S. occidentalis* promoted also significant reduction in cellularity of the spleen and pathological changes, including capsule and cell thinning thickening. Clonogenic assays showed decreased percentage of BFU-E and CFU-E colonies in animals from So2% group, indicating a probable toxic action of *S.occidentalis* on medullary progenitors. Therefore, the treatment for 90 days with *S. occidentalis* in feed is promotes blood toxicity.

Keywords: *Senna occidentalis*, hematotoxicity, bone marrow, erythroid hyperplasia, hemosiderin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso médio (em gramas) semanal de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias (12 semanas).....	58
Tabela 2 - Consumo total de água (em mL) de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	60
Tabela 3 - Peso relativo do baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	61
Tabela 4 - Peso relativo do timo de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	62
Tabela 5 - Celularidade do baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	63
Tabela 6 - Celularidade da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	64
Tabela 7 - Avaliação do hemograma completo de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	66
Tabela 8 - Avaliação dos índices hematimétricos de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	67
Tabela 9 - Avaliação da bioquímica sérica de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	67
Tabela 10 - Relação M/E da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	73
Tabela 11 - Score de ferro da medula óssea e baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	75
Tabela 12 - Colônias BFU-E da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	80
Tabela 13 - Colônias CFU-E da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	82

Tabela 14 - Colônias CFU-GM da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 7 - Consumo médio (em gramas) semanal de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....	59
Figura 8 - Consumo total de água (em mL) de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....	60
Figura 9 - Peso relativo do baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....	61
Figura 10 - Peso relativo do timo de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias.....	62
Figura 11 - Celularidade do baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....	63
Figura 12 - Celularidade da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....	64
Figura 13 - Série eritróide da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. A) Porcentagem de eritroblastos jovens. B) Porcentagem de eritroblastos ortocromáticos. C) Porcentagem de eritroblastos ortocromáticos. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle; # p<0,05 versus grupo PF, teste de Dunnett.....	70
Figura 14 - Série granulocítica da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias. A) Porcentagem de blastos jovens. B) Porcentagem de formas jovens. C) Porcentagem de formas em anel. D) Porcentagem de formas segmentadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle; # p<0,05 versus grupo PF, teste de Dunnett.....	71

Figura 15 - Contagem diferencial de células das séries monomacrofágica, linfocitária e megacariocítica da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. **A)** Porcentagem de monócitos. **B)** Porcentagem de linfócitos. **C)** Porcentagem de megacariócitos.

72

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

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

Figura 16 - Relação M/E da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

74

*p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....

Figura 17 - Percentual de grânulos de hemossiderina no baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

76

*p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus grupo PF. ANOVA seguida de teste de Dunnett.....

Figura 18 - **A)** Corte histológico de baço de animal controle, apresentando imagem panorâmica de tecido (4X). **B)** Corte histológico do baço de animal do grupo controle, evidenciando cápsula delimitando parênquima tecidual (40X). **C)** Corte histológico de baço de animal tratado com 2% de *S. occidentalis*, apresentando imagem panorâmica (4X); **D)** Corte histológico de baço de animal do grupo tratado com 2% de *S. occidentalis*, demonstrando espessamento capsular e rarefação linfocitária (40X).....

77

Figura 19 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmur de ratos controle e tratados com sementes de *S. occidentalis* (0,5%, 1% e 2%) na ração durante 90 dias O aumento da densidade celular pode estar associada ao tratamento. As setas indicam um aumento na densidade de células eritróides da medula óssea nos animais expostos á *S.occidentalis*. **A)** Grupo controle. **B)** Grupo So0,5%. **C)** Grupo So1%. **D)** Grupo So2%.....

78

Figura 20 - Colônias BFU-E da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).....

80

Figura 21 - Colônias CFU-E da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).....

82

Figura 22 - Colônias CFU-GM da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).....

84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISAO DA LITERATURA	25
2.1 Gênero <i>Senna</i>	25
2.1.1 <i>S. occidentalis</i>	25
2.2 Hematopoiese	29
2.3 Metabolismo de ferro e eritropoiese	31
2.4 Avaliação dos órgãos hematopoiéticos em ensaios pré-clínicos	36
2.5 Ensaios clonogênicos	40
3.OBJETIVOS	43
3.1Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Animais	45
4.2 Planta	46
4.3 Reagentes e equipamentos	46
4.4 Procedimentos	47
4.4.1 Preparo e administração da ração	47
4.4.1.1 Administração de ração aos animais	48
4.4.1.2 Administração de ração ao grupo PF	48
4.4.2 Avaliação do consumo de ração, água e observações clínicas	49
4.4.3 Avaliação da celularidade do baço	49
4.4.4 Avaliação da celularidade da medula óssea	49
4.4.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos	50

4.4.6 Avaliação bioquímica	50
4.4.7 Mielograma	51
4.4.8. Reação de Perls	52
4.4.8.1 Análise morfométrica do baço	52
4.4.9 Coleta de material para avaliação histopatológica	53
4.4.10 Obtenção de células mononucleares	53
4.4.10.1 Ensaio clonogênicos.	54
4.4.11 Análise estatística	54
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	56
5.1 Experimento 1: Avaliação da toxicidade de <i>S. occidentalis</i> administrada na ração de animais dos grupos controle, experimentais e PF	56
5.1.1 Resultados	56
5.2 Experimento 2: Avaliação do hemograma, da contagem de reticulócitos e da bioquímica sérica em animais tratados com sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias	63
5.2.1 Resultados	63
5.3 Experimento 3: Avaliação do mielograma, do estoque de ferro e da histopatologia do timo, baço e medula óssea de animais tratados com sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias	68
5.3.1 Resultados	68
5.4. Experimento 4: Ensaio clonogênicos de células mononucleares da medula óssea de animais tratados com sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração durante 90 dias	79
5.4.1 Resultados	79
6. DISCUSSÃO	86

7. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, fitoterápicos são medicamentos preparados, exclusivamente, com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes) que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos (BRASIL, 2004).

No Brasil, a biodiversidade e riqueza de sua flora estimulam a procura de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças que acometem o ser humano e estudos têm revelado uma diversidade de plantas com potencial medicinal (DI STACI et al.; 2002). Entretanto, o empenho da comunidade científica em assegurar a eficácia e o uso seguro das plantas medicinais vai ao encontro do apelo que as mesmas exercem sobre a população, haja vista que o conhecimento e uso destas são baseados nos costumes tradicionais locais (ACCORSI, 2000). Além disto, o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais, no Brasil, ainda é incipiente (ARNOUS et al.; 2005).

Neste sentido, espécies vegetais, cujo uso pode ser atribuído ao modismo, são frequentemente citadas e lembradas pela população, como as várias espécies de Senna, incluindo a *Senna occidentalis* (*S. occidentalis*) (NUNES et al.; 2003).

Particularmente, no que se refere à *S. occidentalis*, esta planta é mais difundida entre a população, devido as suas propriedades laxativas e emagrecedoras. Embora esta planta venha sendo amplamente utilizada, diversos estudos têm demonstrado que o uso prolongado, no ser humano, pode ocasionar desconforto abdominal com perda de eletrólitos e água (SOYUNCU; CETE; NOKAY, 2008); hepatotoxicidade (VASHISHTHA et al.; 2007), além de causar risco de aborto ao estimular a motilidade uterina, o que a torna, indubitavelmente, um problema de saúde pública.

Durante o desenvolvimento de novo medicamento ou agente terapêutico, um aspecto importante é predizer se a substância em questão será tóxica para a medula óssea e se a toxicidade será específica para uma ou mais de suas linhagens celulares. Devido à grande capacidade proliferativa do tecido hematopoiético, as células da medula óssea podem ser alvos da ação tóxica de várias substâncias, incluindo os fitoterápicos (FUGH-BERMAN, 2000; HU et al.; 2005). Desta forma, a avaliação da integridade da hematopoiese é um parâmetro importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na alteração da produção de células sanguíneas e como estas mudanças, coletivamente, irão impactar na homeostasia do tecido sanguíneo.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que ratos expostos por 14 dias à sementes de *S. occidentalis* apresentaram efeitos tóxicos importantes, tais como redução da celularidade do baço e medula óssea e, ainda, anemia microcítica hipocrômica; sugerindo, indiretamente, possíveis alterações na homeostasia do sistema hematopoiético (MARIANO-SOUZA, 2010). Portanto, a presente pesquisa tomou como ponto de partida os dados obtidos anteriormente e visa agora verticalizar este estudo, procurando-se investigar se animais expostos a diferentes concentrações (0,5%, 1% e 2%) de *S. occidentalis* na ração por 90 dias poderiam apresentar alterações significativas no tecido hematopoiético. Os dados aqui obtidos bem como as metodologias empregadas poderão auxiliar no estabelecimento de protocolo pré-clínico para avaliação de hematotoxicidade.

Revisão da Literatura

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Senna*

O gênero *Senna* destaca-se por ser uma importante fonte de compostos com diversas propriedades biológicas e farmacológicas, apresentando em algumas espécies atividades laxativa, hepatoprotetora, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antipirética, analgésica e antimalárica comprovadas (VIEGAS JUNIOR, 2006; SILVA et al., 2010), o que desperta um grande interesse na sua aplicabilidade no mercado. A rigor, a literatura relata o isolamento de mais de 350 metabólitos secundários em espécies do gênero *Senna*, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de várias partes do mundo.

Neste gênero, as pesquisas envolvendo *Senna occidentalis* (*S. occidentalis*) apontam seus notáveis efeitos laxativos e purgativos devido à presença das antraquinonas (HARAGUCHI et al.; 1996; SOYUNCU; CETE; NOKAY, 2008) Devido ao seu amplo uso na medicina tradicional, bem como sua ubiquidade, esta se torna uma espécie de interesse econômico no que diz respeito ao aproveitamento sustentável da flora nacional.

2.1.1 *S. occidentalis*

S. occidentalis Link é uma espécie pertencente à família *Fabaceae* (*Leguminosae*), subfamília *Caesalpinioideae*, conhecida, popularmente, como fedegoso (devido ao seu odor fétido); sene; mata pasto; manjerioba, folha-de-pajé; maioba e café negro. Pode ser encontrada, praticamente, na maioria dos países tropicais e subtropicais, incluindo todo território brasileiro, sendo uma invasora frequente de áreas de pastagem, pomares, terrenos baldios e margens de estradas (LORENZI, 2000).

A espécie apresenta-se como um arbusto ou subarbusto glabro (**Figura 1**), de caule herbáceo ou apenas lenhoso na base, de coloração arroxeada, podendo atingir de 0,3 a 2 metros de altura. Os ramos são glabros e as folhas são alternadas; as flores são grandes, amarelas, com nervuras cor laranja, dispostas em pequenos ramos axilares, solitários nas flores superiores ou aglomeradas, formando panículas terminais (ARAGÃO, 2008; YADAV et al, 2010).

Figura 1 – Planta *S. occidentalis*. **Fonte:** KISSMAN; GROTH, 1999.

Esta leguminosa é de vida curta, 6 a 9 meses, podendo chegar a pouco mais de um ano em condições ambientais favoráveis, e crescimento moderadamente rápido, propiciado em regiões úmidas e frias. Reproduz efetivamente por sementes, com germinação escalonada na primavera nas regiões do Brasil (KISSMANN; GROTH, 1999), florescendo no período de setembro a outubro e frutificando entre fevereiro e abril.

O perfil fitoquímico realizado com *S. occidentalis* relata o isolamento e elucidação estrutural de vários constituintes em diversas partes da planta, destacando a presença marcante de compostos das classes das antraquinonas

e flavonoides. A concentração de compostos fenólicos em folhas e caules desta espécie está condicionada aos diferentes estágios de desenvolvimento do vegetal, bem como as condições climáticas de cada região (DI STASI, 2002).

Yadav e colaboradores (2010) esclarecem que a quantidade de compostos antracênicos em *S. occidentalis* é bem maior nas sementes do que nas folhas e raízes. As sementes desta espécie também são consideradas uma eficiente fonte de carboidratos e proteínas do ponto de vista nutricional, mas neste caso, é preciso levar em consideração a notável atividade laxativa comprovada de componentes antraquinônicos, bem como a sua toxicidade quando ingerida *in natura*.

Raízes, folhas e sementes de *S. occidentalis* são empregadas no tratamento de diversas enfermidades. No Peru, as raízes de *S. occidentalis* são utilizadas como diurético e sua decocção é usada para tratar a febre. As sementes são fermentadas em uma bebida e usadas no tratamento da asma, enquanto a infusão da flor é usada no tratamento da bronquite. Os índios da Nicarágua usam a decocção de folhas frescas para dor, dor uterina menstrual e constipação intestinal (CHUKWUJEKWU et al., 2006). No Panamá, um chá de folhas é usado para cólicas estomacais e as folhas esmagadas são usadas para preparação de um tipo de cataplasma empregado como anti-inflamatório (GUPTA et al., 1979). Em vários países as folhas secas de fedegoso são esmagadas ou fermentadas em um chá e aplicadas externamente para o tratamento de doenças da pele, feridas, fungos, abscessos e como analgésico. A raiz, fortemente amarga, é usada como antídoto de vários venenos e como abortiva (DI STASI, 2002).

Além do seu emprego na medicina popular, *S. occidentalis* também é, frequentemente, utilizada como alimento pelas classes pobres da Índia e Sri Lanka, sendo de notável relevância para algumas comunidades tradicionais, principalmente, indígenas. Suas sementes, quando macias, apresentam gosto agradável e semelhante ao feijão, quando torradas e moídas são usadas para o preparo de uma bebida semelhante ao café, conhecida como café fedegoso ou café do Senegal, sendo utilizada como substituintes do café por algumas populações (CORRÊA, 1926).

Por ser, frequentemente, encontrada em áreas de pastagem e de cultivo de soja e milho, é quase impossível que *S. occidentalis* não se misture com estes cereais, culminando na contaminação da safra com suas sementes. Caso não haja uma separação eficiente, as sementes de *S. occidentalis* poderão vir a compor parte do produto final destinado à alimentação humana ou animal (BARROS, 1991).

Várias pesquisas com diferentes animais tais como bois, porcos, cavalos, ovelhas, coelhos, frangos, cabras e ratos, têm demonstrado que a ingestão de grandes quantidades das sementes produz sintomas como ataxia, apatia, diarreia, dispneia, anorexia e morte com degeneração dos músculos esqueléticos e cardíacos (O'HARA; PIERCE, 1974; CAVALIERI et al, 1997; BARBOSA-FERREIRA et al.; 2005).

Em vários estudos, foi observado que a planta possui efeito acumulativo e que as doses letais variam entre as diferentes espécies animais. Os sinais consequentes da intoxicação, tanto de forma natural, como experimental compreendem doença febril, abatimento, tremores musculares, diarreia, mioglobínúria, perda da coordenação motora, adoção do decúbito lateral, culminando em morte do animal (ARAGÃO, 2008).

Recentemente, dados provenientes da pesquisa em nosso laboratório demonstraram que ratos expostos a sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias apresentaram alterações significantes em tecidos hematopoiéticos. Observou-se redução da celularidade do baço e medula óssea; alterações no mielograma com redução da razão mielóide/eritróide; anemia regenerativa e, ainda, acúmulo de ferro no baço com concomitante redução de ferro medular (TELES; FOCK, GÓRNIK, 2015).

O tecido hematopoiético tem uma substancial capacidade proliferativa e, por conseguinte, pode ser alvo de ação de várias substâncias, incluindo produtos à base de plantas, como a *S. occidentalis*. Desta forma, a avaliação da integridade da hematopoiese é um parâmetro importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na alteração da produção de células sanguíneas e como estas mudanças, coletivamente, irão impactar na homeostasia do tecido hematopoiético, resultando em hematotoxicidade. A integridade da hematopoiese envolve a diferenciação e amadurecimento das células sanguíneas; metabolismo do ferro e preservação da histologia e

citologia de órgãos hematopoiéticos. Estes parâmetros atuam em conjunto para que o processo de hematopoiese ocorra normalmente (MORRISON et al., 1997).

2.2 Hematopoiese

Em mamíferos, durante a vida embrionária e fetal, a hematopoiese ocorre em diferentes tecidos, tais como o saco vitelino, fígado, baço, timo e medula óssea. Em seres humanos, após o nascimento, a medula óssea constitui-se no único local de produção de células sanguíneas, enquanto que em ratos, tanto o baço como a medula óssea permanecem, fisiologicamente, como órgãos hematopoiéticos (MORRISON et al., 1997).

A hematopoiese é um fenômeno complexo, altamente regulado e influenciado por vários estímulos, levando à contínua produção de células maduras, tais como os leucócitos, eritrócitos e plaquetas (DOULATOV et al.; 2012).

O microambiente hematopoiético (**Figura 2**) é constituído por células sanguíneas em diferentes estágios de maturação; células estromais e matriz extracelular (MAYANI et al., 1992). Apresenta-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica, constituindo-se em um importante parênquima de sustentação para as células hematopoiéticas e, portanto, essencial para a proliferação, diferenciação e maturação destas células (SEITA et al, 2010).

Figura 2. Hierarquia do sistema hematopoiético. As células tronco-hematopoiéticas se diferenciam em 2 tipos de progenitores: mielóide CFU-GEMM (Unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos/macrófagos, e megacariócitos) e linfóide CFU-L (unidade formadora de linfócitos). A partir do progenitor mielóide, diferenciam-se as células progenitoras unipotentes: BFU-E e CFU-E (Unidade formadora de colônias de eritrócitos); CFU-Meg (Unidade formadora de colônias de megacariócitos); CFU-M (Unidade formadora de colônias de monócitos); CFU-Eo (Unidade formadora de colônias de eosinófilos) e CFU-B (Unidade formadora de colônias de basófilos). Já, a partir do progenitor linfóide, diferenciam-se as células progenitoras unipotentes CFU-B (Unidade formadora de colônias de linfócitos B) e CFU-T (Unidade formadora de colônias de linfócitos T). A interação entre as diferentes Unidades formadoras de colônias e fatores de crescimento dará origem às células sanguíneas maduras.

Fonte: Modificado de METCALF, 2007.

A hematopoiese é influenciada por vários estímulos que atuam em diferentes níveis do processo: interação célula-célula e célula-estroma no microambiente indutor da hematopoiese (MOHANDAS; PRENANT, 1978;

BORELLI; FOCK, 2004); ação de fatores de crescimento e citocinas; estímulo hormonal e estado nutricional.

O ferro é essencial à hematopoiese, especialmente, para a síntese de hemoglobina nos eritrócitos durante a eritropoiese. Tanto a deficiência quanto o excesso de ferro ocasiona disfunção celular. Portanto, o equilíbrio no metabolismo de ferro garante que sejam mantidas funções celulares essenciais, ao mesmo tempo em que se evita prováveis danos teciduais decorrentes da toxicidade deste elemento (GROTO, 2008; GANZ; NEMETH, 2012).

2.3 Metabolismo de ferro e eritropoiese

O ferro utilizado pelo organismo é oriundo da dieta e a partir da reciclagem de eritrócitos senescentes. A quantidade de ferro absorvida é regulada pela necessidade do organismo. Assim, em situações em que há falta de ferro ou aumento da necessidade, há uma maior absorção de ferro. Para responder a essa maior demanda, há expressão de proteínas envolvidas nesse processo, como a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) e a ferroportina (FPT) (ANDREWS, 2002).

A transferrina é a principal proteína de transporte do ferro. É uma glicoproteína de 75-80 kDa sintetizada e secretada pelo fígado. A ligação do ferro à transferrina possibilita o aumento de sua solubilidade e atenua sua reatividade, garantindo o transporte seguro e liberação para as células (TANDARA; SALAMUNIC, 2012).

A afinidade da molécula de transferrina pelo ferro é extremamente alta no PH fisiológico, de maneira que quase todo o ferro não heme na circulação está ligado à transferrina. Entretanto, em situações de excesso de ferro, quando a capacidade de ligação da transferrina está saturada, o ferro não ligado à transferrina (NTBI) aparece no plasma. O NTBI corresponde às outras formas de ferro no plasma que se associam a ligantes que não a transferrina. Esta forma é bastante reativa e pode participar de reações de Fenton, sendo considerado um marcador de toxicidade do ferro (GROTO, 2010).

A captação do complexo ferro-transferrina pelas células acontece por meio de um receptor específico, o receptor de transferrina (TfR). Um produto da clivagem do TfR tecidual circula no plasma na forma solúvel (sTfR). A concentração de sTfR circulante é determinada, primariamente, pela atividade medular eritróide. Assim, situações caracterizadas por hipoplasia da série vermelha, como anemia aplásica ou insuficiência renal crônica, apresentam níveis reduzidos de sTfR, enquanto condições com hiperplasia eritróide, como anemia falciforme ou outras anemias hemolíticas crônicas, estão associadas com níveis elevados de sTfR (SKIKINE; FLOWERS; COOK, 1990; BEGUIN, 1992). Outro fator que regula a expressão do TfR e, conseqüentemente, altera as concentrações circulantes do sTfR é o estado do ferro intracelular.

Após a interação da transferrina com o respectivo receptor, inicia-se a captação de ferro pelas células. No interior da célula, o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase, sendo armazenado na forma de ferritina ou liberado dos enterócitos para o sangue (KAPLAN; WARD, 2011).

Como a maior parte do ferro no organismo está associada à molécula de hemoglobina, a fagocitose e degradação de hemácias senescentes representam uma fonte importante de ferro (de 25 a 30 mg/dia). Essa quantidade de ferro reciclado é suficiente para manter a necessidade diária de ferro para a eritropoiese (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001).

Os macrófagos do baço e da medula óssea reconhecem modificações bioquímicas na membrana das hemácias senescentes. Essas alterações sinalizam para que o macrófago elimine essas células. Após a interação de receptores específicos nos macrófagos com as hemácias, inicia-se o processo de fagocitose, seguido da degradação dos componentes da hemácia (CHUNG; WESSLING-RESNICK, 2003).

Como mencionado anteriormente, a maior parte do ferro do organismo encontra-se incorporado à hemoglobina dos eritrócitos circulantes (60 a 70%). No entanto, pode ser estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea na forma de ferritina. A concentração sérica de ferritina é utilizada como um indicador bastante útil dos estoques de ferro. Estima-se que 1 µg/L de ferritina sérica corresponda a 8-10 mg de estoque tecidual de ferro (CANÇADO, 2012).

Outra forma de estoque de ferro é a hemossiderina, produto insolúvel da degradação incompleta da ferritina. Em situações de excesso de ferro, a hemossiderina passa a ser a principal proteína de estoque. A hemossiderina corresponde à forma degradada da ferritina, em que a concha proteica foi parcialmente desintegrada, permitindo que o ferro forme agregados. Pode ser visualizada à microscopia óptica após a coloração com azul da Prússia ou reação de Perls, em que a hemossiderina cora com ferrocianeto de potássio na presença de ácido clorídrico, formando agregados azulados (CHUNG; WESSLING-RESNICK, 2003).

Normalmente, o ferro é eliminado do organismo a partir da descamação das células intestinais. O organismo não possui um mecanismo específico para eliminar o excesso de ferro absorvido ou acumulado após a reciclagem do ferro pelos macrófagos. Assim, o controle do equilíbrio de ferro requer uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque. Essa comunicação é feita pela hepcidina; um hormônio peptídico circulante recentemente descrito que teria um papel regulatório fundamental na homeostase de ferro (OATES, 2007).

O papel hormonal da hepcidina foi descoberto em experimentos animais em que camundongos deficientes de hepcidina desenvolviam sobrecarga de ferro, especialmente, no fígado, pâncreas e coração e, paradoxalmente, apresentavam depleção de ferro nos macrófagos. Por outro lado, animais que superexpressavam a hepcidina apresentavam anemia do tipo microcítica hipocrômica ao nascimento e morriam rapidamente. Ficou assim estabelecido que a hepcidina é um regulador negativo do metabolismo do ferro (GANZ, 2005; GANZ; NEMETH, 2012).

A expressão da hepcidina é regulada tanto pelo o estado do ferro (a sobrecarga de ferro aumenta sua expressão, enquanto a anemia e hipoxemia reduzem-na) quanto pelo estado inflamatório, em que a IL-6 tem um papel fundamental (NEMETH et al., 2004)

A ferroportina é o receptor da hepcidina e a interação hepcidina-ferroportina controla os níveis de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos. O complexo hepcidina-ferroportina é internalizado nos domínios da membrana basolateral dos macrófagos e a ferroportina é degradada, bloqueando a liberação do ferro dessas células. Como consequência, ocorre o

acúmulo de ferro nos hepatócitos e macrófagos esplênicos. Assim, a redução da passagem do ferro para o plasma resulta na baixa saturação da transferrina e menos ferro é liberado para o desenvolvimento de eritroblastos, resultando em eritropoiese ineficaz e anemia (MENA et al., 2007).

O termo eritropoiese ineficaz descreve um grupo de desordens eritropoiéticas em que é produzido um número menor de eritrócitos do que o esperado a partir do eritroblasto mais imaturo na medula óssea. Com isto, ocorre um desequilíbrio entre quantidade de ferro que é absorvida pelos eritroblastos da medula óssea e a quantidade de ferro liberada na circulação. Assim, a manutenção da homeostase do ferro é extremamente importante para que não ocorra falta ou excesso deste metal, uma vez que ambas as situações são prejudiciais ao funcionamento do organismo (TANNO; MILLER, 2010).

As alterações do metabolismo de ferro podem ser avaliadas por várias provas laboratoriais: o hemograma; a determinação sérica de ferro; a capacidade de ligação do ferro; o índice de saturação da transferrina; a concentração de ferritina e a avaliação do conteúdo de ferro medular são as mais utilizadas (ALENCAR et al., 2002). A mensuração de variáveis eritrocitárias como o hematócrito e a concentração de hemoglobina é comumente utilizada para avaliar a disponibilidade de ferro. As alterações no tamanho e na cor dos eritrócitos proporcionam uma informação indireta, porém útil, em relação à quantidade de ferro no eritrócito.

Apesar de serem comumente utilizados para avaliar a deficiência de ferro, os índices eritróides (índices hematimétricos) são mais úteis em diagnosticar a carência de ferro após a manifestação da anemia, uma vez que células hipocrômicas e microcíticas aparecem em maior quantidade no sangue após um decréscimo na concentração de hemoglobina (COOK et al, 1992).

A anemia nem sempre está associada à deficiência de ferro, haja vista que a diminuição da síntese de hemoglobina ocorre apenas nas deficiências severas. Os parâmetros eritrocitários estão, geralmente, normais durante os primeiros estágios da deficiência de ferro, enquanto a deficiência crônica é caracterizada por anemia microcítica hipocrômica. No entanto, este perfil pode ser observado, também, em anemias regenerativas; portanto, a contagem de reticulócitos é um importante parâmetro para distinguir se há um defeito na

produção de eritrócitos pela falta de ferro ou destruição excessiva destas células em função de processos hemolíticos (BEUTLER; WAALEN, 2006).

A avaliação de ferro medular por método histoquímico com corante azul de Prússia (**Figura 3**) é considerado o teste mais preciso para o diagnóstico da deficiência de ferro, entretanto, devido ao seu caráter invasivo, na prática, só é realizado em casos mais complexos e não diagnosticados pelos métodos usuais. Tem bom valor diagnóstico para a deficiência e para a diferenciação entre deficiência e pseudodeficiência de ferro. Na deficiência, ocorre depleção dos estoques medulares, enquanto que na pseudodeficiência o ferro medular apresenta-se normal ou aumentado (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002).

Figura 3. Reação de Perls ou Azul de Prússia positiva em esfregaço de medula óssea humana. Os grânulos azulados ao redor dos eritroblastos indicam acúmulo de ferro.

Fonte: BOLLIGER, 2004.

2.4. Avaliação de órgãos hematopoiéticos em ensaios pré-clínicos

A análise da medula óssea faz parte da avaliação do sistema hematopoiético e, portanto, é considerada uma valiosa ferramenta no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de uma variedade de condições e doenças. Em estudos toxicológicos, a avaliação da medula óssea representa um dos diversos parâmetros utilizados para determinar o potencial de novos compostos em desencadear possíveis efeitos hematotóxicos (BOLLIGER, 2004).

A avaliação da medula óssea em ensaios pré-clínicos pode ser utilizado para determinar o potencial primário de hematotoxicidade de um novo composto ou, ainda, pode ser parte de uma investigação mais generalizada de toxicidade. Entre os parâmetros de avaliação da medula óssea a serem considerados em ensaios pré-clínicos, destacam-se: a análise morfológica de secções da medula óssea que forneçam informações sobre arquitetura do tecido; estimativa das reservas de ferro e identificação de outras características (por exemplo, presença de pigmentos; agentes infecciosos ou alterações de caráter proliferativo). Associado ao hemograma completo, o exame histológico da medula óssea (**Figura 4 A-D**) e de outros órgãos hematopoiéticos, tais como o baço (**Figura 5 A-C**) oferece informações sobre o sistema hematopoiético, as quais poderiam não ser notadas quando realizado apenas o exame de sangue periférico (TRAVLOS, 2006).

Figura 4. Celularidade da medula óssea de ratos. O aumento na densidade celular está diretamente relacionada ao tratamento crônico (2 anos) com azul de metileno. As Figuras **4B** (objetiva de 20X) e **4D** ilustram o aumento na densidade celular de linhagens eritróide, mielóide e megacariocítica em animais expostos ao azul de metileno. As Figuras **4A** (objetiva de 20X) e **4C** (objetiva de 40X) ilustram os animais controles.

Fonte: TRAVLOS, 2006.

Figura 5. Celularidade do baço de ratos. O aumento na densidade celular está diretamente relacionada ao tratamento crônico (2 anos) com azul de metileno. As Figuras **5A** (objetiva de 20X) e **5B** ilustram hematopoiese extramedular em ratos expostos ao azul de metileno. A Figura **5C** (objetiva de 40X) ilustra numerosas células eritróides e megacariocíticas. A seta indica a presença de uma célula em apoptose entre as células hematopoiéticas em proliferação.

Fonte: TRAVLOS, 2006.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração em ensaios pré-clínicos é a observação do mielograma. A citologia da medula óssea é indispensável e agrega valor único para avaliação de segurança em muitos estudos toxicológicos. A avaliação microscópica permite caracterizar a morfologia das células e identificar os diferentes estágios de maturação das linhagens de células hematopoiéticas (**Figura 6 A-D**). A interpretação dos resultados deve ser feita em conjunto com a avaliação do sangue periférico e de cortes histológicos da medula óssea (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002).

Após análise do mielograma, é importante incluir, também, a determinação da razão Mielóide/Eritróide (M/E); haja vista que este índice é útil para caracterizar anormalidades no processo de maturação das células sanguíneas durante a hematopoiese (ULRICH; CASTILHO, 1991).

Figura 6 (A-D). Estágios de maturação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea de ratos observados no esfregaço medular ou também denominado de mielograma. **MB** indica mieloblasto; **EP**, promielócito precoce; **P**, promielócito; **EM**, mielócito precoce; **M**, mielócito; **MM**, metamielócito; **NSN**, bastonetes; **SN**, neutrófilos segmentados; **EO**, eosinófilos; **EOp**, precursores eosinofílico; **Er**, precursores eritróides. May-Grünwald-Giemsa, objetiva 100X.

Fonte: BOLLIGER, 2004.

Como mencionado anteriormente, além da avaliação da medula óssea em ensaios pré-clínicos é importante, também, incluir a análise do tecido esplênico. O baço tem uma grande importância como reservatório sanguíneo, podendo, quando solicitado e sob a ação das catecolaminas, elevar o hematócrito em até 10% do seu valor normal. Possui função hematopoiética em recém-nascidos, podendo, também, desempenhar esta função em adultos;

em ratos, a hematopoiese neste tecido perdura, normalmente, após o nascimento. A estrutura do baço, semelhante a uma peneira, torna-o eficiente no monitoramento de células sanguíneas viáveis, facilitando, com isso, a fagocitose destas pelos macrófagos. Estes acumulam pigmentos de hemossiderina; uma massa rica em ferro, oriunda da degradação da hemoglobina (SWENSON; REECE, 1996; COUTO; HAMMER, 1997; CARLTON; McGAVIN, 1998). Este órgão está, também, envolvido com os mecanismos de defesa do organismo, através da produção de linfócitos e anticorpos (LIPOWITZ; BLUE, 1998; RICHARD; SHERIND, 1998).

2.5 Ensaios clonogênicos

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica e órgãos regulatórios têm demonstrado um interesse crescente no desenvolvimento e validação de testes *in vitro* capaz de prever *in vivo* a mielotoxicidade (PARCHMENT, 1998).

A mielotoxicidade pode resultar tanto do efeito direto da droga sobre os progenitores hematopoiéticos quanto do efeito sobre as células do estroma medular ou expressão de citocinas/receptores. Portanto, diferentes protocolos de investigação têm sido desenvolvidos e propostos para a avaliação da integridade da hematopoiese *in vitro* (PARENT-MASSIN et al., 1993; GRIBALDO et al., 1996; PESSINA et al., 1998; PESSINA et al., 1999). Todos estes testes são modificações da técnica original descrita por BRADLEY e METCALF (1966), e também desenvolvida e modificada por outros autores (DEXTER et al., 1973; DEXTER & TESTA, 1976; DEXTER & SPOONCER, 1987).

Os ensaios clonogênicos, simulando a hematopoiese, são sistemas de cultura de células progenitoras hematopoiéticas, geralmente, em meio semi-sólido, empregados na hematologia experimental e clínica por mais de 30 anos. Na hematologia clínica, estes métodos são aplicados para confirmar diagnóstico; em transplantes de medula óssea ou, ainda, para predizer o tempo de recuperação medular em casos de falência deste órgão (DELDAR et al.,

1988; DELDAR & STEVENS, 1993; DELDAR, 1994; DELDAR, HOUSE; WIERDA, 1995).

A utilização de ensaios clonogênicos de forma investigativa em estudos pré-clínicos de novas substâncias é mais recente. *In vitro*, na presença de meio de cultura para tecidos e de uma mistura de citocinas específicas para cada linhagem celular, os progenitores formam colônias distintas fenotipicamente de células diferenciadas. A estas células deu-se o nome de unidades formadoras de colônias ("Colony Forming Unit", CFU). Como há provas formais de que essas colônias são clones puros, ou seja, derivadas de uma única célula (TESTA, 1985), esses ensaios permitem estudos qualitativos e quantitativos dos diferentes progenitores hematopoiéticos envolvidos, desde aqueles com multipotencialidade, capazes de formar colônias com milhares de células de diferentes linhagens (FAUSER; MESSNER, 1978; FAUSER; MESSNER, 1979), até progenitores com limitada capacidade proliferativa, que culminam com a formação de colônias contendo um número mais reduzido de células, todas pertencentes a um ou, no máximo, dois tipos celulares.

Os ensaios clonogênicos de progenitores aplicados às investigações hematotoxicológicas incluem unidades formadoras de colônia comprometida com a linhagem de granulócitos e macrófagos ("Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage", CFU-GM) e com a linhagem eritróide ("Burst Forming Unit-Eritroid", BFU-E) (PARENT-MASSIN 1993; MALERBA et al., 2004). A vantagem da aplicação de ensaios clonogênicos é a redução significativa do número de animais amplamente empregados na avaliação de toxicidade/segurança em investigações toxicológicas pré-clínicas. Por outro lado, a desvantagem do método, ainda, é a contagem das colônias, devido ao número modesto de formação e a distribuição das colônias em diferentes níveis do meio de cultura (MALERBA, 2004).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar possível hematotoxicidade provocada pelo uso prolongado de sementes de *S. occidentalis* na ração de ratos Wistar machos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade sistêmica produzida pela administração prolongada de sementes de *S. occidentalis* incorporadas à ração sobre o sistema linfo-hematopoiético: peso corporal; consumo de ração e água; peso relativo do baço e timo; celularidade do baço e medula óssea, hemograma completo; contagem de reticulócitos e bioquímica sérica;
- Avaliar a toxicidade produzida pela administração prolongada de sementes de *S. occidentalis* incorporadas à ração sobre o tecido hematopoiético de ratos: mielograma; reação de Perls (estoque de ferro) e ensaios clonogênicos;
- Avaliar possíveis alterações anatomopatológicas produzidas pela administração prolongada de sementes de *S. occidentalis* incorporadas à ração: histopatologia do timo; baço e medula óssea.

Materiais e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais utilizados e a metodologia empregada para a avaliação dos diferentes parâmetros propostos pelo projeto de doutorado.

4.1 ANIMAIS

Para cada experimento foram utilizados 50 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 90 dias de idade provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm. Todas as gaiolas foram mantidas em sala com temperatura ambiente (21-24 °C) e iluminação artificial em ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara e iluminação às 07h00min horas. Estes animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos relativos ao uso de animais de Laboratório do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, os quais são baseados naqueles descritos pelo *Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources – National Research Council*, EUA.

O protocolo para a realização deste estudo foi submetido à Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

4.2 PLANTA

Foram utilizadas sementes de *S. occidentalis* do Instituto Biológico de São Paulo. Após a coleta, as sementes foram alojadas em local seco até o momento de serem moídas e adicionadas à ração.

A *S. occidentalis* foi depositada no herbário Maria Eneida Fidalgo no Instituto Botânico de São Paulo na forma de exsicata sobre o numero SP - 363817.

4.3 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- Albumina sérica bovina- fator V (Gibco®);
- Autoanalisador Bioquímico (Celm®)
- Azul de cresil brilhante (Merck®);
- Azul de Tripan (Gibco®);
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf®);
- Cetamina (Vetbrands®);
- Citocentrífuga (Incibras®);
- Cloreto de sódio (Merk®);
- Coloração panótica rápida (Merk®);
- Contador Hematológico ABC™ VET ABX;
- Formaldeído (Merk®);
- Freezer - 20°C (Reubly®);
- Fycoll-Hypaque (Gibco®);
- Hepes (Gibco®);
- Kits para bioquímica sérica (ALT; AST; albumina; bilirrubina; creatinina; glicose; proteínas totais; ureia) (CEL-M®);
- Lâminas e lamínulas (Glasstechica®);
- May-Grunwald-Giemsa (Merck®);

- Meio de cultivo IMDM (Gibco[®]);
- Meio de cultura RPMI-1640 (Gibco[®]);
- Meio semi-sólido com metilcelulose (Stem Cells Technologies[®]);
- Microscópio óptico modelo Nikon;
- Penicilina e estreptomicina (Cultlab[®]);
- Placas de 24 poços (Cultilab[®]);
- RPMI-1640 (Gibco[®]);
- Seringas descartáveis de 1, 5 e 10 mL (Rynco[®]);
- Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (Merck[®]);
- Soro bovino fetal (Gibco[®]);
- Tubos plástico de 15 mL (Eppendorf[®]);
- Xilazina (Vetbrands[®]).

4.4 PROCEDIMENTOS

Para a execução do delineamento experimental foram realizados os seguintes procedimentos:

4.4.1. Preparo e administração da ração

Foram utilizadas sementes de *S. occidentalis* provenientes do plantio realizado no Instituto Biológico de São Paulo. Após a coleta, as sementes foram alojadas em local seco até o momento de serem moídas e adicionadas à ração. Devido à possibilidade de inativação dos princípios ativos pelo aquecimento e, conseqüentemente, perda da toxicidade das sementes quando da trituração em moinhos de facas, foi realizado o procedimento a frio. Assim, as sementes de *S. occidentalis* foram separadas dos cotilédones, congeladas em nitrogênio líquido, trituradas em liquidificador comercial e incorporadas à ração (Nuvital[®]). Foram adicionadas diferentes concentrações de sementes

(0,5%, 1% e 2%) na ração, sendo esta mistura homogeneizada em misturador (Marconi® modelo 206) e, imediatamente, peletizada.

4.4.1.1 Administração de ração aos animais

Ratos Wistar machos foram separados em cinco diferentes grupos: o controle (Co), no qual os animais receberam apenas ração comercial, no entanto, essa foi também submetida ao processo de repeletização em procedimento idêntico àquele descrito para o preparo da ração com as sementes da planta; três grupos experimentais, nos quais os ratos foram tratados com 0,5% (So0,5%), 1% (So1%) e 2% (So2%) de *S. occidentalis* na ração por 90 dias. Além destes grupos, foi importante também incluir neste estudo o grupo pair-fed (PF), no qual os animais receberam a ração (também repeletizada) na mesma quantidade consumida por aqueles ratos tratados com 2% de *S. occidentalis*, porém, isentas de sementes da planta.

4.4.1.2 Administração de ração ao grupo PF

O grupo PF recebeu a mesma quantidade de ração consumida pelos animais tratados com a maior concentração da planta na ração (So2%). Para tanto, iniciou-se a administração ao grupo So2% 24h antes do grupo PF. Este procedimento permitiu o cálculo do consumo médio de ração pelos animais do grupo experimental So2%; a quantidade obtida por intermédio deste cálculo foi administrada aos animais do grupo PF.

4.4.2 Avaliação do consumo de ração, água e observações clínicas

Os animais foram pesados e então, mantidos individualmente em gaiolas apropriadas antes do início da administração das sementes de *S. occidentalis* incorporadas à ração. Os animais foram pesados, semanalmente, durante 90 dias de tratamento para a avaliação do ganho de peso e acerto da dose administrada. Foi também medido, neste período, o consumo de água e ração.

As observações clínicas foram realizadas a cada 2 dias e os seguintes sinais e sintomas foram avaliados: presença de fezes amolecidas; letargia e piloereção.

4.4.3 Avaliação da celularidade do baço

O baço dos animais foi removido e um fragmento de peso conhecido foi separado. Procedeu-se, então, a dissociação do fragmento em meio RPMI-1640 com auxílio de 2 lâminas para microscopia Perfecta[®].

O número total de células nucleadas foi quantificado em hemocítômetro e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão por Azul de Tripan (6X diluído em PBS).

4.4.4 Avaliação da celularidade da medula óssea

As células da medula óssea foram extraídas da cavidade femoral esquerda de cada animal, utilizando-se seringas descartáveis (com agulhas de calibre 1,20X40 mm) com 10 mL de meio RPMI-1640 gelado e estéril. A suspensão de células obtida foi acondicionada em tubos de poliestireno e, em seguida, procedeu-se a contagem total de células nucleadas em hemocítômetro. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão por Azul de Tripan (6X diluído em PBS).

4.4.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção cardíaca em ratos previamente anestesiados com cetamina e xilazina (5,0 e 50 mg/Kg, respectivamente) por via intraperitoneal. Este procedimento foi realizado de forma rápida para minimizar o sofrimento ou estresse dos animais. A eutanásia foi realizada no período da manhã, entre 8 e 12 h.

As amostras foram coletadas utilizando-se, como anticoagulante, o ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 10% na proporção de 50 µL para cada 1,0 mL de sangue, sendo utilizadas para realização do hemograma completo e contagem de reticulócitos.

Para a contagem de reticulócitos adicionou-se 2 gotas de sangue a 2 gotas de azul de cresil brilhante em tubo de ensaio de 11X75 mm. Em seguida, esta solução foi incubada por 15 minutos a 37°C. Ao término deste período foram realizadas extensões sanguíneas para a observação e contagem de reticulócitos.

A partir do número absoluto de eritrócitos pôde-se calcular o número de reticulócitos por mm³, através da seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de reticulócitos/mm}^3 = \frac{\% \text{ de reticulócitos} \times n^{\circ} \text{ de eritrócitos /mm}^3}{100}$$

4.4.6 Análise bioquímica

As amostras de sangue coletadas sem anticoagulante foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para a retração do coágulo e, posteriormente, submetidas à centrifugação (400 rpm, 10 minutos) para a coleta do soro, o qual foi utilizado para a determinação de glicose, colesterol total, aspartato transaminase (AST), alanina aminotransferase (AST), albumina, creatinina e ureia.

Para as determinações bioquímicas utilizou-se o Kit comercial da Laborlab em equipamento da Celm - SBA – 200. A metodologia empregada foi de acordo com as especificações do fabricante.

4.4.7 Mielograma

A partir das amostras de suspensão total de células da medula óssea obtidas conforme o **item 4.4.4**, foram preparadas lâminas de citocentrifugado e coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado. Para a análise diferencial foram contadas 300 células ao microscópio óptico.

A classificação das células da linhagem granulocítica foi baseada na relação núcleo-citoplasma; na afinidade tintorial do citoplasma; na presença ou não de granulações primária ou secundária no citoplasma; no padrão de cromatina nuclear; na presença ou não de nucléolos; no diâmetro e segmentação ou não do nucléolo. Na série granulocítica, consideramos quatro etapas maturativas: **(I) blastos**, envolvendo o hemocitoblasto e o mieloblasto; **(II) formas jovens**, englobando o promielócito e o mielócito; **(III) formas em anel**, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; **(IV) segmentados**, envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares.

Os precursores eritróides foram classificados em: **(I) eritroblastos jovens**, envolvendo os proeritroblastos e eritroblastos basófilos; **(II) eritroblastos policromáticos**, englobando todas as etapas em que as células apresentaram cromatina condensada e citoplasma policromático; **(III) eritroblastos ortocromáticos**, incluindo células com núcleo de cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico.

As células da linhagem linfocitária^o envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como **linfócitos**. Promonócitos, monócitos e macrófagos foram reunidos em um grupo de células denominadas **monomacrofágicas**. E, por fim, foram avaliadas as células da linhagem **megacariocítica**. Todos os dados foram expressos em porcentagem.

4.4.8 Reação de Perls

A medula óssea e baço dos animais foram removidos para a reação de Perls, utilizando o kit comercial Easy Path (Erviagas Ltda., São Paulo, Brasil). Lâminas de microscopia com medula óssea e baço foram fixadas com etanol, embebidas em ácido clorídrico e ferricianeto de potássio durante 30 min, e coradas com corante Carmalumem Mayer durante 5 min. Cada lâmina foi avaliada de forma aleatória (100 campos) usando microscopia de luz (100 X). As partículas de ferro férrico foram identificadas como pontos azuis. A presença de ferro na medula óssea e no baço foi classificada da seguinte maneira (Rosai, 1996):

Score	Crítérios
0	Ausência grânulos de ferro
1+	Poucos grânulos de ferro
2+	Presença de grânulos de ferro (em 10% dos campos analisados)
3+	Presença de grânulos de ferro (em 50% dos campos analisados)
4+	Excesso de grânulos de ferro

4.4.8.1 Análise morfométrica do baço

A partir de cortes histológicos do baço corados por hematoxilina-eosina foi possível realizar estudo morfométrico deste tecido. A análise morfométrica foi realizada para a avaliação do percentual de pigmentos férricos de hemossiderina contidos em cada amostra esplênica, utilizando um sistema

captador de imagens de alta resolução. No total, capturaram-se dez campos de cada amostra obtidos da região da polpa vermelha. A partir da média dos dez campos analisados obteve-se o percentual médio da concentração de ferro no baço de cada animal. A mensuração foi analisada com o software *Image ProPlus*[®], utilizando-se calibragem para o microscópio empregado.

4.4.9 Coleta de material para avaliação histopatológica

Após a eutanásia dos animais pertencentes aos diferentes tratamentos foi realizada a avaliação macroscópica de possíveis lesões e coleta de órgãos para análise histológica. Dentre estes órgãos, foram coletados o timo, baço e a medula óssea dos animais para avaliação de possíveis lesões microscópicas a partir de cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina.

4.4.10 Obtenção das células mononucleares

As células totais da medula óssea foram obtidas conforme o **item 4.4.4**. Após a coleta, a suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e ressuspensa em 3 mL de meio RPMI. Adicionou-se à suspensão celular 3 mL de Fycoll-Hypaque e, em seguida, a suspensão foi novamente centrifugada por 30 minutos a 3000 rpm para a separação das células mononucleares. A neutralização do Fycoll-Hypaque foi realizada a partir da lavagem da suspensão celular com meio RPMI, seguida de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Após a lavagem, o sedimento celular foi ressuspensa em 1 mL de PBS e viabilidade foi avaliada com o azul de Tripán 1% em hemocítômetro de Neubauer.

4.4.10.1 Ensaios clonogênicos

Após a coleta, a suspensão de células totais foi submetida à separação em células mononucleares conforme descrito no **item 4.4.10**. Foram plaqueadas, em triplicata, 2×10^5 células/poço em meio metilcelulose (Methocult[®]) enriquecido com fatores de crescimento (rh IL-3, rh IL-6, rh EPO e rh SCF) em um volume final de 1 ml/poço. Foram utilizadas placas de cultura de plásticos de 35 mm de diâmetro.

As placas foram mantidas por 21 dias a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Como controle negativo, foram plaqueadas, em triplicata, 2×10^5 células/poço contendo todos os reagentes, exceto fatores de crescimento.

O número de colônias, além do número de células viáveis e a morfologia, foram avaliados em microscópio invertido nos períodos de 7°, 14° e 21° dias de cultura.

As colônias foram definidas, inicialmente, pelo seu aspecto morfológico e separadas em CFU-GM (unidade formadora de colônias de granulócitos e /ou macrófagos), BFU-E (unidades formadoras de explosão eritróides) e CFU-E (unidades formadoras de colônias eritróides).

4.4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *Graph Pad Prism 5*. Os dados foram, primeiramente, submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos e não paramétricos. Em seguida, utilizou-se o teste *One-way Anova* seguido do teste de *Dunnnett* para comparação entre os grupos controle, tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração e grupo PF.

As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

Delineamento Experimental e Resultados

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os experimentos realizados e os resultados obtidos.

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *S. occidentalis* ADMINISTRADA NA RAÇÃO DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, EXPERIMENTAIS E PF.

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos com aproximadamente 90 dias de idade, separados em grupos tratados, respectivamente com 0% (Co), 0,5% (So0,5%), 1% (So1%) e 2% (So2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração por 90 dias e grupo PF. Durante todo o período experimental fez-se a avaliação do ganho de peso e consumo de ração e água (item 4.4.2).

No último dia de experimentação (91^o) procedeu-se a eutanásia dos animais a partir do aprofundamento anestésico com a solução de cetamina e xilazina (5,0 e 50 mg/Kg, respectivamente) por via intraperitoneal. Após a eutanásia dos animais, foram coletados o timo, baço e a medula óssea. Procedeu-se, então, a determinação do peso relativo do baço e timo bem como a celularidade do baço e medula óssea (itens 4.4.3 e 4.4.4).

5.1.1 Resultados

A **Tabela 1** mostra o peso médio semanal dos ratos pertencentes aos diferentes grupos utilizados neste estudo. A análise de variância empregada apontou alterações significantes entre os grupos de animais em relação ao tratamento ($F = 7,93$; $df = 4$ com $p < 0,05$). A aplicação do teste de *Dunnnett* mostrou que ratos tratados com 1% de *S. occidentalis* na ração (So1%) apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo controle no ganho

de peso no período equivalente a 6^o e 7^o semanas ($p < 0,05$). O teste apontou, ainda, redução significativa ($p < 0,05$) de peso nas 6^o, 7^o, 8^o, 9^o, 10^o, 11^o e 12^o semanas de tratamento no grupo So2% em relação aos animais pertencentes ao grupo controle.

Tabela 1. Peso médio (em gramas) semanal de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias (12 semanas).

Peso médio semanal					
Período (Semanas)	<i>Senna occidentalis</i> (%)				
	0%	0,5%	1%	2%	PF
1	376,52 ± 6,87	393,76 ± 4,12	353,38 ± 5,36	345,38 ± 3,53	350,84 ± 5,39
2	352,03 ± 5,01	397,33 ± 8,60	358,76 ± 6,50	328,30 ± 4,18	372,15 ± 7,41
3	375,91 ± 5,52	370,66 ± 8,36	344,53 ± 7,29	349,30 ± 4,36	356,84 ± 4,09
4	341,43 ± 4,07	382,01 ± 7,29	364,23 ± 5,55	342,07 ± 6,60	339,92 ± 4,67
5	373,45 ± 6,38	379,06 ± 5,91	367,92 ± 5,90	324,23 ± 3,33	378,23 ± 5,44
6	404,94 ± 6,81	359,38 ± 4,34	337,53 ± 4,53*	313,69 ± 3,99*	357,84 ± 3,71
7	389,83 ± 7,56	363,07 ± 6,69	375,30 ± 5,37*	320,53 ± 2,25*	378,07 ± 6,15
8	359,99 ± 4,67	372,61 ± 5,41	362,23 ± 6,36	320,92 ± 6,74*	331,07 ± 4,86
9	368,10 ± 4,28	363,00 ± 5,54	353,07 ± 4,19	315,53 ± 4,79*	371,46 ± 5,01
10	360,88 ± 5,33	394,92 ± 6,52	362,69 ± 5,99	318,76 ± 6,53*	363,84 ± 6,22
11	401,14 ± 2,81	384,55 ± 5,02	362,00 ± 4,17	313,76 ± 4,01*	362,15 ± 4,23
12	389,38 ± 7,45	399,90 ± 4,55	357,69 ± 4,85	315,76 ± 6,12*	360,23 ± 5,09

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnnett*.

A **Figura 7** ilustra o consumo médio semanal de ração de ratos tratados ou não com diferentes concentrações de sementes *S. occidentalis* durante 90 dias. Em relação ao consumo de ração destes animais, as análises de variância realizadas revelaram haver diferença significativa somente entre os grupos controle e So2% durante o período de tratamento ($F= 23,40$; $df = 4$ com $p<0,05$). O consumo dos animais do grupo PF foi idêntico àqueles dos ratos submetidos à administração de ração contendo 2% de sementes de *S. occidentalis*.

Figura 7. Consumo médio (em gramas) semanal de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=10$ /grupo).

* $p<0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

A **Tabela 2** mostra e a **Figura 8** ilustra o consumo total de água de ratos machos tratados ou não com diferentes concentrações (0,5%, 1% e 2%) de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. A análise de variância empregada (ANOVA) revelou haver diferenças significantes entre os grupos durante todo o período de tratamento ($F = 135,97$ e $df = 4$, $p\leq 0,05$). A aplicação do teste de *Dunnett* apontou diminuição significativa no consumo de água dos animais pertencentes ao grupo So2% quando comparados aos animais do grupo controle.

Tabela 2. Consumo total de água (em mL) de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Consumo total de água (mililitros - mL)				
<i>Senna occidentalis</i> (%)				
0%	0,5%	1%	2%	PF
511,0 ± 4,0	476,3 ± 4,0	454,7 ± 4,1	399,4 ± 4,0*	447,5 ± 3,9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Figura 8. Consumo total de água (em mL) de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

A **Tabela 3** mostra e a **Figura 9** ilustra os resultados obtidos na avaliação do peso relativo do baço dos animais tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. A aplicação do teste de *Dunnett* apontou aumento significativo ($F= 2,912$; $df = 4$ com $p<0,05$) no peso relativo do baço dos animais pertencentes ao grupo So2% quando comparados aos animais do grupo controle.

Tabela 3. Peso relativo do baço de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Peso relativo de baço (g/100g de peso vivo)				
<i>Senna occidentalis</i> (%)				
0%	0,5%	1%	2%	PF
0,1867 ± 0,042	0,2028 ± 0,024	0,1820 ± 0,019	0,2179 ± 0,026*	0,1878 ± 0,014

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

* $p<0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Figura 9. Peso relativo do baço de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

* $p<0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

A **Tabela 4** mostra e a **Figura 10** ilustra que o teste estatístico empregado (ANOVA) revelou não haver diferenças significantes do peso relativo do timo em ratos tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração.

Tabela 4. Peso relativo do timo de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Peso relativo do timo (g/100g de peso vivo)				
<i>Senna occidentalis</i> (%)				
0%	0,5%	1%	2%	PF
0,077 ± 0,019	0,0767 ± 0,018	0,0717 ± 0,019	0,0743 ± 0,016	0,0624 ± 0,008

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

Figura 10. Peso relativo do timo de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

A **Tabela 5** mostra e a **Figura 11** ilustra a celularidade do baço de ratos machos tratados com as diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. A análise estatística apontou diferença significativa ($F = 3,274$; $df = 4$ com $p < 0,05$) na celularidade deste órgão linfóide. A aplicação do teste de *Dunnett* apontou diminuição significativa na celularidade do baço em animais tratados com 2% de *S. occidentalis* na ração quando comparado ao grupo controle.

Tabela 5. Celularidade do baço de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Celularidade do baço (Esplenócitos $\times 10^7$ /g de baço)				
<i>Senna occidentalis</i> (%)				
0%	0,5%	1%	2%	PF
$6,63 \pm 5,15$	$3,80 \pm 2,90$	$3,75 \pm 2,06$	$2,32 \pm 1,47^*$	$5,00 \pm 4,61$

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=10$ /grupo).

* $p < 0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Figura 11. Celularidade do baço de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão ($n=10$ /grupo).

* $p < 0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

A **Tabela 6** mostra e a **Figura 12** ilustra a celularidade da medula óssea de ratos tratados com as diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. A análise estatística apontou diferença significativa ($F= 1,842$; $df = 4$ com $p<0,05$) na celularidade deste órgão linfóide. A aplicação do teste de *Dunnett* apontou diminuição significativa na celularidade da medula em animais tratados com 2% de *Senna occidentalis* na ração quando comparado ao grupo controle.

Tabela 6. Celularidade da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Celularidade de medula óssea (Células x 10 ⁷)				
<i>Senna occidentalis</i> (%)				
0%	0,5%	1%	2%	PF
2,25 ± 0,60	1,91 ± 0,51	1,86 ± 0,82	1,47 ± 0,71*	2,05 ± 0,55

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

* $p<0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Figura 12. Celularidade da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

* $p<0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS E DA BIOQUÍMICA SÉRICA EM ANIMAIS TRATADOS COM SEMENTES DE *S. occidentalis* NA RAÇÃO DURANTE 90 DIAS.

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos com aproximadamente 90 dias de idade, separados em grupos tratados, respectivamente com 0% (Co), 0,5% (So0,5%), 1% (So1%) e 2% (So2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração por 90 dias e grupo PF.

No último dia de experimentação (91^o) os animais foram anestesiados para coleta de sangue total para a realização do hemograma, contagem de reticulócitos e bioquímica sérica (itens 4.4.5 e 4.4.6). Após a coleta, procedeu-se a eutanásia a partir do aprofundamento anestésico.

5.2.1 Resultados

Os resultados dos efeitos da administração de ração contendo diferentes concentrações de sementes de *S. occidentalis* sobre os parâmetros hematológicos de ratos são apresentados nas **Tabela 7 e 8**. O número médio de eritrócitos e leucócitos, os valores médios de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), e a contagem de reticulócitos são apresentados. A análise estatística revelou haver diferença significativa nos índices de hemoglobina ($F = 6,214$, $df = 4$, $p < 0,005$), VCM ($F = 6,516$, $df = 4$, $p < 0,005$) e HCM ($F = 6,173$, $df = 4$, $p < 0,005$) nos animais tratados com 2% de *S. occidentalis* na ração quando comparados ao grupo controle. O mesmo teste apontou diminuição significativa no número total de eritrócitos ($F = 3,461$, $df = 4$, $p < 0,005$) e leucócitos totais ($F = 3,182$, $df = 4$, $p < 0,005$) no grupo So2% quando comparados ao grupo controle. No entanto, não houve diferenças significantes na contagem diferencial de leucócitos nos animais tratados quando comparados aos respectivos controles. Em relação aos reticulócitos observou-se aumento

significante destas células nos grupos So1% e So2% quando comparados ao grupo controle.

Os resultados relativos à bioquímica são apresentados na **Tabela 9**. A análise estatística revelou haver diferenças estatísticas nos parâmetros de creatinina nos grupo So2% quando comparados ao grupo controle. O mesmo teste apontou diminuição significativa ($p < 0,005$) na dosagem de albumina nos animais do grupo So1% e So2% quando comparados aos animais controles. A análise estatística empregada revelou, ainda, haver diferenças significantes no colesterol total do grupo So2% quando comparados ao grupo controle.

Tabela 7. Avaliação do hemograma completo de ratos machis tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Grupos	Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($10^6/\text{mm}^3$)
Co	6,59 $\pm$ 1,40	9,59 $\pm$ 0,63	790,22 $\pm$ 83,54
0,5%	5,13 $\pm$ 1,62	9,10 $\pm$ 0,94	808,20 $\pm$ 52,94
1%	5,24 $\pm$ 1,23	8,16 $\pm$ 0,80	781,90 $\pm$ 70,54
2%	4,56 $\pm$ 1,15*	7,74 $\pm$ 1,02*	866,11 $\pm$ 72,65
PF	5,28 $\pm$ 1,42	8,20 $\pm$ 1,10	751,10 $\pm$ 100,79

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

* $p < 0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Tabela 8. Avaliação dos índices hematimétricos de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Grupo	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (μ^3)	HCM ($\mu\mu\text{g}$)	Ret (%)
Co	17,21 $\pm$ 2,31	45,49 $\pm$ 4,69	53,88 $\pm$ 2,76	20,51 $\pm$ 5,31	5,10 $\pm$ 0,87
0,5%	16,73 $\pm$ 0,75	45,77 $\pm$ 3,99	53,20 $\pm$ 3,90	19,47 $\pm$ 5,40	3,08 $\pm$ 0,21*
1%	16,31 $\pm$ 1,83	45,55 $\pm$ 4,60	53,54 $\pm$ 3,32	19,65 $\pm$ 5,40	8,23 $\pm$ 1,05*
2%	15,42 $\pm$ 1,32*	43,28 $\pm$ 3,55	50,03 $\pm$ 2,61*	18,52 $\pm$ 6,31*	10,21 $\pm$ 0,58*
PF	15,97 $\pm$ 1,04	43,64 $\pm$ 2,80	52,81 $\pm$ 2,88	19,81 $\pm$ 5,37	5,40 $\pm$ 1,12*

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Tabela 9. Avaliação da bioquímica sérica de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Bioquímica sérica					
	<i>Senna occidentalis</i> (%)				
	0%	0,5%	1%	2%	PF
AST (U/L)	162,11 $\pm$ 37,6	153,44 $\pm$ 41,19	160,60 $\pm$ 27,66	147,56 $\pm$ 18,77	152,10 $\pm$ 37,50
ALT (U/L)	40,89 $\pm$ 9,54	43,11 $\pm$ 12,47	48,00 $\pm$ 19,42	42,78 $\pm$ 8,02	44,00 $\pm$ 9,71
Uréia (mg/dL)	75,22 $\pm$ 12,09	81,67 $\pm$ 15,99	71,00 $\pm$ 10,29	78,78 $\pm$ 16,88	73,70 $\pm$ 0,38
Creatinina (mg/dL)	0,95 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,17	0,81 $\pm$ 0,10	0,76 $\pm$ 0,09*	0,88 $\pm$ 0,08
Albumina (g/dL)	2,78 $\pm$ 0,08	2,74 $\pm$ 0,11	2,61 $\pm$ 0,12*	2,60 $\pm$ 0,08*	2,63 $\pm$ 0,10
Proteína total (g/dL)	5,52 $\pm$ 0,41	5,49 $\pm$ 0,59	5,31 $\pm$ 0,48	5,46 $\pm$ 0,58	5,63 $\pm$ 0,56
Glicose (mg/dL)	263,2 $\pm$ 60,10	276,56 $\pm$ 41,29	275,30 $\pm$ 44,46	247,89 $\pm$ 65,04	248,40 $\pm$ 50,67
Colesterol (mg/dL)	95,11 $\pm$ 8,03	99,33 $\pm$ 14,30	88,40 $\pm$ 10,37	71,67 $\pm$ 16,88*	73,70 $\pm$ 11,28
Triglicérides(mg/dL)	70,0 $\pm$ 25,18	80,89 $\pm$ 20,53	62,70 $\pm$ 16,27	63,67 $\pm$ 31,70	72,40 $\pm$ 17,92

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO MIELOGRAMA, DO ESTOQUE DE FERRO E DA HISTOPATOLOGIA DO TIMO, BAÇO E MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS TRATADOS COM SEMENTES DE *S. occidentalis* NA RAÇÃO DURANTE 90 DIAS.

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos com aproximadamente 90 dias de idade, separados em grupos tratados, respectivamente com 0% (Co), 0,5% (So0,5%), 1% (So1%) e 2% (So2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração por 90 dias e grupo PF.

No último dia de experimentação (91^o) procedeu-se a eutanásia dos animais a partir do aprofundamento anestésico com a solução de cetamina e xilazina (5,0 e 50 mg/Kg, respectivamente) por via intraperitoneal. Após a eutanásia dos animais, foram coletados o timo, baço e a medula óssea. Procedeu-se, então, a realização do mielograma (item 4.4.7), a reação de Perls (item 4.4.8), análise morfométrica do baço (item 4.4.8.1) e avaliação histopatológica dos tecidos coletados (item 4.4.9).

5.3.1 Resultados

Conforme descrito, anteriormente, no **item 4.4.7**, para a análise do mielograma as células totais foram reunidas em diferentes grupos de acordo com suas características morfológicas, nucleares e citoplasmáticas. A avaliação da **série eritróide** (eritroblastos jovens, eritroblastos policromáticos e ortocromáticos) revelou um aumento progressivo e estatisticamente significativo na porcentagem de eritroblastos jovens ($F = 37,56$ e $df = 4,29$) e policromáticos ($F = 3,72$ e $df = 4,29$) em animais tratados com as diferentes concentrações de *S. occidentalis* quando comparados aos ratos pertencentes ao grupo controle; no entanto, o teste estatístico empregado (ANOVA) não revelou nenhuma diferença significativa em relação à porcentagem de eritroblastos ortocromáticos em animais pertencentes aos grupos controle e tratados. Na **série granulocítica** observou-se redução estatisticamente significativa na

porcentagem de células blásticas ($F = 9,14$ e $df = 4,29$) bem como de formas jovens ($F = 16,64$ e $df = 4,29$), formas em anel ($F = 50,48$ e $df = 4,29$) e nas formas segmentadas ($F = 25,52$ e $df = 4,29$). Em relação à **série linfocitária** o teste estatístico empregado apontou redução significativa ($F = 15,22$ e $df = 4,29$) na porcentagem de linfócitos em animais tratados com 0,5% e 1,0% de *S. occidentalis* na ração quando comparados ao ratos do grupo controle. Não foram observadas alterações significantes na porcentagem de células pertencentes às linhagens **monomacrofágica** e **megacariocítica**.

Os resultados relativos à porcentagem dos diferentes tipos celulares observados no mielograma de animais do grupo controle, tratados e PF são apresentados nas **Figuras 13 a 15**, a seguir:

Figura 13. Série eritróide da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. **A)** Porcentagem de eritroblastos jovens. **B)** Porcentagem de eritroblastos ortocromáticos. **C)** Porcentagem de eritroblastos ortocromáticos.

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

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

Figura 14. Série granulocítica da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. **A)** Porcentagem de blastos jovens. **B)** Porcentagem de formas jovens. **C)** Porcentagem de formas em anel. **D)** Porcentagem de formas segmentadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

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

Figura 15. Contagem diferencial de células das séries monomacrofágica, linfocitária e megacariocítica da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. **A)** Porcentagem de monócitos. **B)** Porcentagem de linfócitos. **C)** Porcentagem de megacariócitos.

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo).

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

Uma vez que a contagem de células de medula óssea é concluída, a razão M/E deve ser avaliada. Isso é feito por meio do cálculo do total de precursores mielóides em proporção ao total de precursores eritróides. Um índice igual a um determina que ambas as populações sejam iguais em números; índices acima indicam uma predominância das células mielóides enquanto que valores inferiores indicam que as células eritróides são mais numerosas.

Observou-se uma redução estatisticamente significativa ($F = 11,74$ e $df = 4$) na relação M/E da medula óssea nos animais dos diferentes grupos experimentais (0,5%; 1% e 2%) quando comparado aos ratos do grupo controle. Esta diminuição é decorrente do aumento progressivo na porcentagem de eritroblastos jovens e policromáticos em animais tratados com *S. occidentalis* na ração por 90 dias.

A **Tabela 10** mostra e o **Figura 16** ilustra a relação M/E da medula óssea de animais pertencentes aos grupos controle, experimental e PF.

Tabela 10. Relação M/E da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Relação M/E (%)				
<i>Senna occidentalis</i> (%)				
0%	0,5%	1%	2%	PF
3,20 ± 1,50	1,30 ± 0,50*	0,70 ± 0,20*	0,40 ± 0,20*	2,80 ± 0,70

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

* $p < 0,05$ versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Figura 16. Relação M/E da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Para avaliar a presença ou não de ferro na medula óssea e baço de animais pertencentes aos grupos controle, PF e tratados com 0,5%, 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração foi realizada a Reação de Perls. Os resultados foram expressos conforme descrito no **item 4.4.8**. A **Tabela 11**, a seguir, mostra o score de ferro obtido a partir da leitura de cortes histológicos de medula óssea e baço submetidos à Reação de Perls. Observou-se diminuição dos grânulos de ferro na medula óssea e acúmulo de pigmentos férricos no baço.

Tabela 11. Score de ferro da medula óssea e baço de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

	Medula óssea	Baço
Dose	Score	Score
0%	3+	2+
0,5%	3+	2+
1%	2+	3+
2%	1+	4+
PF	3+	2+

0: ausência de grânulos de ferro

1+: poucos grânulos de ferro

2+: presença de grânulos de ferro (em 10% dos campos analisados)

3+: presença de grânulos de ferro (em 50% dos campos analisados)

4+: excesso de grânulos de ferro

O baço dos animais do grupo controle, PF e tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração por 90 dias foram submetidos a análise morfométrica conforme descrito no **item 4.4.8.1**. Observou-se o aumento progressivo do percentual de concentração de ferro (grânulos de hemossiderina) nos diferentes grupos experimentais estudados.

A **Figura 17** ilustra o percentual de hemossiderina encontrado nas amostras esplênicas de cada animal estudado. A análise estatística empregada apontou diferença significativa ($F = 13,88$ e $df = 4,66$) na quantidade de grânulos de hemossiderina em animais tratados com 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração quando comparados aos respectivos controles.

Figura 17. Percentual de grânulos de hemossiderina no baço de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). *p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus grupo PF. ANOVA seguida de teste de *Dunnett*.

Em relação ao estudo histopatológico de fragmentos histológicos provenientes do timo nenhuma alteração morfológica digna de nota foi observada em quaisquer das amostras colhidas dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Por outro lado, a análise morfológica do baço dos animais do grupo So2% apresentou menor celularidade quando comparados ao grupo controle, além de progressiva depleção celular em particular de linfócitos; espessamento de cápsulas e trabéculas. No entanto, tanto o baço de animais do grupo So2% e controle apresentou-se histologicamente preservado.

A **Figura 18**, a seguir, ilustra as alterações observadas no baço de animais pertencentes aos grupos controle e tratados com 2% de *S. occidentalis* na ração por 90 dias.

Figura 18. A) Corte histológico de baço de animal controle, apresentando imagem panorâmica de tecido (4X). **B)** Corte histológico do baço de animal do grupo controle, evidenciando cápsula delimitando parênquima tecidual (40X). **C)** Corte histológico de baço de animal tratado com 2% de *S. occidentalis*, apresentando imagem panorâmica (4X); **D)** Corte histológico de baço de animal do grupo tratado com 2% de *S. occidentalis*, demonstrando espessamento capsular e rarefação linfocitária (40X).

Nos animais tratados com 0,5%, 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração por 90 dias observou-se preservação arquitetural, porém, com aumento progressivo da celularidade, caracterizando a hiperplasia medular. Houve predomínio de células com diferenciação, preferencialmente, eritróide na medula vermelha dos animais tratados quando comparados aos respectivos controles. Estas observações corroboram aos dados obtidos a partir do mielograma destes animais, uma vez que houve redução significativa da razão M/E. A hiperplasia encontrada nos animais tratados, de forma crônica, com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração pode indicar uma provável anemia hemolítica.

A **Figura 19**, a seguir, ilustra cortes histológicos de fêmur de animais pertencentes aos grupos controle e tratados com 0,5%, 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração por 90 dias. As lamínas foram coradas por Hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia óptica (40X).

Figura 19. Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmur de ratos controle e tratados com sementes de *S. occidentalis* (0,5%, 1% e 2%) na ração durante 90 dias. O aumento da densidade celular pode estar associada ao tratamento. As setas indicam um aumento na densidade de células eritróides da medula óssea nos animais expostos à *S. occidentalis*. **A)** Grupo controle. **B)** Grupo So0,5%. **C)** Grupo So1%. **D)** Grupo So2%.

5.4 EXPERIMENTO 4: ENSAIOS CLONOGÊNICOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS TRATADOS COM SEMENTES DE *S. occidentalis* NA RAÇÃO DURANTE 90 DIAS.

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos com aproximadamente 90 dias de idade, separados em grupos tratados, respectivamente com 0% (Co), 0,5% (So0,5%), 1% (So1%) e 2% (So2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração por 90 dias e grupo PF. Durante todo o período experimental fez-se a avaliação do ganho de peso e consumo de ração e água (item 4.4.2).

No último dia de experimentação (91^o) procedeu-se a eutanásia dos animais a partir do aprofundamento anestésico com a solução de cetamina e xilazina (5,0 e 50 mg/Kg, respectivamente) por via intraperitoneal. Após a eutanásia dos animais, foi coletada a medula óssea a partir da lavagem da cavidade femoral com meio apropriado (item 4.4.4) e a suspensão de células totais foi separada em células mononucleares (item 4.4.10) para a realização dos ensaios clonogênicos (item 4.4.10.1).

5.4.1 Resultados

Os ensaios clonogênicos realizados em animais experimentais demonstraram redução de colônias BFU-E e CFU-E, referentes à linhagem eritróide. Esta alteração corrobora aos demais resultados apresentados, anteriormente, em relação à medula óssea, na qual se observou redução na razão M/E e, portanto, a instalação de um processo anêmico em animais tratados de forma crônica com sementes de *S. occidentalis*.

A **Tabela 12** mostra e a **Figura 20** ilustra a porcentagem de colônias BFU-E de ratos tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. A análise estatística apontou diferença significativa na formação de colônias nos diferentes grupos experimentais. A aplicação do teste de *Dunnnett* revelou redução significativa na porcentagem de colônias BFU-E em animais

tratados com 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração quando comparados ao grupo controle nos períodos de 7°, 14° e 21° dias de cultura.

Tabela 12. Colônias BFU-E da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Colônias BFU-E (%)					
<i>S. occidentalis</i> (%)					
Dias de Cultura	0%	0,5%	1%	2%	PF
7	87,60 ± 5,15	84,21 ± 2,90	76,63 ± 2,06*	69,80 ± 1,47*.,#	86,15 ± 4,61
14	92,62 ± 2,90	88,80 ± 1,53	76,42 ± 1,88*	60,81 ± 1,44*.,#	90,35 ± 2,13
21	100,0 ± 1,56	87,33 ± 1,45	69,80 ± 2,23*	53,62 ± 1,87*.,#	92,20 ± 2,21

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus grupo PF. ANOVA seguida de teste de Dunnett.

Figura 20. Colônias BFU-E da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

A **Tabela 13** mostra e a **Figura 21** ilustra a porcentagem de colônias CFU-E de ratos tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. A análise estatística apontou diferença significativa na formação de colônias nos diferentes grupos experimentais. A aplicação do teste de *Dunnnett* revelou redução significativa na porcentagem de colônias CFU-E em animais tratados com 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração quando comparados ao grupo controle nos períodos de 7°, 14° e 21° dias de cultura.

Tabela 13. Colônias CFU-E da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Dias de cultura	Colônias CFU-E (%)				
	<i>S. occidentalis</i> (%)				
	0%	0,5%	1%	2%	PF
7	84,50 ± 2,18	84,20 ± 1,90	70,6 ± 1,98*	70,10 ± 1,57* [#]	88,24 ± 2,61
14	92,61 ± 1,25	85,32 ± 1,53	72,44 ± 1,75*	63,52 ± 2,41* [#]	93,11 ± 2,10
21	96,13 ± 1,96	88,34 ± 1,59	70,53 ± 2,23*	58,12 ± 1,56* [#]	94,53 ± 1,21

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus grupo PF. ANOVA seguida de teste de Dunnett.

Figura 21. Colônias CFU-E da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

Os ensaios clonogênicos realizados em animais experimentais demonstraram, também, redução de colônias CFU-GM referentes à linhagem mielóide. Esta alteração corrobora aos demais resultados apresentados, anteriormente, no qual se observou, a partir do mielograma, redução significativa de células blásticas e de todos os tipos celulares, especialmente,

da linhagem granulocítica em animais tratados de forma crônica com sementes de *S. occidentalis*.

A **Tabela 14** mostra e a **Figura 22** ilustra a porcentagem de colônias CFU-GM de ratos tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. A análise estatística apontou diferença significativa na formação de colônias nos diferentes grupos experimentais. A aplicação do teste de *Dunnett* revelou redução significativa na porcentagem de colônias CFU-GM em animais tratados com 1% e 2% de *S. occidentalis* na ração quando comparados ao grupo controle nos períodos de 7°, 14° e 21° dias de cultura.

Tabela 14. Colônias CFU-GM da medula óssea de ratos machos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias.

Dias de cultura	Colônias CFU-GM (%)				
	<i>S. occidentalis</i> (%)				
	0%	0,5%	1%	2%	PF
7	94,50 ± 2,13	90,20 ± 1,18	71,14 ± 1,18*	70,25 ± 1,66*. [#]	87,22 ± 2,44
14	92,15 ± 1,32	87,39 ± 1,48	69,43 ± 1,26*	60,52 ± 1,21*. [#]	92,10 ± 2,19
21	96,23 ± 2,16	88,34 ± 1,65	70,53 ± 2,13*	59,15 ± 1,26*. [#]	93,55 ± 1,16

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

*p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus grupo PF. ANOVA seguida de teste de Dunnett.

Figura 22. Colônias CFU-GM da medula óssea de ratos tratados com diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1% e 2%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 90 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão (n=10/grupo).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Há mais de duas décadas este laboratório vem se dedicando à pesquisa dos efeitos tóxicos da *S. occidentalis* em vários aspectos e em diferentes espécies animais: aves, ratos, coelhos e caprinos. Nestes estudos, foi possível confirmar os efeitos miotóxicos da planta (O'HARA, PIERCE, 1974a; BARROS et al.; 1990; CAVALIERI et al.; 1997; HARAGUCHI et al.; 1998), que já haviam sido descritos na literatura, bem como evidenciar outros efeitos tóxicos quando da exposição prolongada, inclusive por baixas doses, a saber: hepatotoxicidade (TASAKA et al.; 2000), neurotoxicidade (BARBOSA-FERREIRA 2005); imunotoxicidade (HUEZA et al, 2007) e teratogenicidade. Assim, a presente pesquisa teve como proposta investigar, com maior profundidade, o efeito hematotóxico da *S. occidentalis*, empregando-se o rato como sujeito experimental, haja vista que neste laboratório já havia sido realizado estudo nesta espécie com a planta, eliminando a necessidade de se realizar estudos pilotos para verificar quais seriam as doses para executar a presente pesquisa. Assim, no estudo anterior conduzido em ratos machos tratados com diferentes concentrações (1%, 2%, 3% e 4%) de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 28 dias, observou-se diminuição no consumo de água e ração, bem como no ganho de peso destes animais. Além disto, a avaliação hematológica revelou anemia, depleção de células linfóides e redução da polpa branca do baço em ratos tratados com 2% e 4% de sementes de *S. occidentalis* (MARIANO-SOUZA, 2010).

Diversas pesquisas em diferentes espécies animais têm demonstrado que a exposição a *S. occidentalis* promove anorexia e perda de peso corporal (BARROS et al., 1990). Os dados aqui obtidos indicaram que os ratos do grupo So2% apresentaram redução do peso corporal e alterações, estatisticamente significantes, no consumo de ração, no período de 90 dias de tratamento. Deve ainda ser considerada, no que se refere à queda de peso dos animais expostos à maior dose, a possibilidade destes apresentarem síndrome de má absorção intestinal, já que foram observadas fezes pastosas naqueles animais pertencentes ao grupo So2%, o que poderia ser um indicativo desta afecção. Além disso, a literatura aponta que a administração prolongada de sementes de *S. occidentalis*, em ratos, promove alterações anatômicas ao nível

da mucosa intestinal, levando a alterações funcionais neste órgão (NADAL et al., 2003).

Outro fator que é necessário ponderar, se refere ao fato de que essa redução do peso corporal estaria relacionada às possíveis variações no consumo de ração, haja vista que foi observada anorexia nestes animais; portanto, incluiu-se neste estudo o grupo *pair-feed* (PF), no qual animais receberam a mesma quantidade de ração daqueles do grupo So2%, porém, sem sementes de *S. occidentalis*. Como não houve diferenças significantes do peso corporal de animais pertencentes ao grupo PF quando comparado aos animais que receberam a maior porcentagem de *S. occidentalis* na ração (So2%), pode-se supor que alterações neste parâmetro não estão relacionadas à desnutrição e sim, provavelmente a dois fatores: um deles seria a deficiência absorptiva de nutrientes ao nível do intestino delgado, tanto devido às lesões já descritas, bem como o aumento no trânsito do trato gastrintestinal, que dificultaria o processo de absorção; o outro fator se refere à interferência negativa no metabolismo do animal, promovida pelo princípio ativo tóxico da *S. occidentalis*. Reforçam estas hipóteses o fato de que, neste estudo, os ratos expostos à dieta com 1% e 2% na ração apresentaram redução significativa nos níveis de albumina sérica. Entre os fatores que influenciam na quantidade de albumina na circulação, destacam-se a condição de hidratação e perdas de peso corporal. A diminuição do peso corporal pode levar à diminuição de creatinina sérica também. De fato, a análise estatística empregada revelou uma queda significativa deste parâmetro nos animais do grupo So2%, os quais apresentaram redução do peso corporal quando comparados aos respectivos controles.

Numerosos xenobióticos podem afetar o tecido hematopoiético, tais como metabólitos de benzeno (HIRABAYASHI; INOUE, 2010; HA-YOUNG et al., 2011) e inseticidas organofosforados (CASIDA; QUISTAD, 2005). Do mesmo modo, medicamentos utilizados para o controle de determinadas doenças também podem afetar diretamente o sistema hematopoiético; isto é observado, por exemplo, com os medicamentos empregados no tratamento de câncer, tais como ciclofosfamida e busulfan (RICH; HALL, 2005). Outros estudos têm mostrado que algumas plantas, incluindo aquelas comumente utilizadas para fins medicinais, também podem ser prejudiciais ao tecido

sanguíneo (PAN et al., 1993). Assim, no presente estudo, foram avaliados os efeitos de sementes de *S. occidentalis* em órgãos hematopoiéticos de ratos, tais como medula óssea e baço.

Assim, o presente estudo revelou que o tratamento com 2% de sementes de *S. occidentalis* na ração, durante 90 dias, promoveu redução significativa da celularidade da medula óssea. Este dado aqui obtido corrobora o estudo conduzido por Dugan; Gumbmann (1990), os quais, avaliando outra espécie do gênero *Senna*, *Cassia obtusifolia* (denominação antiga da *Senna obtusifolia*), demonstraram que ratos expostos a sementes desta planta, durante um curto período de tempo (8-9 dias), apresentaram congestão e depleção na medula óssea, com diminuição do número de linfócitos e neutrófilos circulantes.

A hematotoxicidade pode se manifestar a partir de alterações no número de células maduras na medula óssea ou no sangue, sendo possível caracterizá-la pela destruição excessiva ou supressão da produção de células pelo tecido hematopoiético (SHEN et al., 2005). Uma pesquisa anterior, realizada em nosso laboratório, demonstrou que ratos submetidos a 4% de sementes de *S. occidentalis* em sua dieta, durante 14 dias, apresentaram diminuição no número de eritrócitos totais, bem como redução dos índices hematimétricos VCM e HCM (MARIANO-SOUZA et al., 2010). Estes parâmetros são importantes para avaliar o tamanho e conteúdo de hemoglobina no interior das hemácias, respectivamente, e são utilizados para caracterizar os diferentes tipos de anemias. O presente estudo também revelou redução destes parâmetros no grupo So2%. Portanto, verifica-se que essa alteração é observada em ratos expostos à metade da concentração da planta, desde que por um período de exposição maior.

A anemia caracterizada pela redução dos valores de VCM e HCM é denominada de anemia microcítica e hipocrômica (SANTOS; MONTEIRO, 2008; PILNY, 2008). Neste sentido, a redução de HCM é sugestiva de déficit de oxigênio para as células (AKBAS et al, 2005; PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006). Por outro lado, as alterações relacionadas ao VCM são sugestivas de falhas na maturação e na divisão de células progenitoras dos eritrócitos (KEIL et al., 2004; SANTOS; MONTEIRO, 2008). Estes dados relativos à ocorrência de anemia nos ratos aqui estudados coincidem com

aqueles observados em aves (NAKAGE et al., 2000), bem como em ratos tratados com diferentes concentrações de sementes de *S. occidentalis* na ração (AL-YAHYA; AL-FARHAN; ADAM, 2001). Desta maneira, nos experimentos conduzidos por Nakage e colaboradores foram empregados frangos de corte, os quais foram tratados com 0,5% de sementes de *S. occidentalis* na ração durante 28 dias. Os resultados apontaram redução no número de hemácias, no valor do hematócrito e do VCM. Por outro lado, AL-YAHYA e colaboradores, realizaram estudos em ratos machos, os quais foram tratados com extrato de *S. occidentalis* a 5%, na dieta, durante 6 semanas, e observaram um quadro de anemia e leucopenia. Portanto, estes estudos apoiam os dados aqui obtidos.

A inclusão do grupo PF foi, também, de grande valia para a melhor interpretação dos dados relativos à avaliação hematológica. Nesta direção, como os animais que foram tratados com 2% de *S. occidentalis* na ração apresentaram hemácias microcíticas hipocrômicas e a redução significativa no número de eritrócitos e leucócitos totais, mas não os ratos do grupo PF, pode-se inferir que este efeito sobre o sistema hematológico ocorra por ação da toxina presente nesta planta. Portanto, os dados aqui obtidos, relativos aos ratos pertencentes ao grupo PF, permitem discordar daquela suposição, levantada por Adam et al (2001), que propuseram que a anemia, verificada em ratos e em frangos de corte expostos à *S. occidentalis*, estivesse relacionada à alteração do estado nutricional destes animais. Entretanto, é necessário considerar que ratos tratados com a dose maior da planta apresentaram fezes pastosas, bem como maior frequência de defecação, o que poderia causar menor absorção de nutrientes quando comparado aos animais do grupo PF. Assim, futuros experimentos deverão ser conduzidos para melhor inferir sobre o estado nutricional dos ratos e anemia.

Os dados hematológicos obtidos no presente estudo sugerem que a causa principal da diminuição da celularidade da medula óssea poderia estar associada à toxicidade produzida pela *S. occidentalis* sobre o sistema hematopoiético, haja vista as alterações observadas no mielograma dos animais expostos a diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. Neste sentido, observou-se redução estatisticamente significativa na relação M/E da medula óssea nos animais dos diferentes grupos experimentais (0,5%;

1% e 2%) quando comparados aos ratos do grupo controle. Esta diminuição é, provavelmente, devido ao aumento progressivo na porcentagem de eritroblastos jovens e policromáticos em animais tratados com *S. occidentalis* na ração por 90 dias. De acordo com Valli e colaboradores, a redução na razão M/E pode estar associada a uma anemia regenerativa ou eritropoiese ineficaz (VALLI et al., 2002). Desta maneira, a anemia encontrada pode ser considerada uma resposta inicial às injúrias promovidas pela *S. occidentalis* sobre as células do sistema hematopoiético.

O tecido hematopoiético, assim como outros que apresentam elevadas taxas de renovação e proliferação celular, necessita de uma maior demanda de nutrientes, tais como ferro (AKMAN et al., 2004). Desta forma, a reação de Perls foi realizada, no presente estudo, para avaliar os estoques de ferro na medula óssea e baço de animais expostos as diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração. Verificou-se que houve redução no escore de ferro na medula óssea de animais dos grupos So1% e So2%, em comparação aos respectivos controles. De acordo com a literatura, a redução na quantidade de grânulos de ferro na medula óssea pode estar associada à reduzida taxa de liberação deste elemento pelos macrófagos esplênicos. Assim, há menor disponibilidade de ferro para o desenvolvimento de eritroblastos e acúmulo de ferro, na forma de hemossiderina, em outros tecidos como o baço (MOURA et al., 1998). Estas informações corroboram os resultados aqui obtidos, os quais revelaram o aumento no depósito de ferro em amostras de baço de animais provenientes do grupo So2%.

Desta maneira, considerando todos os resultados obtidos no presente estudo, é possível teorizar que a administração prolongada de sementes *S. occidentalis* na ração, durante 90 dias, pode promover anemia microcítica. Uma variedade de processos tem sido associada à patogênese da anemia microcítica, incluindo o desvio no transporte de ferro do soro para o sistema reticuloendotelial, diminuição de eritropoietina e, ainda, redução da sobrevivência de glóbulos vermelhos na circulação (BRITTENHAM, 2000). Outros estudos têm demonstrado que a hipoferremia associada ao aumento da retenção e armazenamento de ferro dentro do sistema reticuloendotelial reduz a disponibilidade deste elemento para a eritropoiese; uma característica central

para o desenvolvimento deste tipo de anemia (ANDREWS, 1999; SHETH; BRITTENHAM, 2000).

A análise diagnóstica da medula óssea compreende, classicamente, a citologia. Mais recentemente, tornou-se rotina o estudo histológico. Desde o início, tentou-se integrar estes dados, pois, enquanto a citologia fornece uma análise mais detalhada das características das células e permite quantificá-las, a biópsia, por analisar o tecido como um todo permite o estudo da estrutura do tecido hematopoiético (TRAVLOS, 2006). A análise histológica da medula óssea fornece, ainda, importantes informações acerca de possíveis efeitos tóxicos sobre o sistema hematopoiético. Nesta pesquisa, observou-se que os animais, de todos os grupos tratados com a planta, apresentaram hiperplasia eritróide na medula óssea. Na maioria das espécies, a hiperplasia da linhagem eritróide sugere, geralmente, uma resposta à anemia (SHETH; BRITTENHAM, 2000; TRAVLOS, 2006).

É sabido que a medula óssea apresenta padrões de celularidade que são, relativamente, independentes das flutuações fisiológicas. Contudo, a fisiopatologia deste fenômeno até o momento é desconhecida e, portanto, não se sabe se estes efeitos estariam relacionados à ação específica sobre a eritropoiese ou como uma resposta secundária à diminuição de outras linhagens precursoras na medula óssea. No presente trabalho, observou-se redução na porcentagem de colônias BFU-E e CFU-E naqueles ratos pertencentes aos grupos experimentais, indicando um provável efeito tóxico da *S. occidentalis* sobre progenitores medulares eritróides. Estas alterações corroboram os dados do mielograma de animais dos grupos experimentais, os quais apresentaram redução significativa da razão M/E, com predomínio de células blásticas da série eritróide. O aumento progressivo de eritroblastos jovens na medula óssea indica uma provável anemia regenerativa, haja vista a elevação na porcentagem de reticulócitos nos animais tratados quando comparados aos respectivos controles.

No presente estudo, verificou-se que o tratamento com doses repetidas, durante 90 dias, com sementes de *S. occidentalis*, promoveu redução significativa na contagem de leucócitos totais em animais pertencentes ao grupo So2% e, ainda, diminuição de células da linhagem linfocítica na medula óssea de ratos tratados com 0,5% e 1% de sementes de *S. occidentalis* na

dieta. Essas alterações poderiam estar relacionadas ao estresse medular promovido pelo tratamento prolongado com *S. occidentalis*. De fato, estudos demonstram que, mediante situações de estresse, ocorre redução de leucócitos periféricos e migração temporária destas células do sangue para os tecidos (DHABHAR; MCEWEN, 1997). Em condições de estresse crônico, os linfócitos podem migrar para a medula óssea, talvez como uma medida protetora contra os efeitos nocivos mediados por elevados índices de glicocorticoides circulantes (FRIEDMAN; IRWIN, 1995). Assim, o estresse pode influenciar na defesa por meio da mobilização de linfócitos. Esta pesquisa revelou uma variação importante nos linfócitos em esfregaços de medula óssea em animais expostos a *S. occidentalis* na dieta, no entanto, neste momento não seria possível precisar qual(is) o mecanismo(s) poderiam estar envolvido(s). Todavia, uma suposição seria a de que tal efeito está associado à toxicidade promovida pelo tratamento crônico com sementes de *S. occidentalis*.

Deve-se considerar que as manifestações tóxicas sobre as células de órgãos hematopoiéticos, especialmente nas linhagens eritróides, levam a mudanças críticas no citoesqueleto, favorecendo o sequestro destas células pelo baço (PAULUHN, 2004). Em relação a este órgão, é importante ressaltar que em algumas espécies de animais, incluindo o rato, o baço possui capacidade de remover, de maneira efetiva, células degeneradas, eritrócitos senis e, ainda, materiais particulados e bactérias circulantes. Estes atributos tornam o baço um órgão alvo para toxicidade direta e indireta (SUTTIE, 2006). Deste modo, parâmetros gerais, tais como peso relativo deste órgão, possuem papel importante como indicador primário da ocorrência de imunotoxicidade direta.

No presente estudo, verificou-se aumento do peso relativo do baço em animais do grupo So2%, da mesma maneira que o observado pela pesquisa, também conduzida neste laboratório, quando os ratos foram tratados durante 28 dias com So4% (MARIANO-SOUZA et al., 2010). Uma das hipóteses que poderia justificar esta alteração seria a ocorrência de proliferação hematopoiética extramedular. É sabido que, em condições normais, o baço de roedores contribui em 10% para a hematopoiese; entretanto, quando exposto a hematotóxicos, este órgão passa a responder por 80% da produção total de eritrócitos, superando a produção realizada pela

medula óssea (PAULUHN, 2004). Outra hipótese relacionada seria a de que o aumento deste órgão seria uma resposta à injúria indireta de *S. occidentalis* sobre o tecido hematopoiético, em particular, sobre os eritrócitos. Desta forma, estas células seriam removidas da circulação e destruídas pelos macrófagos esplênicos, refletindo no aumento do seu tamanho (PILNY, 2008).

O tratamento prolongado por 90 dias com sementes de *S. occidentalis* promoveu, também, redução significativa na celularidade do baço, bem como alterações anatomopatológicas, incluindo espessamento de cápsula e rarefação celular. Os achados morfológicos aqui obtidos sugerem que a toxicidade promovida por *S. occidentalis* tenha induzido mudanças compatíveis com as desordens mieloproliferativas. De fato, estudos conduzidos com diferentes xenobióticos apontam que a incidência de esplenomegalia e a ocorrência de hematopoiese extramedular são compatíveis com as desordens mieloproliferativas (FORTOUL et al., 2008). Estas desordens estão relacionadas ao comprometimento da enzima heme-oxigenase, responsável pelo controle das espécies reativas de oxigênio (EROS) na biossíntese do heme (RYTER; TYRRELL, 2000). Assim, o aumento ou diminuição de EROS durante esta síntese pode interferir no número de receptores e nos genes que coordenam as etapas de sinalização, mitose e transcrição, contribuindo para a maturação e produção ineficiente de eritrócitos.

Vários são os estudos que, utilizando microscopia eletrônica, relatam danos mitocondriais em fibras musculares promovidos pela administração de *S. occidentalis* (GRAZIANO et al., 1983; CALORE et al., 1997; HARAGUCHI et al., 1998; TASAKA et al., 2000). Deste modo, estes autores sugeriram que a miopatia seria uma causa secundária relacionada aos efeitos tóxicos promovidos pela planta na função das mitocôndrias. Estudos demonstram que alguns princípios ativos de *S. occidentalis*, tais como a diantrona, poderiam interferir negativamente no metabolismo das mitocôndrias ao inibir a oxidação do NADH e o transporte de elétrons. Como consequência, ocorreria desacoplamento de fosforilação oxidativa e formação de superóxido, o qual é convertido a H_2O_2 na presença da enzima superóxido dismutase (CHANCE et al., 1979). De fato, estudos realizados em pintinhos (HARAGUCHI et al., 1998) e ratos (CALORE et al., 2000) tratados com sementes de *S. occidentalis* evidenciaram que estes animais exibiram maior número de fibras COX-

negativas e diminuição da SDH e da atividade NADH-tr. Assim, a intoxicação aqui observada poderia estar associada ao mesmo mecanismo, isto é, ao estresse oxidativo. Reforça esta posição a correlação entre doença mieloproliferativa e estresse oxidativo, como proposto por Farquhar e Bowen (2003).

Outra possibilidade seria de que, considerando que o ferro livre desempenha um papel fundamental na geração de radicais livres através da reação de Fenton (WINTERBOURN, 1995), pode-se levantar a hipótese que o efeito observado nesta pesquisa esteja relacionado à sobrecarga de ferro. Robustece esta suposição o fato de que a sobrecarga de ferro contribuiu para a geração de complexo de ferro de baixo peso molecular ou não ligado a transferrina que, por sua vez, é mais facilmente absorvido pelas células (BREUER et al., 2000; BRISSOT; LORÉAL, 2002). A captação de ferro não ligado a transferrina favorece o dano oxidativo, a eritropoiese ineficaz e a anemia (JENSEN et al., 1996). Aqui, neste estudo, observou-se sobrecarga de ferro no baço de animais pertencentes ao grupo So2 e disponibilidade reduzida deste elemento para a medula óssea, indicando um provável transporte de ferro inadequado.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a reutilização de ferro pelas células reticuloendoteliais do baço é inibida pelo excesso de cobre (AISEN, 1990). Neste sentido, um estudo, conduzido por Theil e colaboradores revelou que o excesso de cobre em ovinos promoveu aumento da concentração de ferro plasmático, da saturação de transferrina e do conteúdo de ferro e ferritina no baço, provavelmente, devido ao bloqueio no reaproveitamento de ferro por este órgão (THEIL; CALVERT, 1978). A deficiência, assim como o excesso de cobre, ocasiona efeitos deletérios no metabolismo do ferro, os quais podem resultar em anemia (LEE et al., 1976; BOSIO et al., 2002). Assim, estudos futuros devem ser realizados para determinar se o resultado da intoxicação por *S. occidentalis* observada foi devido ao estresse oxidativo, à sobrecarga de ferro, ou ambos os mecanismos.

Concluindo, esta pesquisa, a qual se propôs avaliar os efeitos da *S.occidentalis* sobre o sistema hematopoiético, não só permitiu revelar os efeitos hematotóxicos da planta, mas também propiciou gerar uma proposta para a inserção de protocolo para avaliação, em estudos pré-clínicos, de

efeitos potenciais e riscos para o ser humano de novos medicamentos ou fitoterápicos, haja vista que até o presente momento não existem protocolos para a avaliação sobre a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas primitivas ou linhagens celulares definidas.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- A diminuição do peso nos animais do grupo So2% não está, exclusivamente, relacionada ao menor consumo de ração, mas também em função da ação dos princípios tóxicos da planta, os quais atuaram de forma negativa no metabolismo animal;
- A ação da *S. occidentalis* foi capaz de alterar o funcionamento normal do sistema hematológico em animais tratados com a maior concentração de sementes desta planta, induzindo à anemia microcítica e hipocrômica e leucopenia;
- A *S. occidentalis* induziu redução da celularidade da medula óssea e baço nos animais do grupo So2%;
- O tratamento com doses repetidas, durante 90 dias, com sementes de *S. occidentalis* promoveu alterações no mielograma de animais expostos a 2% de sementes desta planta na dieta;
- A ação da *S. occidentalis* foi capaz de alterar, indiretamente, o metabolismo de ferro, promovendo acúmulo de hemossiderina no baço de animais do grupo So2%;
- A diminuição da porcentagem de colônias BFU-E e CFU-E poderia indicar um provável efeito tóxico da *S. occidentalis* sobre os progenitores mielóides;
- O tratamento crônico com sementes de *S. occidentalis* promoveu alterações histológicas no baço e medula óssea em animais do grupo So2%;
- A *S. occidentalis* tem ação hematotóxica.

Referências

REFERÊNCIAS

ACCORSI, W.R. Medicina natural, um novo conceito. A fórmula: guia de negócios. v. 2, n. 4, p. 5, 2000.

ADAM, S.E; AL-YAHYA, M.A.; AL-FARHAN, A.H. Combined toxicity of *Cassia occidentalis* and *Citrullus colocynthis* in rats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, p. 70-72, 2001.

AISEN, P. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. In: Ponka, P., Woodworth, R.C., Schulman, H.M. (Eds.), **Iron Transport and Storage**. CRC Press, Boca Raton, p. 281-295, 1990.

AKBAS, S.H.; OZDEM, S.; CAGLAR, S.; TUYUCENCER, M.; GURKAN, A.; YUCETIN, L.; SENOL, Y.; DEMIRBAS, A.; GULTEKIN, M.; ERSOY, F.F; AKAYDIN, M. Effects of some hematological parameters on whole blood tacrolimus concentration measured by two immunoassay-based analytical methods. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 552-557, 2005.

AKMAN M, CEBECI D, OKUR V, ANGIN H, ABALI O; AKMAN AC. The effects of iron deficiency on infants' developmental test performance. **Acta Paediatr**, v. 93, p. 1391-96, 2004.

ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista Educação Continuada CRMV/SP**, v. 5, p. 192-205, 2002.

AL-YAHYA, MA.; AL-FARHAN, A.H.; ADAM, S.E. Toxicological interactions of *Cassia senna* and *Nerium oleander* in the diet of rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 30, n. 4, p. 579-587, 2002.

ANDREWS, N.C. A genetic view of iron homeostasis. **Semin Hematol**, v. 39, n. 4, p. 227-34, 2002.

ARAGÃO TP. Cassia Virgínica® (*Cassia occidentalis* L.): abordagem farmacológica e toxicológica. [Dissertação]. Recife: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C.. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a saúde**, Londrina, v.5, n. 2, p. 1-6, 2005.

BARBOSA-FERREIRA, M.; DAGLI, M.L.Z.; MAIORKA, P.C.; GÓRNIK, S.L. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 43, p. 497-503, 2005.

BARROS, C.S.L.; PILATI, C.; ANDUJAR, M.B.; GRAÇA, D.L.; IRIGOYEN. L.F.; LOPES, S.T.; SANTOS, C.F. Intoxicação por *Cassia occidentalis* em bovinos. **Pesq. Vet. Bras**, v.10, p. 47–58, 1990.

BARROS, C.S.L. Intoxicação por plantas que afetam o sistema muscular – intoxicação por *Senna occidentalis*. In: Riet-Correa, F.; Mendez, M. C.; Schild, a. I. II. (Ed.). Intoxicação por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. Pelotas: Hemisfério Sul do Brasil, p. 201-233, 1991.

BEGUIN, Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. **Haematologica**, v. 77, n. 1, p. 1-10, 1992.

BEUTLER, E.; WAALLEN, J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of blood hemoglobin concentration. **Blood**, v. 107, p. 1747-1750, 2006.

BOLLIGER, A.P. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods and normal morphology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 2, 2004.

BORELLI, P.; FOCK, R.A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 49-56, 2004.

BOSIO, S.; DE GOBBI, M.; ROETTO, A., Zecchina; G., et al. Anemia and iron overload due to compound heterozygosity for novel ceruloplasmin mutations. **Blood**, v. 100, p. 2246-2248, 2002.

BRADLEY, T.R.; METCALF, D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Aust J Expo Biol Med Sci**, v. 44, p.287-299, 1966.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004.

BREUER, W.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK. A. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. **Transfus. Sci**, v. 23, n. 3, p. 185-192, 2000.

BRISSOT, P.; LOREAL, O. Role of non-transferrin-bound iron in the pathogenesis of iron overload and toxicity. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 509, p. 45-53, 2002.

BRITTENHAM, G.M. Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. Hematology: Basics Principles and Practice. 3rd. New York: Churchill Livingstone, 2000.

CALORE, E.E.; CAVALIERE, M.J.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z.; RASPANTINI, P.C.F.; CALORE, N.M.P. Experimental mitochondrial myopathy induced by chronic intoxication by *Senna occidentalis* seeds. **Journal of Neurological Sciences**, v. 146, n. 1, p. 1-6, 1997.

CALORE, E.E; WEG, R.; HARAGUCHI, M.; CALORE, N.M.P.; CAVALIERI, M.J.; SESSO, A. Mitochondrial metabolism impairment in muscle fibers of rats

chronically intoxicated with *Senna occidentalis* seeds. **Exp. Toxicol. Pathol**, v. 52, p. 357–363, 2000.

CANÇADO, R.D. Aspectos atuais do metabolismo do ferro. Current aspects on iron metabolism. 1–10, 2012.

CARLTON, W.W.; GAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. Tradução: C. S. L Barros. 2.ed. Porto Alegre: Art Med 1998.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. **Chem Biol Interact**, v.157, p. 277-83, 2005.

CAVALIERI, M.J; CALORE, E.E.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z.; RASPANTINI, P.C.F.; CALORE, N.M.; WEG, R. Mitochondrial myopathy in *Senna occidentalis* feed chucken. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 37, n. 2, p. 181-185, 1997.

CHUKWUJEKWU, J.C.; COOMBES, P.H.; MULHOLLAND, D.A.; VAN STADEN, J. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. **S Afr J Bot**, v. 72, p. 295-297, 2006.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 40, n. 2, p.151-82, 2003.

COOK, J. D.; BAYNES, R. D.; SKIKNE, B. S. Iron deficiency and the measurement of iron status, **Nutrition Research Reviews**, v. 5, p. 189-202, 1992.

CÔRREA, MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Serviço de Informação Agrícola, 1926. v. III.

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, v. 2, p. 2684-2696, 1997.

DELDAR, A.; STEVENS, C.E. Development and application of in vitro models of Hematopoiesis to drug development. **Toxicol. Path**, v. 21, p. 231–240, 1993.

DELDAR, A.; LEWIS, H.; BLOOM, J.; WEISS, L. Reproducible cloning assays for in vitro growth of canine hematopoietic progenitor cells and their potential applications in investigative hematotoxicity. **Am J Vet Res**, v. 49, n. 8, p.1393-40, 1988.

DELDAR, A. Drug-induced blood disorders: Review of pathogenetic mechanisms and utilisation of bone marrow cell culture technology as an investigative approach. **Curr. Topics Vet. Res**, v. 1, p. 83–101, 1994.

DELDAR, A.; HOUSE, V.R. WIERDA, D. Bone marrow colony-forming assays. **Methods in Immunotoxicology**, v. 1, p. 227–250, 1995.

DEXTER, T.M.; SPOONER, E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. **Ann. Rev. Cell. Biol.**, v. 3, p. 423–441, 1987.

DEXTER, T.M. TESTA, N.G. Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. **Meth. Cell. Biol.**, v. 14, p. 387–405. 1976.

DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D.; LAJTHA, L.G.; SCHOFIELD, R., LORD, B.I. Stimulation of differentiation and proliferation of hemopoietic cells in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v. 82, p. 461–470, 1973.

DHABHAR, F.S.; McEWEN, B.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, Behavior and Immunology**, v. 11, p. 286-306, 1997.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 4th ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002.

DUGAN, G.M.; GUMBMANN, M.R. Toxicological evaluation of sicklepod and black nightshade seeds in short-term feeding studies in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 101-107, 1990.

DOULATOV, S.; NOTTA, F.; LAURENTI, E.; DICK, J. Hematopoiesis: a human perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 120-136, 2012.

FAIRBANKS, V.G.; BEUTLER, E. Iron metabolism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. Williams-Hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill, p. 295-304, 2001.

FARQUHAR, M.J.; BOWEN, D.T. Oxidative stress and myelodysplastic syndromes. **Inter J Hematol**, v. 77, p. 342-50, 2003.

FAUSER, A.A.; MESSNER, H.A. Proliferative state of human pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) in normal individuals and under regenerative conditions after bone marrow transplantation. **Blood**, v. 54, p. 1197-2000, 1979.

FAUSER, A.A.; MESSNER, H.A. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. **Blood**, v. 52, p. 1243-1248, 1978.

FORTOUL, T.I.; PINÓN-ZARATE, G.; DIAZ-BECH, M.E.; GONZÁLEZ-VILLALVA, A.; MUSSALI-GALANTE, P.; RODRIGUEZ-LARA, V.; COLIN-BARENQUE, L.; MARTINEZ-PEDRAZA, M.; MONTAÑO, L.F. Spleen and bone marrow megakaryocytes as target for inhaled vanadium. **Histology and Histopathology**, v. 23, n. 11, p. 1321-1326, 2008.

FRIEDMAN, E.M.; IRWIN, M.R. A role of CRH and sympathetic nervous system in stress induced immunosuppression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, n. 441, p. 396-418, 1995.

FUGH-BERMAN, A. Herb-drug interactions. **Lancet**, v. 355, n. 9198, 2000.

GANZ, T. Heparin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 18, n. 2, p. 171-82, 2005.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, a011668, 2012.

GRAZIANO, M.J.; FLORY, W.; SEGER, C.L.; HERBERT, C.D. Effects of *Cassia occidentalis* extract in the domestic chicken (*Gallus dosmeticus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 7, p. 1238-1244, 1983.

GRIBALDO, L.; BUEREN, J.; DELDAR, P.; HOKLAND, P.; MEREDITH, C.; MONETA, D.; MOLESSO, P.; PARCHMENT, R.; PARENT-MASSIN, D.; PESSINA, A.; SAN ROMAN, J.; SCHOETERS, G. The use of in vitro systems for evaluating haematotoxicity. **ECVAM Workshop Report 14. ATLA**, v. 24, p. 211, 1996.

GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 32, p. 1313–1374, 2002.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, 2008.

GUPTA, M.P.; ARIAS, T.D.; CORREA, M.; LAMBA, S.S. Ethnopharmacognostic observations on Panamanian Medicinal Plants. Part I. **Pharmaceutical Biology**, 1979.

HARAGUCHI M, CALORE EE, DAGLI ML, CAVALIERE MJ, CALORE NM, WEG R, RASPANTINI PC, GORNIAC SL. Muscle atrophy induced in broiler

chicks by parts of *Senna occidentalis* seeds. **Vet Res Commun**, v. 22, p. 265-71. 1998.

HA-YOUNG, E.O.M; HYE-RAN, K.; HWAN-YOUNG, K.; DONG-KYUN, H.; HEE-JO, B.; JAE-HYUK, L. Mitochondrial dna copy number and hnRNP a2/b1 protein: biomarkers for direct exposure of benzene. **Environ Toxicol Chem**, v. 30, n. 12, p. 2762-70, 2011.

HIRABAYASHI, Y.; INOUE, T. Benzene-induced bone-marrow toxicity: a hematopoietic stem-cell-specific, aryl hydrocarbon receptor-mediated adverse effect. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 252-258, 2010.

HU, Z.; YANG, X.; HO, P.C.; CHAN, S.Y.; HENG, P.W.; CHAN, E.; DUAN, W.; KOH, H.L.; ZHOU, S. Herb-drug interactions: a literature review. **Drugs**, v. 65, n. 9, p. 1239-1282, 2005.

HUEZA, I.M.; LATORRE, A.O.; RASPANTINI, P.C.F.; RASPANTINI, L.E.R; MARIANO-SOUZA, D.P.; GUERRA, J.L.; GÓRNIK, S.L. Effect of *Senna occidentalis* seeds on immunity in broiler chickens. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, n.4, p. 179-85, 2007.

JENSEN. P.D.; HEICKENDORFF, L.; PEDERSEN, B. The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. **Br J Haematol**, v. 94, p. 288-99, 1996.

KAPLAN, J., WARD, D. M. The molecular basis of iron overload disorders and ironlinked anemias. **International journal of hematology**, v. 93, p. 14–20, 2011.

KEIL, D.; DUDLEY, A.; EUDALY, J.; DEMPSEY, J.; BUTTERWORTH, L.; GILKESON, G.; PEDEN-ADAMS, M. Immunological and hematological effects observed in B6C3F1 mice exposed to JP-8 jet fuel for 14 days. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 67, n. 14, p. 1109-1129, 2004.

KISSMANN, K.G; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II – 2 ed., São Paul: BASF, 1999.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 1, p. 61-88, 2003.

LEE, G. R.; WILLIAMS, D. M.; WRIGHT, G.E: Role of copper in iron metabolism and heme biosynthesis. Trace Elements in Human Health and Disease, Prasad, A. S., ed. New York, **Academic Press**, vol. 1, p. 373-390, 1976.

LIPOWITZ, A. J.: BLUE, I. Baço. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, v.1, p. 1143-1153, 1998.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

MALERBA, I.; CASATI, S.; DIODOVICH, C.; PARENT-MASSIN, D.; GRIBALDO, L. Inhibition of CFU-E/BFU-E and CFU-GM colony growth by cyclophosphamide, 5-fluorouracil and taxol: development of a high-throughput in vitro method. **Toxicol In Vitro**, v. 18, n. 3, p. 293-300, 2004.

MARIANO-SOUZA, D.P. PAULINO, C.A.; MAIÓRKA, P.C.; GÓRNIK, S.L. Administration *Senna occidentalis* seeds to adult and juvenile rats: effects on thymus, spleen and in hematological parameters. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 5, p. 46-54, 2010.

MAYANI. H.; GIULBERT, L.J.; JANOWSA-WIECZOREK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. **European Journal of Haematology**, v. 49, p-225-233, 1992.

MENA, N.P.; ESPARZA, A.; TAPIA, V.; VALDES, P.; NUNEZ, M.T. Hecpidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2007.

METCALF, D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2390-2395, 2007.

MOHANDAS, N.; PRENANT, M. Three-dimensional model of bone marrow. **Blood**, v. 50, p. 633-643, 1978.

MORRISON, S.J.; WRIGHT, D.E.; CHESSHIER, SH.; WEISSAM, I.L. Hematopoietic stem cells: challenges to expectation. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p. 216-221, 1997.

NADAL, S.R.; CALORE, E.E.; MANZIONE, C.R.; PUGA, F.R.; PEREZ, N.M. Effects of long-term administration of *Senna occidentalis* seeds in the large bowel of rats. **Pathology Research and Practice**, v. 199, n. 11, p. 733-737, 2003.

NAKAGE, A.P.M.; MACARI, M.; NAKAGHIL, L.S.; MALHEIROS, E.B.; VASQUES, L.H.; SECATO, E.R. Haematological and hormonal studies from broiler chickens fed with corn contaminates: *Crotalaria spectabilis* and *Senna occidentalis*. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 3, n. 5, p. 377-381, 2000.

NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V.; KELLER, C.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, BK. et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J Clin Invest.**, v. 113, n. 9, p. 1271-6, 2004.

NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U.M.; SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n.2, p. 83-92, 2003.

NUHU, A.A.; ALIYU, R. Effects of *Cassia occidentalis* aqueous leaf extract on biochemical markers of tissue damage in rats. **Trop J Pharm Res**, v. 7, p. 1137–1142, 2008.

OATES, P.S. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 7, p. 791-804, 2007.

PAN, L.C.; WILSON, D.W.; SEAL, H.L. Strain differences in the response of Fischer 344 and *Sprague-Dawley* rats to monocrotaline induce vascular disease. **Toxicology**, v. 79, n. 1, p. 21-35, 1993.

PARCHMENT, R.E. Alternative testing systems for evaluating non-carcinogenic, hematologic toxicity. **Environ. Health Perspect**, v. 106, Suppl 2, p. 541–557, 1998.

PARENT-MASSIN, D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicity. **Cell Biol Toxicol**, v. 17, p. 87-94, 2001.

PARENT-MASSIN, D.; THOUVENOT, D. In vitro study of pesticide hematotoxicity in human and rat progenitors. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 30, n. 4, p 203-207, 1993.

PAULUHN, J. Subacute inhalation toxicity of aniline in rats: analysis of time-dependence and concentration-dependence of hematotoxic and splenic effects. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 1, p. 185-215, 2004.

PESSINA, A .The granulocyte macrophage colony-forming unit assay. In *Animal Cell Culture Techniques* (M.Clynes, Ed.), p. 217–230. Springer-Verlag, Berlin, 1998.

PESSINA, A.; PICCIRILLO, M.; MINEO, E.; CATALANI, P.; GRIBALDO, L.; MARAFANTE, E.; NERI, M.G.; RAIMONDI, A. Role of SR-4987 stromal cells in the modulation of doxorubicin toxicity to in vitro granulocyte-macrophageprogenitors (CFU-GM). **Life Sci**, v. 65, n. 55, p. 13-23, 1999.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control *Sprague-Dawley* rats from pre-clinical

toxicity studies. **Experimental Toxicology Pathology**, v. 57, n. 3, p. 213-219, 2006.

PILNY, A. A Clinical hematology of rodent species. **The Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 523-533, 2008.

PURWAR, C.; RAI, R.; SRIVASTAVA, N.; SINGH, J. New flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis*. **Ind J Chem**, v. 43, n. 44, 2003.

RICH, I.N.; HALL, K.M. Validation and development of a predictive paradigm for hemotoxicology using a multifunctional bioluminescence colony-forming proliferation assay. **Toxicol Sci**, v. 87, n. 2, p. 427-441, 2005.

RICHARD, S.J.; SHERIND, R.G. **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, p. 206, 1998.

ROSAI, J. Special techniques. In: Ackerman's Surgical Pathology, 8th ed., p. 29-62. St. Louis: Mosby; 1996.

RYTER, S.W.; TYRRELL, R.M. The heme synthesis and degradation pathways role in oxidation sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med**, v. 28, p. 289-309, 2000.

SANTOS, T.P.S.; MONTEIRO, L. Frequência das anemias microcíticas e hipocrômicas no Laboratório Central do Hospital Oswaldo Cruz – Recife, PE. **News Lab**, v.87, n.1, p.78-84, 2008.

SEITA, J.; WEISSMAN, I.L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 2, n. 6, p. 640-653, 2010.

SHEN, S.G.; HUI, L.; ZHAO, Y.Y.; ZHANG, Q.Y.; SUN, H.W. The distribution patterns of trace elements in the blood and organs in a rabbit experimental

model of copper pollution and study of haematology and biochemistry parameters. **Environ Toxicol Pharm**, v. 19, n. 3, p. 379-384, 2005.

SHETH, S.; BRITTENHAM, G.M. Genetic disorders affecting proteins of iron metabolism: clinical implications. **Ann Rev Med**, n. 51, p. 443-64, 2000.

SILVA, F.O.; OLIVEIRA, I.R.; SILVA, M.G.V.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, n. 33, v. 9, p. 1874-1876, 2010.

SILVA, M.G.B.; ARAGÃO, A.; VASCONCELOS, P.; FERREIRA, B.; ANDRADE, I.M.A. COSTA, J.H. COSTA-SILVA, A.G.; LAFAYETTE, S.L. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 341–346, 2011.

SKIKNE, B.S.; FLOWERS, C.H.; COOK, J.D. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. **Blood**, v. 75, n. 9, p. 1870-1876, 1990.

SMITH, J. E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, p. 223-239. 1997.

SOYUNCU, S; CETE, Y.; NOKAY, A.E. Portal vein thrombosis related to *Cassia angustifolia*. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 774-777, 2008.

SUTTIE, A.W. Histopathology of the spleen. **Toxicology Pathology**, v. 34, p. 466-503, 2006.

SWENSON, M. J.; REECE, W.O. **Dukes fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 35, 1996.

TANDARA, L.; SALAMUNIC, I. Iron metabolism: current facts and future directions. **Biochem Medical**, v. 22, p. 311–328, 2012.

TANNO, T.; MILLER, J.L. Iron Loading and Overloading due to Ineffective Erythropoiesis. **Advances in hematology**, v. 358, n. 283, 2010.

TASAKA, A.C; WEG, R.; CALORE, E.E.; SINHORINI, I.; DAGLI, M.L.Z.; HARAGUCHI, M. et al. Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. **Vet Res Commun**, v. 24, p. 573-580, 2000.

TELES, A.V.F.F.; FOCK, R.A.; GÓRNIK, S.L. Effects of long-term administration of *Senna occidentalis* seeds on the hematopoietic tissue of rats. **Toxicon**, v. 108, p. 73-79, 2015.

TESTA, N.G. Clonal assays for haemopoietic and lymphoid cells in vitro. *In* (org.) Cell clones - manual of mammalian cell techniques. J.H. Potter and J.Hendry, editors. Churchill-Livingstone, New York. 235, 1985..

THEIL , E.C.; CALVERT , K.T.: The effect of copper excess on iron metabolism in sheep . **Biochem . J**, v. 170, p. 137-143, 1978.

TRAVLOS, GS.. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicol Pathol**, v. 34, p. 548-65, 2006.

ULRICH, T.R.; DEL CASTILLO, J. The hematopoietic and mature blood cells of the rat: their morphology and the kinetics of circulating leukocytes in control rats. **Exp Hematol**, v. 19, p. 639–648, 1991.

VALLI, V.E.; MCGRATH, J.P.; CHU, I. Hematopoietic system. In Handbook of Toxicologic Pathology, 2nd edition: Academic Press, San Diego, CA, 2002.

VASHISHTA, V.M; KUMAR, A.; JOHN, T.J.; NAYAK, N.C. *Cassia occidentalis* poisoning as the probable cause of hepatomyencephalopathy in children in western Uttar Pradesh. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 6, p. 756-762, 2007.

VIEGAS-JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; MIRANDA, A.L.P.; MOREIRA, .MS.;

YOUNG, M.C.M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1-8, 2006.

WINTERBOURN, C.C. Toxicity of iron hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82, n. 83, p. 969-974, 1995..

YADAV, J.P.; ARYA, V.; YADAV, S.; PANGHAL, M.; KUMAR, S.; DHANKHAR, S. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p. 223-230, 2010.