FABIANA ELIAS

Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia de
***Senecio brasiliensis*: estudo em ratos**

São Paulo

2011

FABIANA ELIAS

Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia de *Senecio brasiliensis*: 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:

Profª. Drª. Silvana Lima Górnjak

Coorientador:

Profª. Drª. Isis Machado Hueza

São Paulo
2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2528 FMVZ	<p>Elias, Fabiana</p> <p>Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia de <i>Senecio brasiliensis</i>: estudo em ratos / Fabiana Elias.-- 2011. 178 p. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak. Coorientadora: Profa. Dra. Isis Machado Hueza.</p> <p>1. <i>Senecio brasiliensis</i>. 2. Integerrimina N-óxido. 3. Alcalóides Pirrolizidinícos. 4. Imunotoxicologia. 5. Imunoteratologia. I. Título.</p>
----------------	---

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia do *Senecio brasiliensis*. Estudo em ratos", protocolado sob o nº1461/2008, utilizando 500 (quinhentos) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Evaluation of the immunotoxic and immunoteratogenic properties of *Senecio brasiliensis*. Study in rats", utilizing 500 (five hundred) rats, protocol number 1461/2008, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ELIAS, Fabiana

Título: Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia de *Senecio brasiliensis*: 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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Aldo e Luzia (in memorian)

*Presença, amor, dor, silêncio, angustia, alegria,
torcida...*

*Vocês me ensinaram a lutar pelos meus ideais,
trilhando sempre no caminho da verdade,
integridade e lealdade*

Nada em nossas vidas foi fácil...

Tenho muito orgulho por ser sua filha

*Dedico esse trabalho a todos aqueles que foram ou
ainda serão meus alunos, pois são minha fonte de
inspiração na busca de novos conhecimentos.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai Aldo, que através de exemplos de integridade, amor e compreensão me apoiou e incentivou em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Luzia (in memorian), por ter sido a "melhor de todas", um exemplo de amor, humildade e dedicação. Guerreira e torcedora pelo desfecho feliz de minhas empreitadas. Fiquei sem chão com sua ausência. Obrigada por proteger meus passos. Saudades!

À Prof. Dra. Silvana Lima Górnaiak, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos ao longo destes quatro anos e por toda ajuda, principalmente na fase final deste trabalho. Você é um exemplo de competência e dedicação ao ensino e à ciência.

À Profa. Dra. Isis Machado Hueza, pela co-orientação e por toda ajuda e ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho. Você teve um papel fundamental no meu crescimento científico.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela satisfação e orgulho de ter trabalhado e usufruído de suas dependências .

*À Dra. Mitsue Haguchi pela ajuda na extração e análise química do RB do **S. brasiliensis**.*

À Andreia Latorre pela grande oportunidade de aprendizado, pelo entusiasmo e dedicação à ciência, pela amizade e por toda ajuda (o que não foi pouca) durante todo este período.

Ao laboratório de microbiologia da FMVZ , em especial ao Fernando Souza, por ceder o Stafilococcus aureus que foi utilizado neste trabalho.

Aos colegas de pós que sempre têm um motivo para inúmeras conversas e boas risadas: Beatriz, Esther, André, Vanius, Andréia, Fernando, Luciana Cunha, Aline, Luciana Lippi e Isabel. Obrigada por me acolherem com tanto carinho.

Aos meus queridos e eternos amigos Fernando Pípole e Luciana Cunha, sem dúvida alguma, uma das melhores coisas que aconteceu na minha vida durante a pós. Obrigado pelas conversas, "comilanças", conselhos, apoio, pela ajuda nos experimentos de final de semana, madrugadas, etc e claro, pelas risadas intermináveis que demos juntos. Amo vocês.

Ao pessoal do CEPTOX, essenciais para a realização desta tese: Adilson, Marquinhos, Estevão, Solange, e em especial ao Paulo César (PC), à Ester e à Elaine. Obrigada por me acolherem, pela ajuda e por toda força, carinho e apoio que vocês deram nos momentos difíceis pelos quais passei e estou passando. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Amo todos.

À Julia Bernadi por toda colaboração nos experimentos e por me ensinar a dar os primeiros passos nesse mundo chamado imunotoxilogia .

Ao pessoal do Biotério (Claudia, Elaine e Baladore), por cuidarem com carinho e responsabilidade dos animais experimentais.

Às secretárias da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT, Adriana, Milena, Cláudia, Daura, Marli e Cristina, pelo constante atendimento atencioso.

À Faculdade de Medicina Veterinária da União Pioneira de Integração Social (UPIIS), pela confiança, oportunidade de trabalho e apoio ao longo desses quase sete anos de trabalho, o que é hoje, uma das coisas mais importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Hélio Blume, chefe de Departamento do curso de Medicina Veterinária da UPIIS, pelo prazer da convivência, por todo apoio e incentivo para com o doutorado, pela total liberdade de trabalho, e por toda amizade e confiança incondicionais.

Aos meus "Anjos da Guarda" Rafaela, Rômulo e Ana Maria, por toda ajuda durante todo esse período. Sem vocês eu não teria conseguido dar conta de tantas viagens em meio a tantas aulas. Vocês que foram meus alunos, estagiários e residentes são hoje, excelentes colegas de profissão e grandes amigos. Sinto muito orgulho de ter participado formação de vocês.

Ao meu colega de trabalho, Professor Helvecio Leal Santos Junior, por toda ajuda e incentivo durante todo este tempo que trabalhamos juntos. Sei que muitas vezes você ficou sobrecarregado para que eu pudesse realizar experimentos e outras atividades do doutorado. Meu muito obrigada.

Às Professoras Marília Viviane Snel, Adriana Moraes da Silva e Andréia Lazzari pela maravilhosa amizade e pela ajuda e incentivo durante todos estes anos que trabalhamos juntas.

Ao Renato, técnico do laboratório de histopatologia da UPIIS, pela boa vontade e excelente confecção de todas as lâminas histológicas estudadas neste trabalho.

À todos os Professores da Faculdade de Medicina Veterinária da UPIIS, pelo convívio diário, apoio, palavras de incentivo e pela certeza que somos um time e que todos estamos empenhados para fazer um trabalho cada vez melhor.

A Dra. Ana Lucia Schild, por ter cedido o material vegetal usado neste trabalho e por sua amizade incondicional. Te adoro "Pol".

À Clarinha, Roberto e Ian, pela amizade, carinho, apoio e por cuidarem tão bem de Maria Luiza e Jonny.

À Luciana Viero, Bárbara Barros, Luciane Vieira, Fabiane Lamego, Jaqueline Bosa, Fernanda Vieira e Evelise Arnoldo. Amigas do coração que me deram suporte e auxílio nos momentos difíceis da minha vida. Amo vocês.

À Capes pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao Projeto Temático (Proc. Nº07/51648-0.) de qual este trabalho faz parte.

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

RESUMO

ELIAS, F. **Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia de *Senecio brasiliensis*: estudo em ratos.** [Evaluation of immunotoxic and immunoteratogenic properties of *Senecio brasiliensis*: study in rats]. 2012. 178 f. Tese (Doutorado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O presente estudo visou avaliar os possíveis efeitos imunotóxicos e imunoteratogênicos da integerrimina *N*-óxido presente no resíduo butanólico (RB) do *Senecio brasiliensis*, uma planta hepatotóxica que contém alcalóides pirrolizidínicos (APs). Tem sido relatado o uso de APs como fitoterápicos em todo o mundo e também como contaminantes de pastagens e alimentos, sendo assim responsáveis por intoxicações em animais de produção e humanos; porém, até o momento, não há relatos de sua ação sobre o sistema imune. Assim, após a extração da planta, quantificou-se no RB de *Senecio brasiliensis*, por meio de análise elementar e de espectro (^1H e ^{13}C), cerca de 70% de integerrimina *N*-óxido. O RB foi administrado a ratos Wistar machos adultos, nas doses de 3, 6 e 9 mg/kg, por gavagem, durante 28 dias. Foram avaliados o ganho de peso, o consumo de alimento, os órgãos linfóides e a fenotipagem de sua células, a atividade de fagócitos, as respostas imunes humoral e celular e atividade proliferativa de linfócitos. Já ratas gestantes, receberam as mesmas doses do RB do 6º ao 20º dia de gestação. No final da gestação, parte das fêmeas foi destinada à cesariana e as restantes prosseguiram à termo até o nascimento, para a análise das proles aos 60 dias de idade. Os fetos provenientes da cesariana foram avaliados quanto ao tamanho, peso, viabilidade e malformações externas e também submetidos à análise óssea. As mães tiveram seu desempenho reprodutivo avaliado. Naquelas proles avaliadas até 60 dias de idade, procedeu-se a avaliação dos órgãos linfóides e dos parâmetros hematológicos. O presente estudo revelou que integerrimina *N*-óxido promoveu diminuição no ganho de peso corporal de ratos machos adultos, redução na atividade proliferativa das células T e interferência na contagem de células sanguíneas destes animais. Por outro lado, esses mesmos animais não apresentaram diferenças na atividade de fagócitos, na fenotipagem de linfócitos e nas respostas imunes estudadas. Em ratas gestantes,

o RB causou hepatotoxicidade, diminuição do ganho de peso materno, diminuição no tamanho das placentas. A análise fetal revelou menor ossificação. Quando da avaliação da prole aos 60 dias de idade, não foram observados efeitos no ganho de peso atribuídos ao RB, nos órgãos linfóides, e também parâmetros hematológicos e bioquímicos. Concluindo, os estudos aqui realizados permitem sugerir que as doses baixas de integerrimina *N*-óxido ora empregadas, não promovem efeitos imunotóxicos significantes, bem como não apresentaram potencial teratogênico, seja por meio das avaliações clássicas de teratologia quanto naqueles protocolos de imunoteratogenicidade.

Palavras-chave: *Senecio brasiliensis*. Integerrimina *N*-óxido. Alcalóides Pirrolizidinícos. Imunotoxicologia. Imunoteratologia.

ABSTRACT

ELIAS, F. **Evaluation of immunotoxic and immunoteratogenic properties of *Senecio brasiliensis***: study in rats. [Avaliação imunotóxica e de imunoteratologia do *Senecio brasiliensis*. Estudo em ratos]. 2012. 178 f. Tese (Doutorado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The aim of this study was to evaluate the possible immunotoxic and immunoteratogenic effects of integerrimine *N*-oxide content in the butanolic residue (BR) of *Senecio brasiliensis*, a hepatotoxic plant that contained pyrrolizidine alkaloids (PAs). PAs have been reported as a pasture and food contaminant and as herbal medicine used worldwide and are related to promote poisoning events in livestock and human beings. After the plant extraction, BR residue from *Senecio brasiliensis* was submitted to elemental and spectral analyses (^1H and ^{13}C) and was found to contain approximately 70% of integerrimine *N*-oxide by, which was administered to adult male Wistar rats at doses of 3, 6 and 9 mg/kg for 28 days, by gavage. Body weight gain, food consumption, lymphoid organs and their cell phenotype, phagocyte analysis, humoral and cellular immune responses, and lymphocyte proliferation were evaluated. In addition, pregnant rats received the same doses of BR from the 6th to the 20th gestational day. In late pregnancy, some of the dams were destined for cesarean section and the other females followed the pregnancy until the birth for offspring analysis at 60 days old. Fetuses from cesarean section were evaluated for size, weight, viability and external malformations and also subjected to bone analysis. The reproductive performance of females were performed. The present study showed that integerrimine *N*-oxide could promote in adult male Wistar rats, body weight gain impairment, interference with blood cell counts and a reducing T cell proliferative; however, no differences in phagocyte activities, lymphocytes phenotyping and immune responses here evaluated were observed. In pregnant rats, BR caused hepatotoxicity, decreased body weight gain and reduced placental size. Fetus analysis showed lower ossification. When 60-days old offspring were it was not observed any toxic effects resulted from BR exposition in body weight gain, lymphoid organs, haematological and biochemical parameters of these rats. It is concluded that low doses of integerrimine *N*-oxide here employed did not produce marked immunotoxic effects and seems to be a teratogenic signs by both methods, the classical evaluations or by immunoteratological protocols.

Keywords: *Senecio brasiliensis*. Integerrimine *N*-oxide. Pyrrolizidine alkaloids. Immunotoxicology. Immunoteratology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT.....	Alanina aminotransferase
AST.....	Aspartato aminotransferase
APs.....	Alcalóides pirrolizidínicos
CG/EM.....	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CEPTOX.....	Centro de pesquisa em Toxicologia Veterinária
CLAE/EM.....	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
ConA.....	Concanavalina A
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DCFH-DA.....	Diacetato 2'7' Diclofluoresceína
DEAE.....	Dietilaminoetil
DG.....	Dia de gestação
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DTH.....	<i>Delayed Type Hypersensitivity</i>
EDTA.....	Etilenodiamino-tetracético-dissódico
EROs/ROS.....	Espécies reativas de oxigênio
FA.....	Fosfatase alcalina
g.....	Grama
g/dL.....	Grama por decilitro

GGT.....	Gama glutamiltransferase
GSH	Glutathione
HE.....	Hematoxilina-eosina
IFN.....	Interferon
IL.....	Interleucina
Ip.....	Intraperitoneal
kg.....	Quilograma
KLH.....	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LPS.....	Lipopolissacarídeo
mg.....	Miligrama
min.....	Minutos
mL.....	Mililitro
µL.....	Microlitro
mm.....	Milímetro
MTT.....	3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difenil brometo tetrazolio
NO.....	Óxido nítrico
PBS.....	Solução salina tamponada com fosfato
PFC.....	<i>Plaque-Forming Cell</i>
PMA.....	Miristato acetato forbol
RB.....	Resíduo butanólico
RBC.....	<i>Red Blood Cell</i>
RNA.....	Ácido ribonucléico
rpm.....	Rotações por minuto

SNC.....	Sistema nervoso central
SAPI.....	<i>Staphylococcus aureus</i> marcado com iodeto de propídeo
SRBC.....	<i>Sheep Red Blood Cell</i>
TNF.....	Fator de necrose tumoral
WBC.....	<i>White Blood Cell</i>
VPT.....	Departamento de Patologia Veterinária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	SOBRE A IMPORTÂNCIA DA INTOXICAÇÃO POR PLANTAS	23
2.2	SOBRE OS ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS	24
2.2.1	Sobre a patogenia e aspectos patológicos da intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos	28
2.3	SOBRE O GÊNERO <i>Senecio</i> : CARACTERÍSTICAS E EPIDEMIOLOGIA	30
2.4	SOBRE A IMUNOTOXICOLOGIA	33
2.5	SOBRE A TERATOLOGIA E TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVOS GERAIS	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	ANIMAIS	43
4.2	REAGENTES E EQUIPAMENTOS	43
4.3	MATERIAL VEGETAL	44
4.4	PROCEDIMENTOS	44
4.4.1	Análise quantitativa dos alcalóides presentes nas folhas de <i>S. brasiliensis</i>	44
4.4.2	Extração de alcalóides empregando a técnica clássica de Stas-Otto modificada	45
4.4.3	Identificação do constituinte químico do RB por ressonância magnética nuclear	46
4.4.4	Administração do RB do <i>S. brasiliensis</i>	46
4.4.5	Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração	47
4.4.6	Avaliação dos parâmetros hematológicos	47
4.4.7	Análise bioquímica	47
4.4.8	Viabilidade celular e contagem de células	48
4.4.9	Avaliação de peso relativo de timo e baço e celularidade de baço	48
4.4.10	Avaliação global de células da medula óssea	48
4.4.11	Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através do burst oxidativo, da fagocitose e da produção de NO	49
4.4.11.1	Coleta das células peritoneais elicitadas pelo tioglicolato 3%	49
4.4.11.2	Execução da técnica para avaliação do <i>burst</i> oxidativo e fagocitose	49
4.4.11.3	Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos elicitados	50
4.4.12	Necropsia e coleta de material para avaliação histopatológica	51
4.4.13	Acasalamento e confirmação da prenhez	51
4.4.14	Parâmetros avaliados após a cesariana	51
4.4.15	Análise óssea	52
4.4.16	Avaliação da atividade proliferativa e da fenotipagem de linfócitos B e T do baço	54
4.4.16.1	Procedimento geral	54

4.4.16.2	Proliferação de linfócitos B e T	54
4.4.16.3	Fenotipagem de linfócitos T e B do baço por citometria de fluxo	55
4.4.17	Avaliação do ciclo celular de linfócitos esplênicos	56
4.4.18	Avaliação dos neutrófilos circulantes por medida de burst oxidativo e fagocitose por meio de citometria de fluxo	57
4.4.19	Avaliação da resposta imune celular por meio da reação de hipersensibilidade do tipo tardia – <i>Delayed Type Hypersensitivity test</i> (DTH)	58
4.4.20	Avaliação da resposta imune humoral	58
4.4.20.1	A sensibilização	58
4.4.20.2	Avaliação dos títulos de anticorpos anti- SRBC	59
4.4.20.3	Avaliação do PFC para quantificação de plasmócitos produtores de anticorpos anti-SRBC no baço	59
4.4.20.3.1	O ensaio do PFC	59
4.4.20.3.2	O plaqueamento	60
4.4.21	Mensuração das citocinas circulantes	61
4.4.22	Avaliação da densidade urinária	62
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	63
5.1	ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DO <i>S. brasiliensis</i>	64
5.2	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA DO RB DE <i>S. brasiliensis</i>	66
5.2.1	Delineamento experimental	66
5.2.2	Resultados	66
5.3	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES, DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DA BIOQUÍMICA SÉRICA E DA ATIVIDADE DOS NEUTRÓFILOS DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE <i>S. brasiliensis</i>	74
5.3.1	Delineamento experimental	74
5.3.2	Resultados	74
5.4	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL, POR MEIO DA ANÁLISE DO TÍTULO ANTI-SRBC E DA PRODUÇÃO DOS PFCs POR PLASMÓCITOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-SRBC NO BAÇO, DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE <i>S. brasiliensis</i>	90
5.4.1	Delineamento experimental	90
5.4.2	Resultados	90
5.5	EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (<i>DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY- DTH</i>) DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE <i>S. brasiliensis</i>	95
5.5.1	Delineamento experimental	95
5.5.2	Resultados	95
5.6	EXPERIMENTO 5: FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS B E T DO BAÇO DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE <i>S. brasiliensis</i>	97

5.6.1	Delineamento experimental	97
5.6.2	Resultados	97
5.7	EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS B E T ESPLÊNICOS DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE <i>S. brasiliensis</i>	100
5.7.1	Delineamento experimental	100
5.7.2	Resultados	100
5.8	EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DO EFEITO <i>IN VITRO</i> DO RB DE <i>S. brasiliensis</i> SOBRE O CICLO CELULAR DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS.....	103
5.8.1	Delineamento experimental	103
5.8.2	Resultados	103
5.9	EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO, DA FAGOCITOSE E DA PRODUÇÃO DE NO, DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB De <i>S. brasiliensis</i>	105
5.9.1	Delineamento experimental	105
5.9.2	Resultados	105
5.10	EXPERIMENTO 9: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E DA DENSIDADE URINÁRIA DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS COM 3, 6 E 9 mg/kg DE RB DO <i>S. brasiliensis</i>	112
5.10.1	Delineamento experimental	112
5.10.2	Resultados	112
5.11	EXPERIMENTO10: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO RB DE <i>S. brasiliensis</i> A RATAS GESTANTES: ESTUDO DOS EFEITOS NA MÃE E FETO DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL	118
5.11.1	Delineamento experimental	118
5.11.2	Resultados	118
5.12	EXPERIMENTO 11: CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS SOBRE ÓRGÃOS LINFÓIDES, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICA SÉRICA DE RATOS ADULTOS FILHOS DE MÃES QUE RECEBERAM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE <i>S. brasiliensis</i> DURANTE A GESTAÇÃO.....	130
5.12.1	Delineamento experimental	130
5.12.2	Resultados	131
6	DISCUSSÃO	145
7	CONCLUSÕES	159
	REFERÊNCIAS	162

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Mais de 1200 plantas do gênero *Senecio* são mundialmente catalogadas sendo, apenas no Brasil, identificadas aproximadamente 130 espécies desta planta, das quais a *S. brasiliensis* é aquela que mais vem sendo relacionada às intoxicações em diferentes espécies animais de produção, sendo as espécies, bovina e equina, aquelas mais frequentemente acometidas (TOKARNIA et al., 2000).

A toxicidade pela *Senecio* spp se faz devido à presença dos alcalóides pirrolizidínicos (APs) que, após serem absorvidos, são biotransformados ao nível hepático nos metabólitos tóxicos: os pirróis. Os compostos pirrólicos possuem atividade alquilante sobre o DNA, resultando em comprometimento na mitose celular podendo levar ao desenvolvimento de cânceres, genotoxicidade e também teratogenicidade (MATTOCKS; CABRAL, 1984; PETERSON; JAGO, 1980). Porém, o comprometimento na mitose celular pode resultar em outras implicações indesejáveis, semelhantes àsquelas observadas quando do uso de quimioterápicos alquilantes, sendo um destes efeitos a imunossupressão.

A imunotoxicologia é uma ciência relativamente nova e interdisciplinar que tem por objetivo a análise ampla de fatores químicos, físicos e biológicos que possam causar imunomodulações indesejáveis, não só aquelas relacionadas à imunoestimulação, como também aquelas que levam ao desenvolvimento da imunossupressão (KACMÁR et al.,1999).

Apesar do grande número de trabalhos destinados a elucidar os efeitos imunotóxicos de compostos de risco ao homem, poucos são aqueles que têm como objetivo exclusivo estudar os efeitos deletérios de plantas tóxicas sobre o sistema imune, que possam causar perdas econômicas importantes para a produção animal e também problemas de saúde pública. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar os possíveis efeitos tóxicos produzidos pela administração do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, em diferentes doses, sobre o sistema imune de ratos machos adultos e da prole adulta provenientes de ratas tratadas durante a gestação.

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOBRE A IMPORTÂNCIA DA INTOXICAÇÃO POR PLANTAS

As intoxicações por plantas em animais de produção são conhecidas desde que os espanhóis e portugueses introduziram as primeiras cabeças de gado em pastagens nativas na América Latina. De fato, em relação ao Brasil, os relatos datam dos primórdios da colonização; assim, já em 1587 o senhor de engenho Gabriel Soares de Souza, em seu “Tratado Descritivo do Brasil”, além de fazer alusão à grande riqueza da fauna e flora, mencionou a alta mortalidade de gado devido à ingestão de ervas nativas (HOEHNE, 1939).

Ainda, nos dias de hoje, a intoxicação por plantas em nosso país é muito comum e está entre as três causas mais comuns de mortes de bovinos adultos no Brasil (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). Ressalte-se que na região Norte as plantas tóxicas são a principal *causa mortis* desses animais, sendo responsáveis por mais óbitos nos bovinos do que a raiva e o botulismo nesta espécie animal (AFONSO; POTT, 2000).

Quanto às perdas econômicas causadas pelas intoxicações por plantas em animais de produção, estas podem ser diretas, como a morte dos animais, a diminuição dos índices reprodutivos, a redução da produtividade, enfermidades subclínicas, entre outras. Os prejuízos econômicos advindos podem ser devido a gastos para o controle das pastagens, medidas de manejo, como instalação de cercados de áreas com alta incidência destas plantas e tratamento dos animais afetados, além da desvalorização das terras.

No Brasil, estão catalogadas pelo menos 122 espécies de plantas tóxicas, pertencentes a 71 gêneros, para os animais (RIET-CORREA et al., 2009). Destas, as mais importantes são *Palicourea marcgravii*, presente em todo o País, exceto a região sul; *Senecio* spp e *Ateleia glazioviana* na região sul; e *Cestrum laevigatum* na região sudeste, todas para bovinos, e *Brachiaria* spp em todo o País principalmente

no Centro Oeste, para todas as espécies de animais de pastejo. A *Pteridium aquilinum* é uma das plantas tóxicas de grande importância, com maior impacto econômico nas regiões sul e sudeste (ANJOS et al., 2008). A *Thiloa glaucocarpa* e *Mascagnia rigida* são as principais plantas tóxicas do semiárido nordestino (RIET-CORREA et al., 2007). No Rio Grande do Norte, na região do Seridó Ocidental e Oriental, a *Ipomoea asarifolia* e a *Aspidosperma pyriforme* são as plantas mais importantes como causa de intoxicação para ruminantes (SILVA et al., 2006). Estima-se que no nosso País aproximadamente mais de um milhão de bovinos venham a óbito, em consequência da ingestão de plantas tóxicas (RIET-CORREA et al., 2006).

Outro aspecto que deve ser considerado em relação às plantas tóxicas ingeridas por animais de produção, é o fato de que as toxinas destas ou até mesmo seus metabólitos tóxicos, podem ser veiculadas por produtos de origem animal, seja pelo leite, carne, ovos, mel etc, acarretando assim, em intoxicação, de maneira indireta, no ser humano. Portanto, tal implicação faz com que este assunto não se restrinja apenas em um problema da pecuária, para se tornar uma preocupação na saúde pública (PANTER; JAMES, 1990). Neste sentido, um trabalho experimental conduzido por Medeiros et al. (1999), evidenciou claramente que a administração, durante dois meses, de ração a ratos contendo leite de cabras alimentadas com concentrações elevadas de sementes de *Crotalaria spectabilis*, promoveu alterações hepáticas, nefro e pneumotóxicas, nos roedores, num quadro semelhante àquele quando os animais recebiam diretamente as sementes desta planta.

2.2 SOBRE OS ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Os APs possuem ampla distribuição no reino vegetal, podendo ser encontrados em diversas regiões do planeta. Esses compostos podem estar contidos principalmente nas plantas das famílias Asteraceae (Compositae), Boraginaceae, Orchidaceae e Leguminosae. Estima-se que mais de 6000 espécies

de vegetais contenham APs, o que compreende a aproximadamente 3% das angiospermas (HARTMANN; WITTE, 1995). Atualmente, cerca de 660 APs e seus derivados *N*-óxidos (Figura 1) são conhecidos e sabe-se que metade deles apresenta propriedades tóxicas (ROEDER, 1995, 2000; STEGELMEIER et al., 1999; MOLYNEUX; PANTER, 2009; TRIGO, 2011).

Nas espécies de *Senecio*, os APs são sintetizados exclusivamente como *N*-óxidos (HARTMANN; TOPPEL, 1987), que é a forma molecular específica para translocação a longa distância, transporte dentro do vacúolo celular e armazenamento dentro deste vacúolo.

Os APs são compostos que contém nitrogênio, usualmente no anel heterocíclico e são geralmente substâncias básicas. Os núcleos dos APs contem de 2-5 anéis. Aqueles APs produzidos por espécies de *Senecio* são alcalóides ésteres de aminoálcoois, com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos) (Figura 1) que podem ocorrer na forma de monoésteres, não cíclico (abertos) e diésteres cíclicos, em ordem crescente de toxicidade. São derivados de necinas, retronecina e otonecina. As necinas caracterizam-se por apresentar um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como “cabeça de ponte”, um grupamento hidroximetila em C1 e uma hidroxila em C7 (Figura 2). Para serem hepatotóxicos necessitam de ligação dupla 1,2 no núcleo pirrolizidínico e uma ramificação no grupamento éster (CHEEKE, 1988). No entanto, como anteriormente comentando, esses agentes *per se* não induzem efeitos tóxicos, estes devem ser transformados em compostos pirrólicos pelas enzimas microssomais hepáticas para tornar a molécula tóxica ativa, a qual possui uma forte afinidade de ligação pelos grupos nucleofílicos.

Assim, após a ingestão e absorção, os APs são primeiro hidroxilados pelas monoxigenases hepáticas do citocromo P-450 em um composto instável que rapidamente desidrata ao alcalóide dehidropirrolizidina, resultando em um rearranjo espontâneo a um sistema aromático pirrólico (Figura 3).

Estes compostos pirrólicos geram íons carbonos, estabilizados pela perda de grupos hidroxila que reagem rapidamente com grupos mercapto nucleofílico, hidroxila e amino em proteínas e nos grupos amino das bases purina e pirimidina de nucleosídeos como o DNA e o RNA. Ainda, a hidrólise do alcalóide dehidropirrolizidina resulta em compostos pirrólicos com atividade alquilante ao DNA, proteínas e resíduos de cisteína (CULVENOR et al., 1969, 1971). A glutathiona

reduzida apresenta caráter nucleofílico devido à presença de um grupo sulfidril e, em função disso, protege o organismo, uma vez que “captura” os derivados pirrólicos tóxicos, sendo esta a principal rota de detoxificação utilizada pelo organismo (CHEN; WANG; WAN, 2009). Portanto, os compostos pirrólicos podem danificar as proteínas, o DNA e o RNA, resultando em comprometimento na síntese proteica e perda da função celular, no desenvolvimento de neoplasias e em efeito antimitótico (MATTOCKS; CABRAL, 1984; PETRY et al., 1984; FU et al., 2004).

Apesar de o fígado ser o órgão mais atingido, a dehidromonocrotalina, um metabólito da monocrotalina, tem a capacidade de atingir a circulação geral e pode causar nefrose e pneumonia intersticial (MEDEIROS; GÓRNIK; GUERRA, 1999; SANTOS et al., 2008).

Figura 1 - Estrutura química geral dos APs na sua forma de base livre e *N*-óxido

Figura 2 - Estrutura química do anel pirrolizidínico das necinas. Observar as duplas ligações no carbono 1,2

Fonte: Wiedenfeld (2011) com modificações

Figura 3 - Rota metabólica responsável pela toxicidade dos APs (Hidroxilação enzimática dos APs e produtos pirróis). Nu: compostos nucleofílicos.

2.2.1 Sobre a patogenia e aspectos patológicos da intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos

Os pirróis causam danos irreversíveis ao fígado e lesam as células hepáticas, por inibirem a mitose (efeito alquilante), causando megalocitose, necrose e redução no número de hepatócitos que, com o tempo, são substituídos por tecido fibroso e, em virtude disso, levam ao aparecimento do quadro clínico e morte decorrente da disfunção hepática (SANTOS et al., 2008). No caso de intoxicação aguda, ocorre necrose hemorrágica massiva no fígado. A agressão pode afetar tanto

as células hepáticas parenquimatosas (hepatócitos), células não-parenquimatosas (células de Kupffer, células Ito, células endoteliais, células de ductos biliares e linfócitos associados ao fígado) e a matriz extracelular hepática (TORRES; COELHO, 2008). Nos hepatócitos, os alcalóides pirrolizidínicos induzem a um leve estímulo regenerativo; porém, concomitantemente, ocorre efeito antimitótico, com síntese contínua de nucleoproteínas, levando ao aumento de tamanho e volume destas células (megalcitose), com metabolismo subnormal, culminando em morte celular e substituição por tecido conjuntivo fibroso (CULLEN, 2007). Bull, Culvenor e Dick (1968) e Pearson (1993) caracterizaram os achados histopatológicos, fibrose hepática, hiperplasia de ductos biliares e megalcitose como patognomônicos em animais intoxicados pelos alcalóides pirrolizidínicos. No sistema nervoso central (SNC), observam-se lesões características de encefalopatia hepática, com presença de microcavitações localizadas na substância branca e também no limite entre esta e a substância cinzenta (MÉNDEZ; RIET-CORREA; SCHILD, 1987).

Diferenças entre as espécies animais no que se refere à suscetibilidade à intoxicação por APs são relatadas na literatura (HOOPER, 1978; CHEEKE; PIERSON-GOEGGER, 1983; CHEEKE, 1994). A resistência de algumas espécies é o resultado do balanço entre as reações de bioativação, desintoxicação e excreção dos alcalóides (HUAN; MIRANDA; BUHLER, 1998). Além desses fatores, a qualidade da dieta do animal aparentemente influencia no processo de detoxificação dos APs. Trabalhos experimentais em ratos demonstraram que altas concentrações de proteínas na dieta reduzem a toxicose dos alcalóides, em virtude de aminoácidos como a glutatona, exercerem importante papel na rota de detoxificação hepática dos alcalóides pirrolizidínicos (CHEEKE, 2009).

Em relação ao ser humano, a doença veno-oclusiva hepática é a manifestação mais freqüente resultante da intoxicação por APs (PRAKASH et al., 1999). Esta afecção é caracterizada por dor epigástrica, distensão abdominal devido à ascite, hepatomegalia, icterícia, elevação dos níveis séricos das transaminases e, por fim, cirrose (BOLZAN et al., 2007). Também, há evidências da ação teratogênica dos APs em seres humanos, uma vez que, relatam-se casos de doença veno-oclusiva em fetos, neonatos e crianças, cujas mães consumiam chá de plantas contendo APs e/ou seus *N*-óxidos (ROULET et al., 1988, CAO; COLEGATE; EDGAR, 2008).

A intoxicação por APs é relatada em humanos que consomem plantas como prescrição tradicional, tal qual “*bush-tea*” na Jamaica (BRAS; BROOKS; WATLER, 1961; BROOKS et al., 1970) ou fitoterápicos. Estes produtos, à base de plantas, tais como aqueles que contêm *Symphytum officinalis* (comumente chamado de confrei), *Heliotropium indicum* e *Eupatorium cannabinum*, são conhecidos por possuírem, na sua constituição, os APs, sendo estes vegetais apontados como causadores de intoxicações em países industrializados, como os Estados Unidos da América e Reino Unido (STICKEL; SEITZ, 2000; FU et al., 2002; ROEDER; WIEDENFELD, 2009; MEI et al., 2010). No Brasil, há descrições de intoxicação em crianças e adultos que ingeriram chá de folhas de *S. brasiliensis* (MAGNABOSCO et al., 1997; TANIGUCHI et al., 2002).

Ainda, como já mencionado, a intoxicação indireta por APs também pode ocorrer pela ingestão de alimentos de origem animal contaminados, tais como leite de bovinos intoxicados (DICKINSON, 1980; MOLYNEUX; JAMES, 1990), ovos de aves que consumiram grãos contaminados por APs (EDGAR; SMITH, 1999) ou mesmo o mel produzido por abelhas que polinizam campos contaminados (DEINZER et al., 1977; BOPPRE; COLEGATE; EDGAR, 2005; KAKAR et al., 2010). Assim, a exposição aos APs é um problema para ambos: saúde pública e veterinária.

2.3 SOBRE O GÊNERO *Senecio*: CARACTERÍSTICAS E EPIDEMIOLOGIA

Em todo o mundo, existem mais de 1200 espécies de *Senecio* descritas. No Brasil são aproximadamente 128 as espécies de deste gênero catalogadas, com distribuição geográfica basicamente na região centro-sul do país. Desta mais de uma centena de espécies, sabe-se que aproximadamente 25 delas têm comprovada atividade tóxica para animais domésticos e mesmo para o homem (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). A espécie mais freqüente nessa região do Brasil, e também no Uruguai e Argentina, é *S. brasiliensis*, conhecida pelos nomes vulgares de “maria-mole”, “capitão”, “flor-das-almas” e “tasneirinha” (MÉNDEZ; RIET-CORREA; SCHILD, 1987; KARAM et al., 2002; GRECO et al., 2010).

Segundo Pio Correa (1984), “*S. brasiliensis* é uma planta herbácea, perene, ereta e bastante ramificada com caule liso e estriado. Atinge 1-2 m de altura e possui folhas alternadas, pinadas e profundamente lobadas até a nervura central. A parte ventral da planta é lisa, enquanto a parte superior é pilosa. As folhas são densamente agrupadas no ápice. As inflorescências são capítulos numerosos arranjados em corimbos densos com flores amareladas (Figura 4), que são de dois tipos: folhas em discos que possuem partes masculinas e femininas na mesma flor, e folhas radiadas que são exclusivamente femininas. O fruto é pequeno e possui plumagem branca que ajuda na dispersão pelo vento”.

No Brasil, as plantas do gênero *Senecio* florescem (Figura 5), uma vez ao ano, normalmente a partir de outubro (KARAM et al., 2002). Porém, o desenvolvimento das plantas depende de condições ambientais favoráveis como umidade, temperatura e luz (GRECO et al., 2010). O déficit hídrico, manejo do solo e algumas espécies de insetos podem alterar o ciclo das plantas e conseqüentemente diminuir ou extingui-las do ambiente (KARAM et al., 2002).

O consumo da planta por animais de pastejo ocorre em maior freqüência no outono e inverno devido às condições climáticas que favorecem o desenvolvimento da planta, associada à baixa disponibilidade de forragens (BARROS; METZDORF; PEIXOTO, 1987; KARAM; SCHILD; MELLO, 2011).

Estudos fitoquímicos, realizados a partir de folhas e flores desta planta, apontam a presença de diversos compostos químicos, destacando-se entre eles, os APs (HIRSCHMANN et al., 1987; KARAM et al., 2002; TOMA et al., 2004; SILVA et al., 2006), sendo a integerrimina, a senecionina e a retrorsina os principais.

Figura 4 - *Senecio brasiliensis*

Figura 5 - Campo repleto de *Senecio* spp com inflorescências. Município de Capão do Leão, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Outubro de 2011). Notar bovinos em pastoreio. (Foto cedida por Clairton Marcolongo)

2.4 SOBRE A IMUNOTOXICOLOGIA

O sistema imune pode ser considerado um mecanismo de vigilância que visa proteger o hospedeiro contra microrganismos ou outras substâncias alheias ao organismo que possam causar doenças. É ainda um sistema que possui componentes celulares aptos a reconhecer e destruir células infectadas por vírus e também células neoplásicas. Vale ainda ressaltar que o sistema imune é autolimitante, uma vez que é capaz de se autorregular, fazendo com que sua resposta cesse assim que o processo infeccioso seja eliminado. No entanto, em muitas ocasiões esta autolimitação e caráter homeostático do sistema imunológico nem sempre ocorre, levando o indivíduo a sofrer as consequências de uma imunoestimulação indesejada, como aquelas relacionadas aos processos alérgicos ou as hipersensibilidades, como também ao desbalanço do processo de tolerância, fazendo com que o “próprio” seja reconhecido pelo sistema imunológico, resultando

desta forma nas doenças autoimunes. Vale aqui lembrar que muitas destas manifestações são de origem genética, ou seja, de caráter hereditário, no entanto, vários são os xenobióticos, como medicamentos e metais pesados, entre outros compostos, que podem vir a interferir no sistema imune e causar estes efeitos descritos. Assim, é crucial ter o sistema imunológico intacto, funcionando em harmonia com outros sistemas do corpo (NAGARKATTI; NAGARKATTI, 1987).

O sistema imunológico caracteriza-se pela proliferação e diferenciação celular, amplificação, transcrição e tradução gênica, interações intercelulares, e isso faz dele um importante alvo dos efeitos tóxicos de xenobióticos (KACMÁR; PISTL; MIKULA, 1999; VIAL; CHOQUET-KASTYLEVSKY; DESCOTES, 2002).

A imunotoxicologia é uma ciência relativamente nova e interdisciplinar que tem por objetivo a análise ampla de fatores químicos, físicos e biológicos que possam causar imunomodulações indesejáveis, não só aquelas relacionadas à imunoestimulação, como também as que levam ao desenvolvimento da imunossupressão (KACMÁR; PISTL; MIKULA, 1999). Esta ciência surgiu nos anos de 1960, com a introdução maciça de medicamentos, como os quimioterápicos, para o tratamento de cânceres e medicamentos de potente ação imunossupressora empregados em transplantados renais (azatioprina e ciclosporina), cujos efeitos adversos observados causaram grande preocupação aos profissionais de saúde, pois estes resultavam, nos pacientes tratados, em maior suscetibilidade a processos infecciosos por patógenos oportunistas, maior ocorrência de linfomas e, também aumento acentuado na frequência de neoplasias sólidas induzidas por vírus (HUEZA; PALERMO-NETO, 2008).

Deste período para cá, vários estudos nessa área passaram a ser realizados com outras substâncias, as quais os seres humanos estavam e ainda estão expostos, como aqueles realizados por Selye, Tuchweber e Bertok (1966), que verificaram a maior suscetibilidade de ratos a endotoxinas de bactérias gram-negativas após uma única injeção de acetato de chumbo. Esta mesma alteração foi também verificada quando da exposição dos animais ao acetato de cádmio (COOK; HOFFMAN; Di LUZIO, 1975). Atualmente, existem muitas outras pesquisas realizadas, com diferentes compostos, como pesticidas, herbicidas e inseticidas (NAGARKATTI; NAGARKATTI, 1987; BANERJEE et al., 2008), evidenciando claramente os efeitos imunotóxicos destas substâncias.

Os resultados destes estudos levaram várias agências internacionais de normatização, como: *the U.S. Environmental Protection Agency* (US-EPA), *the U.S. Food and Drug Administration* (US-FDA), bem como, a *Organization for Economic Cooperation and Devevolpment* (OECD), a incorporarem em seus estudos de risco toxicológico de xenobióticos de interesse humano, ensaios de imunotoxicidade e também de imunotoxicidade do desenvolvimento fetal (LUSTER et al., 1988, 1992; LUSTER; DEAN; GERMOLEC, 2003; LUSTER; GERBERICK, 2010).

Os efeitos adversos, decorrentes da interação de xenobióticos com componentes do sistema imunológico, geralmente incluem danos estruturais e/ou funcionais em órgãos linfóides tais como, alteração da celularidade do timo, baço, medula óssea e linfonodos, proliferação anormal de células progenitoras na medula óssea, alteração no processo de maturação das células imunológicas, alterações nas subpopulações de Linfócitos T e B e alterações funcionais das respostas humoral e/ou celular (KIMBER; DEARMAN, 2002; BANERJEE et al., 2008). Estes efeitos indesejados podem resultar da ação direta e/ou indireta do xenobiótico (e/ou produtos de sua biotransformação) sobre o sistema imunológico; de uma resposta imunológica do hospedeiro à substância e/ou seus metabólitos ou de modificações dos antígenos do hospedeiro pelos próprios compostos ou seus metabólitos (IPCS, 1996). Assim, os efeitos imunotóxicos são divididos em quatro categorias: imunossupressão, imunoestimulação, hipersensibilidade e autoimunidade (LUSTER; SIMEOVOA; GERMOLEC, 2008; DESCOTES, 2004).

A imunossupressão é indicada por alteração no peso e histologia dos órgãos linfóides; alteração quantitativa da celularidade dos tecidos linfóides, leucócitos sanguíneos e medula óssea; desequilíbrio na função celular a nível efetora ou reguladora e aumento na suscetibilidade e gravidade das infecções e tumores (LUSTER; SIMEOVOA; GERMOLEC, 2008; BANERJEE et al., 2008). No caso da hipersensibilidade, o sistema imune responde ao agente como um alérgeno de baixo (hapteno) ou alto peso molecular, resultando em dermatite alérgica de contato, hipersensibilidade respiratória ou alimentar. A hipersensibilidade pode ser mediada por imunoglobulina (Ig) E e aparece minutos após a exposição ao alérgeno, ou mediada por células, a chamada hipersensibilidade do tipo tardia, e acontece 24-48 horas após a exposição. Já, a autoimunidade ocorre quando um agente induz direta ou indiretamente uma resposta imune contra constituintes próprios, alterando

a tolerância imunológica, resultando em conseqüências patológicas (KACMÁR; PISTL; MIKULA, 1999; LUSTER; SIMEOVOA; GERMOLEC, 2008).

Apesar do grande número de trabalhos destinados a elucidar os efeitos imunotóxicos de compostos de risco ao homem, poucos são aqueles que têm como objetivo exclusivo estudar os efeitos imunotóxicos de plantas tóxicas, que causam perdas econômicas importantes para a produção animal e também problemas de saúde pública.

2.5 SOBRE A TERATOLOGIA E TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Teratologia é o estudo do desenvolvimento anormal do feto. As categorias de risco teratogênico incluem fármacos, agentes químicos, infecciosos e físicos, alterações maternas e/ou metabólicas (WILSON, 2007). O termo toxicologia do desenvolvimento é recente e vem sendo empregado como sinônimo de teratologia; no entanto, atualmente o conceito de ambas as denominações é bem mais amplo, não mais se restringindo apenas a alterações de ordem morfológica.

O grande divisor de águas neste ramo da ciência ocorreu em 1961, quando se estabeleceu a associação entre a ingestão da talidomida, um medicamento utilizado como sedativo, empregado em situações para controle da ansiedade e náuseas, por mulheres gestantes, e o nascimento de crianças severamente malformadas, as quais apresentavam normalmente focomelia, malformação caracterizada por encurtamento dos membros. Portanto, a partir desta constatação foi que a teratologia ganhou notoriedade como ciência e os primeiros princípios foram redigidos por especialistas da Organização Mundial da Saúde em 1967 (WHO, 1967). Após este episódio da talidomida, houve um grande incremento nas pesquisas em teratologia, além disso, verificou-se a necessidade de se avaliar os riscos de teratogenicidade de agentes tóxicos.

A toxicologia do desenvolvimento tem seus conceitos baseados nos princípios gerais da teratologia propostos por Wilson (1965), sendo estes os seguintes: a susceptibilidade para o desenvolvimento de teratogênese depende do

genótipo do conceito e o modo como este interage com fatores ambientais adversos; a susceptibilidade para o desenvolvimento de teratogênese varia de acordo com o estágio do desenvolvimento em que ocorreu a influência adversa; agentes teratogênicos agem em mecanismos específicos durante o desenvolvimento celular e tecidual e geram eventos anormais; o acesso de influências adversas em tecidos em desenvolvimento depende da natureza do agente; as quatro manifestações de um desenvolvimento anormal são a morte, malformação, crescimento retardado e deficiências funcionais; as manifestações de um desenvolvimento anormal tem a frequência e o grau aumentados com o aumento da dose.

Atualmente, este campo da toxicologia abrange o estudo da toxicocinética, mecanismo de ação do tóxico, patogênese e as conseqüências da exposição a agentes tóxicos ou condições que levem ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS et al., 1987; ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Para que um agente seja classificado como um toxicante do desenvolvimento, é necessário que este produza seus efeitos adversos no conceito, em níveis de exposição que não induzam sinais graves de toxicidade materna (isto é, perda de peso, êmese persistente, hipo- ou hiperatividade, convulsões etc.).

O período de desenvolvimento embriológico e fetal consiste num desenrolar contínuo de mudanças e variações complexas, sendo marcadas por fases durante as quais se desenvolvem processos similares nas diferentes espécies de vertebrados. Este desenvolvimento embriofetal de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos: implantação, organogênese ou organogenético, desenvolvimento fetal e período neonatal. A exposição a agentes tóxicos no período inicial do desenvolvimento (implantação) pode não causar embriotoxicidade, a menos que seja em uma dose elevada e, neste caso, normalmente verifica-se embrioletalidade. O período de organogênese, organogenético ou embriogênico abrange desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares; neste período poderá ocorrer malformações estruturais se as lesões produzidas por um agente tóxico forem compatíveis à vida. Após a organogênese segue-se o período fetal e neonatal, exposições que se iniciam durante estes períodos podem apresentar anormalidades celulares e teciduais, entretanto, os

defeitos no desenvolvimento mais característicos são o retardo no crescimento e anormalidades funcionais (WILSON, 1965). As anomalias do SNC e imune, tais como déficit no comportamento, mental e motor, bem como imunossupressão, estão entre as prováveis consequências.

Um ponto que deve ser reavaliado quando se consideram os atuais protocolos utilizados para o estudo da teratologia é que estes apenas indicam os possíveis efeitos tóxicos mais óbvios que são a morte, alteração no desenvolvimento e as alterações estruturais (malformações/anomalias). Portanto, alterações mais sutis, mas não menos importantes, como aquelas imunotóxicas, são descartadas da avaliação da teratogenicidade.

Atualmente, esses protocolos de avaliação são empregados por várias agências normativas no mundo todo, embora existam ainda pequenas variações entre os diferentes protocolos. Além disso, por causa de alguns fatores, como experiência prévia, aumento do conhecimento relativo à biologia do desenvolvimento, a quantidade imensa de produtos que devem ser avaliados e os custos dos testes, mudanças freqüentes têm sido introduzidas nesses protocolos de avaliação (GÓRNIK; SPINOSA; BERBARDI, 2008).

Portanto, a presente pesquisa tem por objetivo não somente estudar os possíveis efeitos imunotóxicos e teratogênicos produzidos pelos APs de *Senecio brasiliensis* em ratos, mas também, e principalmente, de melhor estabelecer e sedimentar o protocolo de avaliação de imunotoxicologia, particularmente de imunoteratologia, que vem sendo desenvolvido em nosso laboratório, sendo tema de teses de doutoramento, dissertação de mestrado e projeto de pesquisa realizados (HUEZA, 2006; HUEZA et al., 2009; MARIANO-SOUZA, 2009; DIPE, 2009).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos produzidos pela administração do RB de *S. brasiliensis*, em diferentes doses, sobre o sistema imune de ratos machos adultos.
- Avaliar os possíveis efeitos teratogênicos, seja seguindo o protocolo de avaliação clássica, como também os imunoteratogênicos da administração do RB da *S. brasiliensis* administrado a fêmeas tratadas durante a gestação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração e identificação dos alcalóides presentes no *S. brasiliensis*: extrair, identificar e obter o grau de pureza dos alcalóides pirrolizidínicos presentes no RB extraído das folhas secas de *S. brasiliensis*.
- Escolha da dose: realizar ensaios preliminares com o RB, com avaliação macro e microscópica de amostras teciduais e bioquímica sérica de ratos tratados com diferentes doses do RB, para obtenção de doses tóxicas e aquelas passíveis de serem empregadas nos ensaios de imunotoxicidade.
- Órgãos linfóides e parâmetros hematológicos de ratos machos adultos: analisar a contagem de eritrócitos e leucócitos circulantes; avaliar o peso relativo e a histopatologia de órgãos linfóides (timo e baço); verificar a celularidade da medula óssea e do baço.

- Atividade de fagócitos de ratos machos adultos: avaliar a atividade de neutrófilos circulantes e macrófagos peritoneais por meio da fagocitose e *burst* oxidativo por citometria de fluxo.
- Imunidade humoral de ratos machos adultos: avaliar a produção de anticorpos primários e titulação dos mesmos após desafio.
- Atividade proliferativa de linfócitos de ratos machos adultos: verificar a atividade proliferativa *in vitro* de linfócitos T e B.
- Imunidade celular *in vivo* de ratos machos adultos: avaliar a resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (*Delay type hypersensitivity* – DTH).
- Fenotipagem linfocítica de ratos machos adultos: Quantificação de Linfócitos T e B do baço, através de marcadores de superfície por citometria de fluxo.
- Toxicidade materna: Verificar a possível ocorrência de toxicidade materna promovida pela administração do RB do *S. brasiliensis*, em diferentes doses, durante a gestação. Avaliação por meio da mensuração do ganho de peso, do consumo de ração, da análise bioquímica e parâmetros hematológicos.
- Desempenho reprodutivo: Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração do RB do *S. brasiliensis*, em diferentes doses, sobre o desempenho reprodutivo de ratas tratadas durante a gestação.
- Teratogenicidade: Verificar os possíveis efeitos teratogênicos clássicos promovidos pela administração do *S. brasiliensis*, em diferentes doses, na prole de ratas tratadas durante a gestação, através de análise óssea.
- Imunoteratogenicidade: Avaliar os órgãos linfóides e parâmetros hematológicos de ratos machos adultos, cujas mães receberam RB do *S. brasiliensis* durante a gestação: contagem de eritrócitos e leucócitos circulantes; avaliar peso relativo e histopatologia de órgãos linfóides (timo e baço); verificar celularidade da medula óssea e baço.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP, protocolo nº 1461/2008, aprovado em 21/08/2008.

Estes animais foram mantidos em salas com temperatura e umidade constantes (21-24° C e 65-70%, respectivamente) por meio de aeração, exaustão e ventilação e com livre acesso à água e ração (Nuvilab[®] balanceada para roedores). A iluminação da sala foi mantida em um ciclo de noite/dia de 12 horas, sendo a fase clara iniciada às 6:00 horas. Os animais ficaram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm. Os animais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo três dias antes do início de cada experimento, quando estes foram pesados para o controle de peso e ajuste da dose.

4.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Acetona (Synth), ácido acético (Synth), ácido clorídrico (1N) - (Synth), ácido orto-fosfórico (Synth), adjuvante completo de freud (Sigma), álcool etílico (Archote), alizarina vermelha, analisador bioquímico CELM – SBA 200, analisador sanguíneo ABC Vet[®] (Horiba), anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE) anti- CD3 (clone G4 18), anti-CD4 (clone OX-35) e anti-IgM (clone G53-238), conjugados a peridinin chlorophyll protein-cyanine (PerCP) anti-CD8a (clone OX-8), conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD 45 (clone HIS24), e anticorpo purificado anti-CD32 (clone D34-485) (Pharmigen, BD), azul de Tripan 4% (Gibco), centrífuga

refrigerada (Eppendorf), citometro de Fluxo (Becton Dickison Immunocytometry System), EDTA (Merck), cloreto de sódio (Nuclear), espectrofotômetro (Biotek), formol (Quimex), glicerina, glutaraldeído 25% (Nuclear), hepes (Gibco); hidróxido de sódio (Merck), hidróxido de amônio (Synth), iodeto de propídeo (Sigma), KLH (Calbiochem), Kit de ELISA para as seguintes citocinas de rato: IL-6, IL-4, TNF- α , IFN- γ (BD Biosciences), leitor de Elisa (Labsystems), Líquido de buin, LPS (Sigma), meio de cultura RPMI-1640 (Gibco), microscópio de luz modelo Nikon, MTT (Sigma), nitrito de sódio (Synth), penicilina e estreptomicina (Cultlab), PMA (Sigma), RNase A (Sigma), rotaevaporador (Fisaton), soro bovino fetal (Gibco), tioglicolato (Gibco), Tris (Gibco).

4.3 MATERIAL VEGETAL

As folhas secas e moídas de *S. brasiliensis* foram fornecidas pela Doutora Ana Lucia Schild, coordenadora do Laboratório Regional de Diagnóstico, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. As mesmas foram coletadas da região de Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul, no início de 2008, e identificadas como *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. var. *brasiliensis*, Voucher número 24.592. A planta foi seca à sombra em temperatura ambiente, moída e congelada à -20°C até o momento da extração.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 **Análise quantitativa dos alcalóides presentes nas folhas de *Senecio brasiliensis***

As folhas secas e moídas pesando 200 mg, em duplicata, foram extraídas em ácido clorídrico 1N (4 mL) e clorofórmio (4 mL) por 1h. A amostra foi centrifugada e a porção ácida removida e o amostra restante foi re-extraída com ácido (2mL). Os

extratos ácidos foram reunidos. Uma das amostras foi reduzida com zinco em pó por 30 min. Em seguida, os dois extratos foram ajustados para pH 9-10 com hidróxido de amônio, extraídos com 2 mL de clorofórmio por 3 vezes, filtrados através de sulfato de sódio anidro e evaporados até secar. As amostras foram analisadas por CG/EM por adição de 1 mL de clorofórmio para análise quantitativa e análise por ressonância magnética nuclear de prótons depois da adição de 0.250 mL de nitrobenzeno (1 mg/mL clorofórmio) e 0,35 mL de clorofórmio para análise quantitativa de total de alcalóides pirrolizidínicos .

A porção do extrato alcaloídico foi dissolvido em metanol na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas do extrato (0,1mL) foram extraídas como material da planta descrita acima. Amostras foram analisadas por CG/EM e CLAE/EM. Porções de 1,0 mL foram também extraídas com processo ácido/base para análise de ressonância magnética nuclear. Esta parte de quantificação foi realizada pelo Dr. Dale R. Gardner do *USDA/ARS -Poisonous Plant Research Laboratory*, Logan, Utah, Estados Unidos da América

4.4.2 Extração de alcalóides empregando a técnica clássica de Stas-Otto modificada

As folhas secas e moídas de *S.brasiliensis*, pesando 900 g foram maceradas em etanol 92% por 3 dias e filtradas para obter extrato etanólico. A torta foi re-extraída empregando os mesmos procedimentos por mais 3 vezes. Os extratos etanólicos foram reunidos e o solvente foi eliminado em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura aproximada de 40°C. O extrato etanólico, isento de etanol, foi acidificado com ácido tartárico 10% e filtrado em papel de filtro para obter um resíduo ceroso de coloração esverdeada e uma solução ácida. Esta solução foi fracionada por partição, inicialmente extraída com acetato de etila e, em seguida, com clorofórmio, exaustivamente, para obter respectivamente solução de acetato de etila e solução clorofórmica. Ambas as soluções foram evaporadas os solventes para obter os respectivos resíduos: resíduo acetato de etila (RAE) e resíduo clorofórmico ácido (RC H⁺). Posteriormente, a solução aquosa ácida restante foi alcalinizada com

hidróxido de amônio até pH 9-10 e extraída consecutivamente com clorofórmio e butanol saturado com água. A solução clorofórmica e a solução butanólica foram evaporadas totalmente para obter os respectivos resíduos: resíduo clorofórmico alcalino (RC OH⁻) e resíduo butanólico (RB).

Os resíduos denominados: RAE, RC H⁺, RC OH⁻ e RB, além dos padrões de alcalóides pirrolizidínicos (senecionina, integerrimina, monocrotalina e retrorsina) foram cromatografados em camada delgada empregando placa com sílica gel 60 G da Merck, desenvolvidos em mistura de solventes constituídos de clorofórmio, metanol e hidróxido de amônio na proporção de 82,5: 15,5: 2 e revelados com reagente de Dragendorff.

4.4.3 Identificação do constituinte químico do RB por ressonância magnética nuclear

O RB obtido do fracionamento por partição do extrato etanólico, conforme descrito no item 4.4.2, foi submetido à espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13 na Central Analítica do Instituto de Química da USP para fins de identificação do seu constituinte químico.

4.4.4 Administração do RB do *S. brasiliensis*

As doses do RB do *S. brasiliensis* empregadas no presente trabalho de pesquisa foram: 3, 6, 9 e 20 mg/kg de peso vivo. O RB foi diluído em água destilada para obtenção das diferentes doses, as quais foram mantidas em geladeira até o momento do uso. Os animais dos grupos experimentais receberam as diferentes doses do RB, por via oral (gavagem) enquanto que os ratos pertencentes aos grupos controles receberam, pela mesma via e período, apenas veículo (água destilada) em volume equivalente ao seu peso corpóreo.

4.4.5 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração

Os ratos e ratas foram pesados antes do início da administração do RB do *S. brasiliensis* para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. Posteriormente, o consumo de ração, bem como o peso dos animais, foram medidos a cada três dias, durante todo o período experimental.

4.4.6 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Para a coleta de sangue os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular) e foram submetidos à cirurgia para exposição da veia cava caudal e coleta de sangue com anticoagulante EDTA para avaliação do hemograma completo, série vermelha e branca. Quando esta via não foi possível utilizou-se a via intracardíaca. O hemograma foi realizado por meio de um sistema automatizado (aparelho ABC Vet da Horiba).

4.4.7 Análise bioquímica

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

As avaliações dos níveis séricos de ALT, AST, FA, GGT, glicose, colesterol, uréia, creatinina, albumina e proteína total foram realizadas por meio da utilização de Kit comercial da Laborlab em equipamento da CELM – SBA 200, o qual tem como princípio o teste UV otimizado de acordo com a IFCC (Federação

Internacional de Química Clínica). A metodologia empregada para determinação dos níveis destas enzimas acima citadas estão de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante.

4.4.8 Viabilidade celular e contagem de células

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

4.4.9 Avaliação de peso relativo de timo e baço e celularidade de baço

Ao final do período de experimentação, os animais foram submetidos à eutanásia sendo imediatamente coletados o timo e o baço. A seguir, procedeu-se à pesagem desses órgãos e, após este procedimento, o baço foi divulsionado entre duas lâminas e lavado com 10 mL de solução gelada de RPMI-1640 com pH 7,4. As células foram acondicionadas em gelo até o momento da contagem conforme descrito no item 4.4.8.

4.4.10 Avaliação global de células da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral de cada animal, após a lavagem da mesma com 5,0 mL de solução gelada de RPMI ajustada

para o pH 7,4. As células foram acondicionadas em tubos tipo falcon e dispersas com auxílio de pipeta tipo “Pasteur” até obter-se uma suspensão celular homogênea. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas como descrito no item 4.4.8.

4.4.11 Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais através do *burst* oxidativo, da fagocitose e da produção de NO

4.4.11.1 Coleta das células peritoneais elicitadas pelo tioglicolato 3%

Quatro dias antes da eutanásia, os animais receberam por via intraperitoneal, 8,0 mL de tioglicolato a 3% estéril, com o objetivo de eliciar macrófagos para esta cavidade. Após os animais serem submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, foram injetados cerca de 10 mL de PBS a 4°C na cavidade peritoneal de cada animal e, após massagem abdominal, foi colhida uma suspensão de células, através de uma punção da cavidade peritoneal. Estas células foram mantidas em banho de gelo, dentro de tubos de ensaio de plástico de polipropileno até serem quantificadas em câmara de Neubauer (item 3.4.8). As suspensões de células conservadas em banho de gelo e foram ajustadas para cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

4.4.11.2 Execução da técnica para avaliação do burst oxidativo e fagocitose

Após o ajuste de células, os tubos (cinco por amostra) para a citometria de fluxo foram preparados da seguinte maneira:

Tubo 1: $2,0 \times 10^5$ células em 1 mL de PBS

Tubo 2: 100 µL da amostra, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM) em 800 µL de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde

Tubo 3: 100 μ L da amostra, 100 μ L de *Staphylococcus aureus* conjugado com o iodeto de propídeo (SAPI) em 900 μ L de PBS. O iodeto de propídeo se intercala ao DNA da célula e emite uma fluorescência vermelha

Tubo 4: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de SAPI em 700 μ L de PBS

Tubo 5: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de PMA (1ng/ μ L) em 700 μ L de PBS.

O PMA e o SAPI foram usados como estímulos *in vitro* para a produção de radicais livres de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min, logo após adicionou-se 2 mL de EDTA (3 mM) para parar a reação. As amostras foram então centrifugadas 1500 rpm por 5 min e ressuspensas em 300 μ L de PBS. Em seguida fez-se a análise por citometria de fluxo.

Cada amostra foi passada no citômetro de fluxo sendo adquiridos 10.000 eventos. Os valores referentes ao *burst* oxidativo e a fagocitose foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos macrófagos peritoneiais. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os dados foram analisados através do programa FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA).

4.4.11.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos elicitados

Foi preparada, após a coleta das células peritoneais, uma suspensão de 2×10^6 células/mL com RPMI-1650 com 5% de soro fetal bovino. Cinquenta μ L desta solução foram plaqueadas em duas placas de 96 poços, sendo uma coluna de poços para cada animal. A avaliação da produção de NO por macrófagos elicitados foi realizada por meio da quantidade de nitrito (NO_2 nMol/mg proteína) presente no meio de cultura celular. Cinquenta μ L do sobrenadante (meio) foram adicionados à igual volume de Reagente de Greiss nas placas de 96 poços com fundo chato. As

placas foram incubadas a 37°C por mais 10 minutos e então foram lidas em leitor de ELISA sob comprimento de onda de 540nm.

4.4.12 Necropsia e coleta de material para avaliação histopatológica

Após a eutanásia dos animais pertencentes aos diferentes tratamentos, os mesmos foram avaliados macroscopicamente para detecção de possíveis lesões e procedeu-se a coleta de vários órgãos (SNC, pulmão, coração, fígado, rins, baço e timo) para análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em formol 10% tamponado, processados seguindo as técnicas de rotina, cortados a 5 micra e corados por hematoxilina e eosina.

4.4.13 Acasalamento e confirmação da prenhez

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

4.4.14 Parâmetros avaliados após a cesariana

No DG 21 as ratas prenhes foram anestesiadas com xilazina e cetamina (nas doses respectivamente de 5 e 50 mg/kg, por via intramuscular). Foi realizada a laparotomia e exposição dos cornos uterinos (Figura 6), para a contagem de pontos de implantações e reabsorções. Os ovários foram removidos e com o auxílio de uma

lupa, foi feita a contagem dos corpos lúteos para avaliação da quantidade de óvulos liberados. O útero gravídico foi pesado, e foi observado o número total de fetos, a viabilidade fetal logo após o nascimento, peso, sexo, comprimento e o peso das placentas. As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação, foram calculadas por meio da seguinte proporção:

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

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

Onde: CL= número de corpos lúteos FV= número de fetos vivos IM= número de implantações

Figura 6 - Exposição do útero gravídico através da laparotomia, observação de implantes e fetos

4.4.15 Análise óssea

Para a análise óssea, após a cesariana, os filhotes foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ e quatro filhotes (sempre que possível), de cada ninhada, foram colocados em acetona, permanecendo nesta solução por 24 horas. Os filhotes foram submetidos ao procedimento de evisceração. Após esse procedimento, foi realizada a diafanização que consiste em colocar os fetos em uma

solução de hidróxido de potássio 0,8%, preparada diariamente com água destilada e alizarina, conforme o método proposto por Staples e Schenell (1964) no qual esta solução é trocada diariamente por 4 dias. Posteriormente, os fetos foram conservados em solução clareadora até o dia da análise esquelética (Figura 7) que foi realizada segundo Taylor (1986). Em seguida os fetos foram observados em um estereoscópio com aumento de 10X. Foi analisado o grau de ossificação através da contagem dos ossos dos principais centros de ossificação (falanges, metacarpos, metatarsos, costelas, vértebras caudais e esternobras) e também, a ocorrência de variações e malformações ósseas.

Fonte: DIPE, 2009.

Figura 7 - Fetos prontos para a análise óssea com os ossos corados pela alizarina vermelha

4.4.16 Avaliação da atividade proliferativa e da fenotipagem de linfócitos B e T do baço

4.4.16.1 Procedimento geral

Primeiramente, coletou-se, assepticamente, um pedaço de baço, o qual foi acondicionado em microtubos de 2 mL, contendo 1 mL de RPMI estéril. Após duas lavagens com RPMI estéril, o baço foi divulsionado com 5 mL de RPMI estéril, até obter uma suspensão de células. Esta suspensão foi centrifugada a 1500 rpm/5 min e ressuspensa em 10 mL de solução de lise estéril. Cerca de dois minutos após, as amostras foram novamente centrifugadas. Este processo foi repetido mais uma vez para completa lise dos eritrócitos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 5 mL de RPMI completo (10 % soro fetal bovino) estéril, contadas e ajustadas para 1×10^6 céls/100 μ L em microtubos de 1,5 mL, para marcação das moléculas de superfície. O restante das células foram colocadas em placas de 6 poços e incubadas por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Esta etapa serve para separar as células aderentes e não aderentes fiquem aderidos às placas e apenas os linfócitos fiquem em suspensão. Depois deste período de incubação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos tipo falcon de 15 mL para posterior contagem (item 4.4.8) e ajuste de células.

4.4.16.2 Proliferação de linfócitos B e T

A proliferação de linfócitos foi realizada por metodologia colorimétrica do MTT. Alíquotas de 10 μ L foram retiradas de cada amostra e as células foram contadas e ajustadas para $7,5 \times 10^6$ céls/mL e colocou-se 80 μ L dessa suspensão (10^7 céls/mL) em placas de 96 poços de fundo em U. Cada amostra foi plaqueada em quadruplicata para cada estímulo da seguinte maneira: 4 poços com 20 μ L de meio completo (basal), 4 poços com 20 μ L de ConA (100 μ g/mL, mitógeno para linfócitos T) e 4 poços com 10 μ L de LPS (300 μ g/mL, mitógeno para linfócitos B)

mais 10 µL de RPMI completo, assim todas as amostras ficaram com o mesmo volume. A seguir as placas foram incubadas 37°C a 5% de CO₂ por 72 h. Três horas antes de completar este período, foi adicionado 10 µL de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço e as placa foram incubadas até completar 72 h. Após este período, foi adicionado em cada poço, 100 µL álcool acidificado (álcool isopropílico 10% em HCl 0,01N) para dissolver os cristais de formazan formados. Foi realizada a homogeneização das amostras e as mesmas foram transferidas para placas de 96 poços de fundo plano. As placas foram lidas em leitor de ELISA sob comprimento de onda de 570nm. O índice de proliferação foi calculado conforme segue:

$$\text{Índice de proliferação} = \frac{\text{Absorbância de linfócitos com mitógeno}}{\text{Absorbância de linfócitos sem mitógeno}}$$

4.4.16.3 Fenotipagem de linfócitos T e B do baço por citometria de fluxo

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

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

A caracterização das moléculas de superfície dos linfócitos T foi realizada com o uso de anticorpos monoclonais conjugados a fluoresceína ou ficoeritrina: anti-

CD4 para linfócitos T helper, anti-CD8 para linfócitos T citotóxicos e finalmente, anticorpos anti-CD45 e IgM para linfócitos B. Para bloquear receptores inespecíficos foram utilizados anticorpos anti-CD32 (obs: apenas este é incubado em temperatura ambiente, cerca de 5 min, antes de proceder as outras marcações). 100 µL de uma suspensão de esplenócitos (10^6 céls/mL) foram acondicionados em tubos para citometria e incubados com os diferentes anticorpos marcados, durante 30 min, no escuro, à 4°C. Após este período, as células foram lavadas e ressuspensas em 300 µL de PBS para então ser analisado por meio de citometria de fluxo.

4.4.17 Avaliação do ciclo celular de linfócitos esplênicos

Suspensões celulares esplênicas provenientes de oito ratos foram preparadas como descrito no item 4.4.16.1. O tratamento com integerrimina *in vitro* foi realizado em quadruplicata com as mesmas doses propostas por Santos-Mello et al. (2002). Resumidamente, o RB foi adicionado a cultura (2×10^5 células/poço) na concentração final de 0,12 e 1,2 mg/mL, que correspondem a 0,08 e 0,8 mg/mL de integerrimina N-óxido, respectivamente. Culturas de esplenócitos sem RB representaram o controle negativo.

A fim de induzir a proliferação de linfócitos foi adicionado ConA em uma concentração final de 1 mg/mL. As células foram incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por 72 horas. Após este período, os linfócitos foram fixados em etanol 70% durante 2 h a -20°C para a análise do ciclo celular. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS (5 min, 2000 rpm) e incubadas com 200 µL de solução de PI (20 µg/mL de iodeto de propídeo, 200 µg/mL de RNase A e triton 0,1% (v/v) em PBS) por 15 min a 37°C. Então, 10.000 eventos foram adquiridos a partir de cada amostra em um citometro de fluxo FACS Calibur equipado com o Quest celular Pro[®] (Becton Dickinson (BD) Immunocytometry System). Os dados foram analisados através do programa FlowJo 7.2.2[®] (Tree Star Inc, Ashland, USA) e representados em porcentagem.

4.4.18 Avaliação dos neutrófilos circulantes por medida de *burst* oxidativo e fagocitose por meio de citometria de fluxo

Foi utilizado o método proposto por Hasui et al. (2004) com modificações. No final do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular), seguindo-se a coleta de sangue heparinizado. Os tubos (cinco por amostra) para a citometria de fluxo foram preparados da seguinte maneira:

Tubo 1: 100 μ L de sangue em 1 mL de PBS

Tubo 2: 100 μ L de sangue, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M) em 800 μ L de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde.

Tubo 3: 100 μ L de sangue, 100 μ L de *Staphylococcus aureus* conjugado com o iodeto de propídeo (SAPI) em 900 μ L de PBS. O iodeto de propídeo se intercala ao DNA da célula e emite uma fluorescência vermelha.

Tubo 4: 100 μ L de sangue, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de SAPI em 700 μ L de PBS.

Tubo 5: 100 μ L de sangue, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de PMA (1ng/ μ L) em 700 μ L de PBS.

O PMA e o SAPI foram usados como estímulos *in vitro* para a produção de radicais livres de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min, logo após adicionou-se 2 mL de EDTA (3mM) para parar a reação. As amostras foram então centrifugadas 1500 rpm/5 e ressuspensas em 2 mL de cloreto de sódio 0,2%. Após 20 segundos, foram adicionados 2 mL de cloreto de sódio 1,6% e as amostras foram centrifugadas novamente. Este processo foi repetido mais uma vez para lise completa dos eritrócitos. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS. Em seguida fez-se a análise por citometria de fluxo.

Cada amostra foi passada no citômetro de fluxo sendo adquiridos 10.000 eventos. Os valores referentes ao *burst* oxidativo e a fagocitose foram avaliados através da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a

população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os dados foram analisados através do programa FlowJo 7.2.2[®] (Tree Star Inc, Ashland, USA).

4.4.19 Avaliação da resposta imune celular por meio da reação de hipersensibilidade do tipo tardia – *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH)

Para a sensibilização imunológica dos ratos, foi injetado, por via subcutânea, na base da cauda de cada animal, 0,1mL de KLH em (1,0 mg/mL PBS) emulsificado em Adjuvante Completo de Freud na razão de 1:1.

Sete dias após a sensibilização, preparou-se o *heat-aggregated* KLH, aquecendo-se o mesmo (10 mg/mL em salina) por 1 hora em banho-maria a 75°C. Esta solução foi centrifugada a 2000 rpm, por 10 minutos, para remover o excesso de salina; a seguir a solução foi injetada (0,1 mL/por animal) no coxim plantar direito dos animais.

Após 24 horas de desafio, o edema resultante foi mensurado. A avaliação da resposta imune celular (DTH) foi expressa a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata direita 24 horas depois do desafio com aquele valor da mensuração antes do inóculo.

4.4.20 Avaliação da resposta imune humoral

4.4.20.1 A sensibilização

Para a imunização dos ratos, eritrócitos de carneiro (SRBC) foram lavados 3x em salina (3000 rpm, 15 min, a 10°C) e uma suspensão de células a $2,0 \times 10^9$ SRBC/mL foi preparada. Cada rato adulto recebeu 1,0 mL desta suspensão por via ip.

4.4.20.2 Avaliação dos títulos de anticorpos anti-SRBC

Sete dias após a sensibilização, os animais foram submetidos à coleta de sangue, sem anticoagulante, para obtenção do soro e realização da titulação de anticorpos. Para a titulação, foi colocado no primeiro poço de uma placa de 96 poços de fundo em U, 30 µL de soro de rato não sensibilizado com o SRBC (fonte de sistema complemento) e em cada poço subsequente (linha) foram colocados 30 µL de salina. A seguir, foram então plaqueadas as amostras de soro coletadas dos ratos da seguinte forma: na primeira linha de poços, plaqueou-se 30 µL de soro de animal não sensibilizado no primeiro poço (controle negativo); deste, retirou-se 30 µL e adicionou-se no segundo poço e assim por diante, até o 12º poço (diluição seriada). Na sequência de linhas, plaqueou-se o soro dos animais sensibilizados. Após a diluição seriada do soro, foram adicionados a cada poço, 30 µL da suspensão de SRBC a 10%.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C, por uma hora, e após este período fez-se a leitura. Estabeleceu-se o título de anticorpos como sendo aquele em que o botão de eritrócitos formado (hemossedimentação) foi semelhante àquele do controle negativo, bem como semelhante às diluições subsequentes; isto é, a partir do momento em que não mais foi observada a hemaglutinação ocasionada pelos anticorpos anti-SRBC. O título de anticorpos foi expresso de acordo com a graduação da diluição realizada nos poços da placa, sendo a primeira diluição (1/2) tida como título 1, e assim subsequentemente.

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

4.4.20.3.1 O ensaio do PFC

Para a preparação do SRBC que foi utilizado para plaquear as amostras, os eritrócitos de carneiro foram lavados 3x (na mesma rotação que acima), na última

lavada, tirou-se o sobrenadante e homogeneizaram-se os eritrócitos no tubo (SRBC total). Desta solução de SRBC total, fez-se uma diluição de 1:2 (p.ex. 0,5 mL de SRBC total + 0,5 mL de salina) e manteve-se em gelo até o momento de plaquear. Após a eutanásia dos animais sensibilizados um fragmento do baço foi coletado e divulsionado. Em seguida, os esplenócitos foram centrifugados (centrífuga 1500 rpm, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante foi retirado, e adicionou-se solução salina 0,2% a qual foi homogeneizada por 20 segundos com o botão de células para promover a lise das células vermelhas e imediatamente depois foi adicionado o mesmo volume de uma solução salina a 1,6%. Os esplenócitos foram contados e preparou-se uma suspensão celular em meio RPMI-1640 com 12×10^6 células/mL. Para a preparação da placa, foi colocada solução de bacto ágar a 0,5% em RPMI. Esta solução foi mantida em homogeneizador magnético sob agitação e aquecimento até fervura. Após fervura, foi adicionado DEAE-dextrano (1,6 mL de uma solução 0,05% de DEAE para cada 100 mL de ágar). Enquanto isso, foram colocados em banho-maria sob a temperatura de 46 a 48°C, microtubos (1,5 mL) já com a identificação das amostras. Em cada microtubo, ainda no banho-maria, adicionou-se 0,5 mL da solução de bacto ágar.

4.4.20.3.2 O plaqueamento

Para plaquear, adicionou-se em um microtubo de 0,5 mL: 25 µL da suspensão de SRBC (1:2) + 100 µL da suspensão de esplenócitos e 70 µL de soro de cobaia (sistema complemento). Após fazer esta mistura de suspensões celulares, transferiu-se para o microtubo com bacto Agar, o qual foi submetido ao vórtex por 5 vezes e, em seguida, foi plaqueado em lâmina de histologia, previamente limpa com álcool 70°, 50 µL desta suspensão. Cuidadosamente foi colocada uma lamínula (22x22mm) sobre a gota. Aguardaram-se alguns minutos e a lamínula foi selada com esmalte incolor. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 3 h. Após este período, os halos de lise dos SRBC foram contados em microscópio de contraste de fase e representados com número de PFC/ 10^6 esplenócitos.

4.4.21 Mensuração das citocinas séricas circulantes

As placas para realização do ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL4 e anti-IL-6 diluídos em tampão de captura (1:250), sendo distribuídos 100 μ L/poço, e incubadas à temperatura de 4°C overnight. Em seguida, as placas foram lavadas (3 vezes) com 300 μ L/poço de uma solução de PBST (Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200 μ L/poço de diluente de ensaio (PBS + e 10 % de Soro fetal bovino) por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBST e, em seguida, adicionados 100 μ L/poço dos respectivos padrões nas concentrações indicadas pelo fabricante, ou amostras em duplicata.

Os padrões foram distribuídos no volume de 100 μ L nos primeiros poços nas concentrações iniciais de 3000 pg/mL para IFN- γ , de 2000 pg/mL para IL-10 e de 100 pg/mL para IL-4, de 2000 pg/mL para TNF- α , de 5000 pg/mL para IL-6 e feitas diluições seriadas até as concentrações de 31,3 pg/mL, 15,6 pg/mL, 1,6 pg/mL, 31,3 pg/mL e 78 pg/mL, respectivamente para cada citocina com diluente de ensaio e as amostras foram distribuídas sem diluição. As placas foram então seladas e incubadas a 4°C por 2 h. Após esta incubação, as placas foram lavadas (5 vezes) com PBST. Em seguida foi adicionado 100 μ L/poço do detector de trabalho, previamente preparado conforme recomendação do fabricante.

As placas foram seladas e incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada 7 vezes com PBST (entre cada lavagem esperou-se 30 segundos) e o substrato reagente TMB (tetramethylbenzidine e hydrogen peroxidase), previamente preparado, foi adicionado às placas, 100 μ L/poço, e estas incubadas à temperatura ambiente (no escuro) por 30 min. A reação foi então bloqueada com 50 μ L/poço ácido fosfórico 1 M e a leitura realizada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm dentro de 30 minutos.

4.4.22 Avaliação da densidade urinária

As amostras de urina foram obtidas por cateterização uretral, ou punção vesical, sendo acondicionada em microtubos de polipropileno sendo realizada imediata determinação da densidade urinária através da refratometria.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5.00, e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seu respectivo erro-padrão (média $\pm$ SEM).

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

No experimento, cujo número de grupos era igual a 2 foi realizado o teste *t-Student*, para a detecção das diferenças estatisticamente significantes. Caso os dados não fossem paramétricos foi realizado o teste de Kruskall Wallis seguido do teste de Dunn. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

*Delineamento experimental e
Resultados*

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *S. brasiliensis*

As folhas secas de *S. brasiliensis*, após submetidas ao CG/EM, revelaram ter a presença de três alcalóides pirrolizidínicos, sendo a integerremina aquele de maior concentração em relação à senecionina e à monocrotalina, como pode ser observado na figura 8. A análise quantitativa por CLAE/EM e espectrometria de ressonância magnética nuclear indicou rendimento de 1,84% de alcalóides pirrolizidínicos totais nas folhas secas.

Por meio da técnica clássica de extração de Stas-Otto foram obtidos os seguintes rendimentos: 9,29g de resíduo de acetato de etila; 0,37g de resíduo clorofórmico em meio ácido; 2,46g de resíduo clorofórmico em meio alcalino e 20,7g de resíduo butanólico (RB). Os cromatogramas em camada delgada em sílica gel dos resíduos desenvolvidos, tanto no sistema de solventes A como B mostraram as mesmas manchas de coloração alaranjada para alcalóides. No sistema B, os resíduos clorofórmicos tanto em meio ácido como meio alcalino indicaram manchas com R_f semelhantes aos padrões de senecionina (R_f 0,69) e integerremina (R_f 0,69). Entretanto no resíduo clorofórmico obtido em meio alcalino foi visualizando também uma mancha no R_f semelhante à retrorsina (R_f 0,48) e/ou monocrotalina (R_f 0,51). O RB apresentou uma mancha principal, característica de alcalóide, no R_f 0,42.

Análise quantitativa do RB, tanto em CLAE/EM como em espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H e ^{13}C), forneceu aproximadamente 69% de alcalóide e, após as análises de seus dados espectrais com os modelos da literatura indicaram ser integerremina *N*-óxido (REINA et al., 2001).

Com esses resultados acima descritos foi possível verificar que as doses empregadas no presente trabalho foram de 2,07; 4,14; 6,21 e 13,8 mg/kg de integerrimina *N*-óxido, presentes em 3, 6, 9 e 20 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*, respectivamente.

C:\Calibundat\PA082608_03
S. brasiliensis w/Zn

8/26/2008 5:40:55 PM

RT: 5.97 - 20.02

NL:
4.99E7
TICF:
MS
PA082608_
03

a)

RT: 5.99 - 20.02

NL:
4.99E7
TICF:
MS
PA082608_
03

b)

Figura 8 - Comparação dos picos de concentração dos padrões de alcalóides pirrolizidínicos (a) com aqueles presentes no extrato obtido das folhas secas de *S. brasiliensis* (b)

5.2 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA DO RB DE *S.brasiliensis* A RATAS ADULTAS

5.2.1 Delineamento experimental

Foram empregadas 10 ratas adultas separadas em dois grupos iguais, um controle e um experimental. Os animais do grupo experimental receberam, por gavagem, a dose 20 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*, durante 28 dias. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período, conforme descrito no item 4.4.4. Realizou-se a avaliação do consumo de ração e do ganho de peso (item 4.4.5) e durante todo o período experimental, os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos.

No final do período experimental, os animais foram submetidos à anestesia e coletou-se o sangue dos mesmos para análise bioquímica, conforme descrito no item 4.4.7. Após a coleta de sangue, estas fêmeas foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical e procedeu-se a avaliação macroscópica das mesmas e logo em seguida, coletaram-se fragmentos de diferentes órgãos para avaliação histopatológica, conforme detalhado no item 4.4.12.

5.2.2 Resultados

Quando foi empregado o teste estatístico, este revelou diferenças significantes no consumo de ração dos animais, conforme mostra a tabela 1. Assim, verificou-se diminuição estatisticamente significativa no consumo de ração das ratas tratadas com o resíduo da planta entre os períodos de 10 a 13, 13 a 16 19 a 22, 22 a 25 e finalmente entre os dias 25 a 28 do experimento, quando comparado ao consumo de ração das ratas do grupo controle ($p < 0,05$). Também, considerando-se o período total, houve diminuição significativa neste parâmetro, naquelas ratas

tratadas com *S. brasiliensis*, quando comparado com os dados das ratas do grupo controle (Tabela 2 e figura 9).

Já a tabela 3 mostra os dados oriundos do ganho de peso destes animais. Assim, o teste *t-Student* revelou haver diminuição no ganho de peso de ratas tratadas com a planta nos períodos de 4 a 7; 7 a 10 e do 10º ao 13º dia de experimentação, quando comparado com o ganho de peso das ratas do grupo controle nos mesmos períodos. Por outro lado, quando se avaliou o ganho de peso durante todo o período, verificou-se não haver alteração significativa (Tabela 4).

Quanto à avaliação clínica diária, não foram observados sinais dignos de nota no grupo controle. Em contrapartida, as ratas que receberam 20 mg/kg do RB começaram apresentar, aproximadamente uma semana antes do final do experimento (ou seja, ao redor do 21º dia de administração da planta), apatia, pelos eriçados, pele e mucosas branco-amareladas e aumento gradativo de volume flutuante do abdômen. A urina destes animais apresentava-se acentuadamente amarelada. Os pêlos se desprendiam com facilidade.

À necropsia das ratas que receberam o RB, de um modo geral, observaram-se condição corporal ruim, pele, mucosas, tecido subcutâneo e órgãos moderadamente amarelados (icterícia) (Figura 10b – estrela). A cavidade abdominal e torácica apresentaram aproximadamente 7 mL e 3mL, respectivamente, de um líquido translúcido, transparente e moderadamente amarelado, conforme apontam as setas nas figuras 10a e 10b, respectivamente. O fígado estava moderadamente aumentado de volume, bordos arredondados, levemente acastanhado e com acentuação do padrão lobular na superfície capsular e de corte. Observou-se diminuição da viscosidade do sangue. O coração estava globoso, com paredes finas e flácidas. Observaram-se os rins com coloração verde acastanhada (embebição por bilirrubina). Naquelas ratas que apresentavam a vesícula urinária repleta, observou-se conteúdo moderadamente amarelado. Não foram identificadas alterações macroscópicas dignas de nota nos animais do grupo controle.

A análise histológica do fígado de ratas tratadas com 20 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*, durante 28 dias por gavagem, mostrou necrose aleatória multifocal associada com áreas de hemorragias (Figura 11), megalocitose, estase biliar e moderada proliferação de tecido conjuntivo. Os demais tecidos, dos ratos

pertencentes ao mesmo grupo, apresentavam-se com congestão difusa acentuada. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações dignas de nota.

A tabela 5 mostra os resultados referentes à análise bioquímica das ratas tratadas ou não com 20 mg/kg de RB. Com exceção dos resultados referentes aos níveis GGT e dos níveis plasmáticos de glicose, o teste t-*Student* revelou que todos os outros parâmetros avaliados de ratas tratadas com 20 mg/kg do RB de *S. brasiliensis* foram estatisticamente diferentes dos mesmos parâmetros de ratas do grupo controle. Em relação às enzimas de função hepática, o teste estatístico revelou que houve aumento nos níveis de AST e ALT ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). O mesmo teste mostrou diminuição significativa ($p < 0,01$) de uréia e aumento ($p < 0,05$) da creatinina; diminuição dos níveis séricos de proteína total ($p < 0,001$) e de albumina ($p < 0,001$) e aumento dos níveis de colesterol ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Consumo de ração (em gramas), a cada três dias, de ratas tratadas ou não (controle) com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração (em gramas)		
Período (dias)	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)	
	0 (n=5) ^a	20 (n=5)
1-4	56,8 ± 7,1	41,4 ± 3,0
4-7	52,3 ± 4,0	40,0 ± 4,1
7-10	57,8 ± 7,0	37,8 ± 5,4
10-13	52,5 ± 5,2	30,8 ± 6,0*
13-16	48,0 ± 1,8	34,2 ± 2,8**
16-19	50,5 ± 5,6	35,8 ± 3,7
19-22	53,0 ± 6,0	32,2 ± 3,5*
22-25	53,5 ± 5,2	37,6 ± 1,7*
25-28	55,8 ± 3,4	31,6 ± 2,2***

^a número de animais empregados por grupo

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 versus grupo controle; teste t-Student.

Tabela 2 - Consumo de ração total (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)	
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)	
0 (n=5) ^a	20 (n=5)
480,0 ± 44,4	321,4 ± 27,4*

^a número de animais empregados por grupo

* p<0,05 versus grupo controle; teste t-Student

Figura 9 - Consumo de ração total (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média ± SEM. * p<0,05 versus grupo controle; teste t-Student

Tabela 3 - Ganho de peso (em gramas), a cada três dias, de ratas tratadas ou não (controle) com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso (em gramas)		
Período (dias)	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)	
	0 (n=5) ^a	20 (n=5)
1-4	3,2 ± 9,3	3,2 ± 8,8
4-7	-1,5 ± 1,5	-7,2 ± 1,8*
7-10	1,5 ± 1,0	-8,4 ± 2,3**
10-13	0,3 ± 1,0	-9,2 ± 3,9*
13-16	0,5 ± 1,8	-3,0 ± 1,1
16-19	3,5 ± 3,1	1,0 ± 1,5
19-22	-1,0 ± 3,4	-3,8 ± 3,1
22-25	-3,5 ± 6,1	-15,2 ± 11,3
25-28	5,2 ± 4,8	11,8 ± 2,4

^a número de animais empregados por grupo

* p<0,05; ** p<0,01 versus grupo controle; teste t-Student.

Tabela 4 - Ganho de peso total (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)	
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)	
0 (n=5) ^a	20 (n=5)
8,3 ± 5,3	-14,2 ± 9,5

^a número de animais empregados por grupo.

Figura 10 - Cavidade abdominal e torácica de ratas tratadas com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis* durante 28 dias. Observar-se a presença de grande quantidade de líquido translúcido, transparente e moderadamente amarelado, na cavidade abdominal e também na cavidade torácica, conforme apontam as setas. Ainda, visualizam-se pele, mucosas, tecido subcutâneo, órgãos e parede muscular das cavidades moderadamente amareladas (icterícia) - 10b – estrela

Figura 11 - Corte histológico de amostras teciduais de ratas tratadas com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis* durante 28 dias, por gavagem. Notar a presença de necrose e hemorragia hepáticas (a) e também megalocitose (seta) e moderada fibroplasia (asterisco) (b)

Tabela 5 - Bioquímica sérica de ratas tratadas ou não (controle) com 20 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Bioquímica sérica		
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)	
	0 (n=5) ^a	20 (n=5)
AST ^b (U/L)	96,5 ± 8,8	357,7 ± 40,6***
ALT ^c (U/L)	31,1 ± 5,4	181,0 ± 40,6**
GGT ^d (U/L)	1,8 ± 0,4	3,6 ± 1,1
Uréia (mg/dL)	46,8 ± 1,4	32,6 ± 3,6**
Creatinina (mg/dL)	0,34 ± 0,02	0,62 ± 0,06*
Albumina (g/dL)	5,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1***
Proteína total (g/dL)	7,0 ± 0,1	4,4 ± 0,2***
Glicose (mg/dL)	105,0 ± 3,6	79,7 ± 15,2
Colesterol (mg/dL)	15,4 ± 1,0	29,5 ± 1,4***

^a número de animais empregadas por grupo.

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 *versus* grupo controle; teste t-Student

^b Aspartato aminotransferase; ^c Alanina aminotransferase; ^d Gama glutamiltransferase

5.3 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES, DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DA BIOQUÍMICA SÉRICA E DA ATIVIDADE DOS NEUTRÓFILOS DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.3.1 Delineamento experimental

Vinte e oito ratos machos adultos foram separados, em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam, uma vez ao dia, as doses de 3, 6 e 9 mg/kg de RB, por gavagem, durante 28 dias, enquanto que aqueles pertencentes ao grupo controle receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período. Conforme foi descrito no item 4.4.5, foi realizada a avaliação do consumo de ração e do ganho de peso. No 29º dia de experimentação, todos os ratos foram anestesiados para a coleta de sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos, conforme descrito no item 4.4.6, da bioquímica sérica (item 4.4.7) e da atividade de neutrófilos (item 4.4.17).

Após a eutanásia por deslocamento cervical, foram coletados os órgãos linfóides (timo, medula óssea e baço), para a realização da avaliação do peso relativo do timo e baço, da celularidade do baço e da medula óssea, como detalhado nos itens 4.4.9 e 4.4.10. Também foram coletados diferentes órgãos para análise histológica, conforme descrito no item 4.4.12.

5.3.1 Resultados

Durante o delineamento experimental, nenhum animal dos diferentes grupos mostrou sinais clínicos como fezes amolecidas, depressão, distúrbios neurológicos ou mortalidade.

A tabela 6 mostra o consumo de ração a cada três dias, de ratos adultos tratados ou não com 3, 6 e 9 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*, por 28 dias. A análise

de variância ANOVA revelou haver diferenças nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos entre os seguintes períodos: 10 a 13 e 25 a 28 dias ($F=3,05$ e $F=4,44$, respectivamente; $df= 3,24$; $p<0,05$). O teste *post hoc* empregado revelou que ratos tratados com a dose de 6 mg/kg tiveram diminuição estatisticamente significativa no consumo de ração entre os dias experimentais 10 e 13 ($p<0,05$) quando comparados com aqueles ratos do grupo controle. Porém, do 25º ao 28º dia de experimentação, o teste de Dunnett revelou que foram os animais do grupo tratado com a maior dose aqueles que apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) neste parâmetro, quando comparados com os animais não tratados.

Em relação ao consumo de ração total, a análise estatística empregada revelou haver diferenças entre os valores obtidos dos animais dos diferentes grupos ($F=2,32$; $df= 3,24$; $p<0,05$). O teste de Dunnett mostrou que houve diminuição estatisticamente significativa no consumo de ração total apenas naqueles ratos tratados com a dose de 6 mg/kg do RB quando comparado com os ratos do grupo controle (Tabela 7 e Figura 12).

Quando foi avaliado o ganho de peso nos diferentes períodos de mensuração, o teste de variância também revelou haver diferenças nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos nos períodos entre 4 e 7, 7 e 10, 10 e 13, 16 e 19, 19 e 22 e por fim entre 22 e 25 dias ($F= 3,05$, $F=15,50$, $F=5,50$, $F=4,76$, $F=8,72$, $F=10,90$ respectivamente; $df= 3,24$; $p<0,05$) de experimento. O teste de Dunnett mostrou que houve diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) no ganho de peso dos animais do grupo tratado com 9 mg/kg de RB no período entre o 4º e 7º dia experimental; de todos os animais tratados com a planta entre os dias 7 e 10 e 10 e 13 ($p<0,01$) de experimentação; diminuição no ganho de peso apenas dos grupos tratados com 6 e 9 mg/kg do RB nos dias compreendido entre o 16º e o 19º ($p<0,01$, ($p<0,05$, respectivamente) de experimentação; diminuição no ganho de peso de todos os grupos experimentais entre os dias 19 e 22 ($p<0,01$) e finalmente, diminuição no ganho de peso de ratos tratados com a maior dose da planta entre os dias 25 e 28 ($p<0,01$); todos quando comparados com os respectivos períodos dos animais do grupo controle (Tabela 8).

A tabela 9 mostra e a figura 13 ilustra os dados provenientes do ganho de peso total de ratos tratados com as diferentes doses do RB de *S. brasiliensis*. A

análise estatística ANOVA empregada revelou haver diferenças entre os valores obtidos dos animais pertencentes aos diferentes grupos ($F=18,10$; $df=3,24$). O teste *post hoc* evidenciou que todos os animais experimentais tiveram diminuição estatisticamente significativa no ganho de peso, de forma dose-dependente ($p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,001$), quando estes foram comparados com aqueles do grupo controle.

A tabela 10 mostra e a figura 14 ilustra os resultados referentes à análise bioquímica da função hepática realizada nos animais tratados ou não com a planta. A ANOVA revelou haver diferenças estatísticas entre os dados provenientes da análise dos parâmetros bioquímicos séricos de AST ($F=8,12$; $df=3,24$; $p<0,05$) e ALT ($F=7,00$; $df=3,24$; $p<0,05$). O teste de Dunnett revelou que, em relação aos níveis séricos de AST, apenas ratos tratados com as doses de 6 e 9 mg/kg do RB de *S. brasiliensis* tiveram aumento estatisticamente significativo ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente) nos valores desta enzima quando comparados com os valores enzimáticos de ratos não tratados com a planta. Também, o foi observado aumento significativo ($p<0,01$) nos níveis séricos de ALT desses animais. Por outro lado, os valores de FA, GGT, proteína total e albumina não apresentaram diferenças.

Quando da avaliação dos níveis séricos de uréia, creatinina, colesterol e glicose, o teste estatístico empregado mostrou não haver diferenças entre os animais dos diferentes grupos (dados não mostrados).

Quando foram avaliados os dados referentes aos órgãos linfóides, a análise estatística mostrou não haver diferença significativa no peso relativo do timo dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, como pode ser observado na tabela 11.

Por outro lado, este mesmo teste de variância revelou diferenças significantes entre os valores do peso relativo do baço ($F=2,97$; $df=3,24$; $p<0,05$). O teste *post hoc* revelou que houve aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) no peso relativo de baço daqueles animais tratados com a maior dose do RB, quando comparado com o peso deste órgão em animais do grupo controle (Tabela 12 e Figura 15). No entanto, quando foi realizada a contagem das células brancas deste órgão, estas não se mostraram estatisticamente aumentadas em seu número, como pode ser observado na tabela 13.

A tabela 14 mostra os valores obtidos quando da avaliação da celularidade de medula óssea de ratos tratados ou não com 3, 6 e 9 mg/kg do RB de

S. brasiliensis, durante 28 dias por gavagem. A análise estatística de ANOVA não revelou diferenças significantes entre os animais dos diferentes grupos.

A tabela 15 mostra e a figura 16 ilustra os valores obtidos da contagem das células sanguíneas de ratos controles e daqueles tratados com o RB de *S. brasiliensis*. A análise estatística mostrou haver diferenças na contagem de RBC ($F= 7,07$; $df= 3,24$; $p<0,05$) e WBC ($F= 5,99$; $df= 3,24$; $p<0,05$) entre os animais dos diferentes grupos. O teste de Dunnett mostrou que houve aumento estatisticamente significativo nestes parâmetros ($p<0,001$, $p<0,01$ respectivamente) em ratos expostos à maior dose do resíduo vegetal, quando comparado aqueles dos animais do grupo controle. Da mesma forma, a análise de ANOVA revelou haver diferenças na contagem diferencial dos neutrófilos ($F= 10,40$; $df=3,24$) e linfócitos ($F= 2,58$; $df= 3,24$) entre os ratos dos diferentes grupos. O pós teste empregado revelou aumento significativo na contagem diferencial de neutrófilos ($p<0,001$) e linfócitos ($p<0,05$) naqueles animais que receberam a maior dose, em relação ao controle.

Em relação ao *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos, o teste estatístico empregado não mostrou qualquer diferença significativa entre os valores provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos, como mostra a tabela 16.

Histologicamente, não foram observadas alterações morfológicas na arquitetura de órgãos linfóides em animais de todos os grupos estudados; contudo, ratos tratados com 9 mg/kg de RB mostraram congestão de grau leve a moderado do baço (Figura 17), leve megalocitose no fígado (Figura 18) e congestão moderada de fígado e rins. Não foram observadas alterações morfológicas em outros órgãos.

Tabela 6 - Consumo de ração (em gramas), a cada três dias, de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração (em gramas)				
Período (dias)	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
1-4	57,4 ± 5,1	52,6 ± 1,0	47,0 ± 1,9	57,1 ± 7,8
4-7	65,3 ± 3,0	62,3 ± 1,8	58,3 ± 3,3	64,9 ± 4,1
7-10	60,6 ± 2,7	62,6 ± 2,4	54,7 ± 2,7	63,6 ± 4,7
10-13	64,9 ± 1,8	57,9 ± 1,8	53,6 ± 2,2 *	61,4 ± 4,4
13-16	65,1 ± 1,9	63,1 ± 2,5	57,0 ± 2,2	67,0 ± 3,9
16-19	65,1 ± 2,3	60,7 ± 2,5	56,1 ± 1,5	64,9 ± 4,5
19-22	54,7 ± 4,9	45,1 ± 2,0	42,3 ± 3,2	54,6 ± 8,0
22-25	68,9 ± 7,6	81,9 ± 1,6	80,0 ± 2,5	83,4 ± 5,0
25-28	62,0 ± 2,0	64,1 ± 1,7	59,4 ± 3,6	74,4 ± 4,4 *

^a número de animais empregados por grupo.

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

Tabela 7 - Consumo de ração total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)				
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)				
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)	
581,3 ± 16,8	550,3 ± 13,6	508,4 ± 19,2*	547,6 ± 27,1	

^a número de animais empregados por grupo

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

Figura 12 - Consumo de ração total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 8 - Ganho de peso (gramas), a cada três dias, de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso (em gramas)				
Período (dias)	RB de <i>S. brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
1-4	13,7 $\pm$ 1,3	13,7 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 1,4	12,3 $\pm$ 1,4
4-7	20,0 $\pm$ 1,4	19,3 $\pm$ 0,8	16,1 $\pm$ 2,1	14,3 $\pm$ 1,4*
7-10	15,1 $\pm$ 1,3	5,3 $\pm$ 1,7**	1,3 $\pm$ 0,9**	1,6 $\pm$ 2,4**
10-13	13,1 $\pm$ 1,9	3,6 $\pm$ 2,3**	5,0 $\pm$ 1,5*	4,3 $\pm$ 1,7**
13-16	10,7 $\pm$ 1,1	8,7 $\pm$ 2,4	6,9 $\pm$ 2,0	7,4 $\pm$ 1,3
16-19	11,3 $\pm$ 1,5	6,7 $\pm$ 0,9	4,9 $\pm$ 1,0**	5,3 $\pm$ 1,8*
19-22	6,7 $\pm$ 0,7	-0,9 $\pm$ 1,2**	0,6 $\pm$ 1,3*	-2,7 $\pm$ 2,0**
22-25	13,7 $\pm$ 1,8	14,7 $\pm$ 0,7	11,7 $\pm$ 1,6	13,9 $\pm$ 1,2
25-28	4,0 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 2,1	-8,1 $\pm$ 2,4**

^a número de animais empregados por grupo

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

Tabela 9 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
108,4 ± 4,6	76,9 ± 5,5**	60,6 ± 5,1***	48,1 ± 8,2***

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 13 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média ± SEM. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 10 - Bioquímica sérica de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Bioquímica sérica				
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
AST ^b (U/L)	110,4 ± 8,8	138,5 ± 5,9	173,9 ± 13,3***	157,4 ± 8,5**
ALT ^c (U/L)	43,2 ± 1,6	51,8 ± 2,1	85,0 ± 9,9**	86,1 ± 13,4**
FA ^d (U/L)	61,7 ± 2,7	50,6 ± 4,1	52,1 ± 1,8	53,3 ± 6,6
GGT ^e (U/L)	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2
Albumina (g/dL)	4,4 ± 0,9	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,8 ± 0,1
Proteína total (g/dL)	7,3 ± 0,1	7,7 ± 0,2	8,0 ± 0,3	7,6 ± 0,2

^a número de animais empregados por grupo.

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

^b Alanina aminotransferase; ^c Aspartato aminotransferase; ^d Fosfatase alcalina; ^eGama glutamiltransferase

Figura 14 - Bioquímica sérica de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle; teste de Dunnett. ALT= Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase; FA= Fosfatase alcalina; GGT= Gama glutamiltransferase

Tabela 11 - Peso relativo do timo (g/100g de peso vivo) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Peso relativo do timo (g/100g de peso vivo)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
0,126 ± 0,010	0,114 ± 0,010	0,117 ± 0,013	0,120 ± 0,012

^a número de animais empregados por grupo

Tabela 12 - Peso relativo do baço (g/100g de peso vivo) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Peso relativo do baço (g/100g de peso vivo)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
0,253 ± 0,009	0,267 ± 0,009	0,282 ± 0,013	0,292 ± 0,009*

^a número de animais empregados por grupo

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

Figura 15 - Peso relativo do baço (g/100g de peso vivo) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 13 - Celularidade do baço (esplenócitos $\times 10^6$ /g de baço) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Celularidade do baço (esplenócitos $\times 10^6$ /g de baço)			
RB de <i>S. brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
70,4 $\pm$ 5,3	67,5 $\pm$ 4,0	58,1 $\pm$ 6,9	54,4 $\pm$ 7,1

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 14 - Celularidade de medula óssea (células x 10⁶) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Celularidade de medula óssea (células x 10 ⁶)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
15,6 ± 1,7	14,7 ± 1,4	12,8 ± 0,9	12,3 ± 0,4

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 15 - Parâmetros hematológicos de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Parâmetros hematológicos				
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
RBC ^b (10 ⁶ /mm ³)	7,3 ± 0,2	7,7 ± 0,2	7,5 ± 0,1	8,2 ± 0,1***
WBC ^c (x10 ³ /mm ³)	8,2 ± 0,4	10,2 ± 0,9	9,6 ± 1,3	13,3 ± 0,6**
Monócitos	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Linfócitos	6,4 ± 0,4	8,0 ± 0,8	7,6 ± 1,1	9,5 ± 0,6*
Neutrófilos	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,4	3,3 ± 0,3***

^a número de animais empregados por grupo.

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

^b Red Blood Cell; ^c White Blood Cell

Figura 16 - Parâmetros hematológicos de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle; teste de Dunnett. RBC= Red Blood Cell; WBC= White Blood Cell

Tabela 16 - *Burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

<i>Burst</i> oxidativo e fagocitose					
		RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
		0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=7)	9 (n=7)
Fagocitose	%	81,2 ± 2,8	81,8 ± 2,8	75,3 ± 1,8	78,9 ± 3,7
	MFI ^b	32,5 ± 2,7	31,8 ± 2,7	27,3 ± 2,3	31,3 ± 4,3
Burst oxidativo (MFI)		123,8 ± 22,1	184,5 ± 38,4	220,4 ± 31,1	100,5 ± 6,2
Burst oxidativo induzido pela fagocitose (MFI)		177,2 ± 45,5	169,5 ± 40,9	138,3 ± 23,4	114,1 ± 24,1
Burst oxidativo induzido pelo PMA (MFI)		290,5 ± 35,7	270,1 ± 27,8	220,8 ± 45,8	187,9 ± 25,9

^a número de animais empregados por grupo.

^b MFI= media da intensidade de fluorescência

Figura 17 - Seção do baço de rato do grupo controle (a) e do grupo tratado com 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *Senecio brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Observar a congestão do baço de rato tratado com o resíduo da planta. H.E., 10X

Figura 18 - Seção do fígado de rato do grupo controle (a) e do grupo tratado com 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *Senecio brasiliensis*, por gavagem durante 28 dias. Observar a congestão hepática de rato tratado com o resíduo da planta e a presença de megalocitose (seta). H.E., 40X

5.4 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL, POR MEIO DA ANÁLISE DO TÍTULO ANTI-SRBC E DA PRODUÇÃO DOS PFCs POR PLASMÓCITOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-SRBC NO BAÇO, DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.4.1 Delineamento experimental

Foram empregados 40 ratos separados em quatro grupos iguais, 1 controle e 3 experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam, por via oral, através de gavagem, as doses de 3, 6 e 9 mg/kg de RB do *S. brasiliensis*, durante 28 dias. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período. Conforme foi descrito no item 4.4.5 foi realizada a avaliação do consumo de ração e do ganho de peso, a cada três dias. Sete dias após a sensibilização, conforme descrito no item 4.4.19.1, os animais foram submetidos à coleta de sangue, sem anticoagulante, para obtenção do soro e realização da titulação de anticorpos (item 4.4.19.2) e imediatamente após este procedimento, foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para a obtenção dos esplenócitos e o ajuste das células ($14,0 \times 10^6$ esplenócitos/mL) e então, foi realizado o ensaio do PFC, de acordo com o item 4.4.19.3.1.

5.4.2 Resultados

Os dados referentes ao consumo de ração total dos ratos adultos tratados ou não, por 28 dias com 3, 6 e 9 mg/kg do RB de *S. brasiliensis* e que tiveram seus títulos anti-SRBC e produção dos PFCs por plasmócitos de anticorpos anti-SRBC avaliados são apresentados na tabela 17. A análise estatística ANOVA empregada mostrou não haver diferenças significantes nos dados obtidos dos animais pertencentes aos diferentes grupos. Por outro lado, em relação ao ganho de peso

total, esta mesma análise estatística revelou haver diferenças entre os animais dos diferentes grupos ($F= 6,56$; $df= 3,36$; $p<0,05$). O teste *post hoc* empregado evidenciou diminuição significativa no ganho de peso total nos animais que receberam a maior dose de RB, conforme mostra a tabela 18 e ilustra a figura 19.

Quando foram avaliados os dados referentes aos títulos de anticorpos anti-SRBC, o teste de variância aplicado não evidenciou diferenças nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos (Tabela 19). Finalmente, a tabela 20 mostra a produção dos PFCs por plasmócitos produtores de anticorpos anti-SRBC. O teste estatístico utilizado, mais uma vez, não foi capaz de evidenciar diferenças estatísticas nesse parâmetro.

Tabela 17 - Consumo de ração total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
664,8 ± 11,0	646,4 ± 22,0	627,3 ± 19,2	619,1 ± 17,5

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 18 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
47,8 ± 7,3	30,3 ± 7,9	6,6 ± 8,0**	5,8 ± 8,4**

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 19 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 19 - Título de anticorpos anti-SRBC de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Título de anticorpos anti-SRBC ^a			
(Log ₂)			
RB de <i>S. brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^b	3 mg/kg (n=10)	6 mg/kg (n=10)	9 mg/kg (n=10)
10,3 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,6	9,8 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,6

^a Sheep Red Blood Cell

^b número de animais empregados por grupo.

Tabela 20 - PFC/10⁶ esplenócitos de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

PFC ^a /10 ⁶ esplenócitos			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0	3	6	9
(n=10) ^b	(n=10)	(n=10)	(n=10)
76,4 ± 10,5	80,9 ± 17,1	99,5 ± 18,9	84,4 ± 12,7

^a *Plaque-Forming Cell*

^b número de animais empregados por grupo

5.5 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (*DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY*- DTH) DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.5.1 Delineamento experimental

Foram empregados 40 ratos separados em quatro grupos iguais, 1 controle e 3 experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam, por gavagem, as doses de 3, 6 e 9 mg/kg de RB do *S. brasiliensis*, durante 28 dias (item 4.4.4). Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo, (água destilada) pela mesma via e período. Após o período experimental os animais foram sensibilizados com KLH e sete dias após foram desafiados (item 4.4.18). A avaliação da resposta imune celular foi expressa a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar direito 24 horas depois do desafio (KLH) com aquele valor da mensuração 24 antes.

5.5.2 Resultados

A tabela 21 mostra os dados relativos à reação do DTH de ratos adultos tratados ou não com RB do *S. brasiliensis*, por 28 dias. As análises estatísticas empregadas revelaram não haver diferenças significantes nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos.

Tabela 21 - Reação de hipersensibilidade tardia (*Delayed type hypersensitivity* – DTH) de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Reação de hipersensibilidade tardia - DTH			
(mm)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0	3	6	9
(n=10) ^a	(n=10)	(n=10)	(n=10)
4,7 ± 0,7	5,5 ± 0,6	5,5 ± 0,3	5,4 ± 0,5

^a número de animais empregados por grupo

5.6 EXPERIMENTO 5: FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS B E T DO BAÇO DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.6.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam, por gavagem, as doses de 3, 6 e 9 mg/kg de RB do *S. brasiliensis*, durante 28 dias, enquanto que aqueles ratos provenientes do grupo controle receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período. Conforme foi descrito no item 4.4.5 foi realizada a avaliação do ganho de peso. No final do período experimental procedeu-se à fenotipagem linfocítica, conforme descrito nos itens 4.4.16.1 e 4.4.16.3.

5.6.2 Resultados

Quando da avaliação do ganho de peso, pôde-se observar ratos tratados com as maiores doses de RB do *S. brasiliensis* apresentaram diminuição significativa ($F=6,56$; $df\ 3,36$; $p<0,001$, ANOVA seguida do teste de Dunnett), conforme mostra a tabela 22 e ilustra a figura 20.

Na avaliação da fenotipagem de linfócitos esplênicos observou-se que o tratamento com as diferentes doses do RB de *S. brasiliensis* não alterou a porcentagem dos linfócitos avaliados, a saber: T helper, T citotóxico e linfócitos B *naïve* e nem alterou a proporção de linfócitos T helper e T citotóxicos, conforme demonstrado nas tabelas 23 e 24, respectivamente.

Tabela 22 - Ganho de peso (gramas) total, de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
98,2± 7,5	82,1 ± 8,9	47,50 ± 3,9***	39,6 ± 3,4***

^a número de animais empregados por grupo

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

Figura 20 - Ganho de peso (gramas) total, de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média ± SEM. *** p<0,001 versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 23 - Porcentagem de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), T *helper* (CD3⁺CD4⁺) e B *naïve* (CD45⁺IgM⁺) esplênicos de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Fenotipagem de linfócitos				
(%)				
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
T citotóxicos (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	6,7 ± 0,4	7,6 ± 0,4	6,9 ± 0,6	6,3 ± 0,2
T <i>helper</i> (CD3 ⁺ CD4)	10,1 ± 0,9	11,4 ± 0,8	11,4 ± 0,9	10,5 ± 0,4
B <i>naïve</i> (CD45 ⁺ IgM ⁺)	45, 0 ± 2,7	45,3 ± 1,5	46,7 ± 1,4	49,1 ± 2,3

^a número de animais empregados por grupo

Tabela 24 - Proporção de linfócitos T helper/Tcitotóxico (CD4⁺/CD8⁺) esplênicos de ratos machos adultos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Proporção de Linfócitos T helper/Tcitotóxico (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)				
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)				
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)	
1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,1	

^a número de animais empregados por grupo

5.7 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS B E T ESPLÊNICOS DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.7.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas amostras dos mesmos 40 ratos empregados no experimento anterior (item 5.6). Assim, após a eutanásia dos animais, por deslocamento cervical, foram coletadas amostras de baço e, prepararam-se suspensões celulares deste órgão, para a realização da avaliação da linfoproliferação, através do método colorimétrico do MTT, conforme descrito nos itens 4.4.16.1 e 4.4.16.2.

5.7.2 Resultados

A tabela 25 mostra e a figura 21 ilustra os resultados referentes à análise da proliferação de linfócitos T esplênicos, estimulados pelo mitógeno ConA, dos animais tratados ou não com as diferentes doses do RB de *S. brasiliensis*. A análise estatística ANOVA mostrou haver diferenças nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos ($F=3,01$; $df= 3,36$; $p<0,05$). O subsequente emprego do teste *post hoc* evidenciou diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) no índice de proliferação de linfócitos T naqueles animais do grupo que recebeu a maior dose, quando comparado com animais do grupo controle. Por outro lado, como verificado na tabela 26, a ANOVA mostrou não haver diferença significativa no índice de proliferação de linfócitos B estimulados por LPS.

Tabela 25 - Índice de proliferação de linfócitos T estimulados pelo mitógeno ConA (Concanavalina A), em ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Índice de proliferação			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=8)	9 (n=10)
1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1*

^a número de animais empregados por grupo

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

Figura 21 - Índice de proliferação de linfócitos T estimulados pelo mitógeno ConA (Concanavalina A), em ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média ± SEM. * p<0,05 versus grupo controle; teste de Dunnett.

Tabela 26 - Índice de proliferação de linfócitos B estimulados pelo mitógeno LPS (lipopolissacarídeo) em ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Índice de proliferação			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=8)	9 (n=10)
1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,1

^a número de animais empregados por grupo

5.8 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO RB DE *S. brasiliensis* SOBRE O CICLO CELULAR DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS

5.8.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas suspensões de células esplênicas de oito ratos não tratados com o RB de *S.brasiliensis*. As suspensões celulares foram preparadas, conforme descrito no item 4.4.16.1. As células foram ajustadas para 2×10^5 células/poço. A seguir, depositaram-se as diferentes concentrações do extrato a saber: 0, 0,12 e 1,2 mg/mL conforme proposto por Santos-Mello et al. (2002) e procedeu-se a metodologia descrita no item 4.4.17.

5.8.2 Resultados

Quando se analisou o efeito do RB de *S. brasiliensis* sobre o ciclo celular de linfócitos esplênicos, o teste estatístico Kruskal-Wallis utilizado mostrou que o RB induziu parada do ciclo celular em G1 e diminuição da proliferação dos linfócitos. O pós teste de Dunn empregado revelou que a maior dose de RB da planta utilizada (1,2 mg/mL) foi capaz de causar aumento na porcentagem de células na fase G0/G1 ($p < 0,05$), quando comparadas com as células que não foram tratadas com o RB. Consequentemente, foi observada uma redução significativa na porcentagem de células na fase S ($p < 0,05$) em relação às células que não foram tratadas com o RB, conforme mostra a tabela 27 e ilustra a figura 22.

Tabela 27 - Efeito *in vitro* do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis* sobre a porcentagem de linfócitos esplênicos nas diferentes fases do ciclo celular. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	Fases do ciclo celular (%)		
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/mL)		
	0 (n=8) ^a	0,12 (n=8)	1,2 (n= 8)
G0/G1	52,8 ± 2,3	56,0 ± 3,3	64,7 ± 2,7*
S	37,9 ± 2,4	34,1 ± 3,5	27,9 ± 1,9*
G2/M	9,3 ± 2,2	9,8 ± 1,8	7,4 ± 1,5

^a número de animais empregados por dose

* p<0,05 versus controle; pós-teste de Dunn

Figura 22 - Efeito *in vitro* do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis* sobre a porcentagem de linfócitos esplênicos nas diferentes fases do ciclo celular. Média ± SEM. * p<0,05 versus controle; pós-teste de Dunn

5.9 EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO, DA FAGOCITOSE E DA PRODUÇÃO DE NO, DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.9.1 Delineamento experimental

Foram empregados 40 ratos, os quais foram separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam, por gavagem, as doses de 3, 6 e 9 mg/kg de RB do *S. brasiliensis*, durante 28 dias. Aqueles ratos do grupo controle receberam apenas o veículo (água destilada), pela mesma via e período, conforme descrito no item 4.4.4. Realizou-se a avaliação do consumo de ração e do ganho de peso como descrito no item 4.4.5. Procedeu-se à coleta de macrófagos peritoneais conforme descrito no item 4.4.11.1. Após a contagem e ajuste das células, realizou-se a avaliação do *burst* oxidativo e fagocitose e da produção de NO destas células, empregando-se as metodologias detalhadamente descritas nos subitens 4.4.11.2 e 4.4.11.3, respectivamente.

5.9.2 Resultados

A tabela 28 mostra e a figura 23 ilustra o consumo de ração total de ratos machos adultos tratados ou não com as diferentes doses do RB de *S. brasiliensis*, por 28 dias. Assim, apesar de ter havido diminuição no consumo de ração por todos os animais experimentais no final do período de administração da planta ($F = 2,60$; $df = 3,36$; $p < 0,05$), a subsequente aplicação do teste *post hoc* mostrou que apenas ratos tratados com a dose intermediária do RB de *S. brasiliensis* apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração total, quando comparados com aquele de ratos do grupo controle.

Como mostra a tabela 29 e ilustra a figura 24, evidenciaram-se também diferenças significantes no ganho de peso total entre os animais pertencentes aos

diferentes grupos ($F= 15,36$; $df= 3,36$; $p<0,05$). O teste de Dunnett revelou que todos os animais tratados com as diferentes doses de RB da planta apresentaram redução estatisticamente significativa ($p<0,001$) no ganho de peso, de forma dose-dependente, quando comparados com os valores obtidos dos ratos do grupo controle.

Já, a tabela 30 mostra e a figura 25 ilustra os dados provenientes do *burst* oxidativo e da fagocitose de macrófagos peritoneais. A aplicação do teste estatístico ANOVA revelou haver diferenças significantes nos dados provenientes dos animais dos diferentes grupos ($F= 4,60$; $df=3,32$; $p<0,05$) em relação à intensidade da fagocitose. O teste de Dunnett revelou que macrófagos oriundos de animais tratados com a maior dose tiveram aumento significativo ($p<0,01$) na intensidade da fagocitose, quando comparados com esta atividade daquelas células obtidas dos animais do grupo controle. Da mesma forma, quando se avaliou o *burst* oxidativo induzido pelo PMA, o mesmo teste estatístico empregado mostrou haver diferenças significantes ($F= 5,03$; $df= 3,32$; $p<0,05$) entre os animais. O pós teste revelou aumento significativo ($p<0,05$) deste parâmetro, nos macrófagos de ratos que receberam 9 mg/kg de RB da planta, quando comparado com aqueles provenientes dos animais pertencentes ao grupo controle.

Em relação à produção de NO por estes macrófagos peritoneais, como apresentado na tabela 31, o teste estatístico aplicado revelou não haver qualquer diferença significativa entre os dados obtidos dos animais dos diferentes grupos.

Tabela 28 - Consumo de ração total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
696,2 ± 22,3	643,1 ± 14,4	634,8 ± 20,1*	642,1 ± 11,3

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 23 - Consumo de ração total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg de resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média ± SEM. * p<0,05 versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 29 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
62,8 ± 4,0	32,1 ± 6,8***	27,5 ± 4,1***	23,0 ± 2,4***

^a número de animais empregados por grupo

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

Figura 24 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média ± SEM. *** p<0,001 versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 30 - *Burst* oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

<i>Burst</i> oxidativo e fagocitose		RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
		0 (n=9) ^a	3 (n=9)	6 (n=9)	9 (n=9)
Fagocitose	%	22,2 ± 1,9	18,4 ± 3,0	20,6 ± 2,4	15,7 ± 1,7
	MFI ^b	36,5 ± 2,1	38,3 ± 1,6	41,9 ± 1,0	45,0 ± 2,0**
<i>Burst</i> oxidativo (MFI)		206,7 ± 26,0	200,4 ± 18,9	274,1 ± 35,3	291,8 ± 21,1
<i>Burst</i> oxidativo induzido pela fagocitose (MFI)		281,0 ± 29,3	239,8 ± 23,1	283,8 ± 29,5	278,4 ± 19,0
<i>Burst</i> oxidativo induzido pelo PMA (MFI)		186,6 ± 14,9	176,3 ± 19,0	219,6 ± 21,3	268,8 ± 18,5*

^a número de animais empregados por grupo

^b MFI= media da intensidade de fluorescência

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

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

Figura 25 - *Burst oxidativo* e fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 31 - Produção de NO (em nMols), por macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Produção de NO (nMols)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=7)	6 (n=6)	9 (n=9)
57,7 ± 3,6	50,2 ± 4,5	56,4 ± 4,4	66,4 ± 3,5

^a animais reagentes por grupo

5.10 EXPERIMENTO 9: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E DA DENSIDADE URINÁRIA DE RATOS MACHOS ADULTOS TRATADOS OU NÃO COM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*

5.10.1 Delineamento experimental

Trinta e dois ratos adultos foram separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam, uma vez ao dia, as doses de 3, 6 e 9 mg/kg de RB, por gavagem, durante 28 dias. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período. Realizou-se a avaliação do consumo de ração e do ganho de peso como descrito no item 4.4.5. No 29º dia, todos os ratos foram anestesiados para a coleta de sangue, sem anticoagulante, através da veia cava caudal para avaliação das citocinas séricas IFN- γ , TNF- α , IL-4, e IL-6, conforme descrito no item 4.4.21. Também, foi realizada a coleta de urina para análise da função renal através da densidade urinária (item 4.4.22).

5.10.2 Resultados

A tabela 32 mostra o consumo de ração total de ratos machos adultos tratados ou não com as diferentes doses de RB de *S. brasiliensis* por 28 dias. O teste de variância empregado revelou não haver diferenças nos dados provenientes dos animais dos diferentes grupos. Por outro lado, quando se avaliou o ganho de peso total destes animais, a ANOVA mostrou haver diferenças significantes ($F=7,56$; $df=3,28$; $p<0,05$) nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos. O teste de Dunnet mostrou diminuição estatisticamente significativa no ganho de peso total de ratos pertencentes aos grupos que receberam 3, 6 e 9 mg/kg de RB ($p<0,05$, $p<0,001$, $p<0,01$, respectivamente) em relação ao ganho de peso total dos animais do grupo controle, conforme mostra a tabela 33 e

ilustra a figura 26.

Já a tabela 34 mostra e a figura 27 ilustra os valores das diferentes citocinas séricas de ratos tratados ou não com o RB de *S. brasiliensis* durante 28 dias. O teste estatístico empregado mostrou haver diferenças significantes nos dados oriundos dos animais pertencentes aos diferentes grupos. A ANOVA, seguida do teste de Dunnet mostrou diminuição significativa no valor da IL-6 ($F= 3,93$; $df= 3,28$; $p<0,01$) naqueles animais pertencentes ao grupo que recebeu 3 mg/kg de RB quando comparado aos animais do grupo controle. Quando se analisou INF- γ , observou-se diminuição significativa (Kruskal-Wallis seguido de Dunn, $p<0,01$), desta citocina apenas naqueles animais que receberam a menor dose do RB em relação aos animais do grupo controle.

Por fim, a tabela 35 mostra o resultado da densidade urinária de ratos tratados ou não com o RB de *S. brasiliensis* durante 28 dias. A ANOVA empregada revelou não haver diferenças nos dados provenientes dos animais dos diferentes grupos.

Tabela 32 - Consumo de ração total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=8) ^a	3 (n=8)	6 (n=8)	9 (n=8)
622,0 ± 13,9	569,4 ± 11,4	603,1 ± 18,4	580,6 ± 20,2

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 33 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
64,5 ± 7,4	35,1 ± 5,0*	23,4 ± 8,6***	25,0 ± 6,2**

^a número de animais empregados por grupo

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

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

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

Figura 26 - Ganho de peso total (em gramas) de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 34 - Citocinas séricas, em densidade óptica, de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	Citocinas séricas (densidade óptica)			
	RB de <i>S. brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=8) ^a	3 (n=8)	6 (n=8)	9 (n=8)
IL-4 ^b	0,064 $\pm$ 0,002	0,063 $\pm$ 0,003	0,062 $\pm$ 0,001	0,064 $\pm$ 0,002
IL-6	0,088 $\pm$ 0,002	0,081 $\pm$ 0,001**	0,086 $\pm$ 0,002	0,084 $\pm$ 0,001
TNF- α ^c	0,550 $\pm$ 0,105	0,378 $\pm$ 0,073	0,760 $\pm$ 0,229	0,565 $\pm$ 0,169
IFN- γ ^d	0,153 $\pm$ 0,001	0,091 $\pm$ 0,003**	0,149 $\pm$ 0,015	0,169 $\pm$ 0,025

^a número de animais empregados por grupo.

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

^b IL= Interleucina; ^c TNF= Fator de necrose tumoral; ^d IFN= Interferon

Figura 27 - Citocinas séricas, em densidade óptica (D.O), de ratos tratados ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett. IL=Interleucina; TNF- α = Fator de necrose tumoral; IFN- γ = Interferon

Tabela 35 - Densidade urinária de ratos tratados ou não (controle), com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Densidade Urinária			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=8) ^a	3 (n=8)	6 (n=8)	9 (n=8)
1011 ± 1,7	1013 ± 2,7	1015 ± 2,3	1022 ± 4,9

^a número de animais empregados por grupo.

5.11 EXPERIMENTO 10: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO RB DE *S. brasiliensis* A RATAS GESTANTES: ESTUDO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS NA MÃE E NO FETO DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL

5.11.1 Delineamento experimental

Foram empregadas ratas adultas, as quais foram separadas em quatro grupos, um controle e três experimentais. Procedeu-se ao acasalamento das fêmeas conforme descrito no item 4.4.13. Os animais do grupo experimental receberam, por gavagem, as doses de 3 (n=7), 6 (n=7), 9 (n=8) e de RB do *S. brasiliensis*, do 6º ao 20º DG. As ratas do grupo controle (n=7) receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período, conforme descrito no item 4.4.4. Realizou-se a avaliação do consumo de ração e do ganho de peso como apresentado no item 4.4.5. Durante todo o período experimental os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. No 21º DG, as fêmeas foram submetidas à anestesia coletou-se sangue para análise dos parâmetros hematológicos e da bioquímica sérica, conforme descrito nos itens 4.4.6 e 4.4.7, respectivamente. Após a eutanásia por deslocamento cervical, foi realizada a cesariana e procedeu-se a avaliação como detalhado no item 4.4.14. As ratas foram avaliadas quanto a possíveis alterações macroscópicas. Os neonatos foram submetidos à análise óssea, conforme descrito no item 4.4.15.

5.11.2 Resultados

As fêmeas que tiveram menos de quatro fetos foram retiradas de todas as análises.

A tabela 36 mostra o consumo total de ração de fêmeas tratadas ou não com o RB de *S. brasiliensis* do 6 ao 20º DG. A análise de variância ANOVA não detectou qualquer diferença entre os animais pertencentes aos diferentes grupos.

A tabela 37 mostra e a figura 28 ilustra o ganho de peso total de fêmeas tratadas ou não com o RB de *S. brasiliensis* do 6 ao 20º DG. O teste estatístico empregado revelou haver diferenças nos dados oriundos dos animais pertencentes aos diferentes grupos ($F= 2,66$; $df= 3,22$; $p<0,05$). O subsequente emprego do teste de Dunnet mostrou diminuição significativa ($p<0,05$) no ganho de peso total de fêmeas que receberam a maior dose de RB da planta durante o período gestacional, quando comparado aos animais do grupo controle.

A tabela 38 mostra os dados provenientes da avaliação dos parâmetros hematológicos de fêmeas tratadas ou não com o RB de *S. brasiliensis* do 6 ao 20º DG. A análise de variância empregada foi capaz de detectar diferenças entre os animais dos diferentes grupos ($F= 2,52$; $df=3,22$; $p<0,05$). O teste de Dunnet mostrou que as fêmeas pertencentes ao grupo que recebeu a dose intermediária de RB tiveram aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) no WBC em relação às ratas do grupo controle. Da mesma forma, quando se analisou a contagem diferencial de leucócitos, a ANOVA revelou haver diferenças nos dados dos animais pertencentes aos diferentes grupos ($F= 4,46$; $df= 3,22$; $0,05$). O *post test* utilizado mostrou aumento significativo ($p<0,01$) no número de neutrófilos nas fêmeas que receberam 9 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*, quando comparado aos animais do grupo controle, conforme mostra a tabela 39 e ilustra a figura 29.

Os resultados referentes à análise bioquímica realizada nos animais tratados ou não com o RB de *S. brasiliensis* do 6º ao 20º DG são apresentados na Tabela 40 e figura 30. Assim, o teste estatístico empregado revelou haver diferenças significantes nos dados obtidos dos animais alocados nos diferentes grupos nos parâmetros de AST ($F= 4,10$; $df= 3,24$; $p<0,05$), uréia ($F= 5,53$; $df=3,24$; $p<0,05$), proteína total ($F= 7,11$; $df= 3,24$; $p<0,05$), albumina ($F=4,91$; $df= 3,24$; $p<0,05$) e glicose ($F= 4,51$; $df= 3,34$; $p<0,05$). O teste de Dunnett revelou que, em relação aos níveis séricos de AST, todas as ratas experimentais apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) nos valores desta enzima, quando comparados com os valores de AST de ratas não tratadas com a planta. Por outro lado, no que se refere aos níveis de uréia destes animais, o mesmo teste utilizado mostrou diminuição significativa daquelas fêmeas que receberam as doses de 3 e 6 mg/kg ($p<0,01$, $p<0,05$, respectivamente) do RB de *S. brasiliensis* do 6º ao 20º DG. Da mesma forma, observou-se diminuição significativa ($p<0,05$) nos valores de

proteína total nas ratas pertencentes aos grupos que receberam o RB de *S.brasiliensis* durante a gestação. Também, notou-se diminuição significativa ($p<0,05$) nos níveis de albumina naqueles animais provenientes dos grupos que receberam as maiores doses de RB da planta. Ainda, em relação à avaliação da glicose sanguínea, o pós teste empregado revelou haver diminuição estatisticamente significativa ($p<0,01$) no valor dos níveis desta substância somente naquelas ratas pertencentes ao grupo que recebeu 6 mg/kg de RB durante a gestação, quando comparado ao obtido das fêmeas não tratadas. Os valores de GGT e colesterol não apresentaram diferenças estatísticas (dados não mostrados).

A tabela 41 mostra os resultados obtidos do estudo de desempenho reprodutivo entre ratas pertencentes aos grupos tratados com RB em relação aos animais do grupo controle. A análise estatística revelou haver diferença significativa nos dados provenientes dos diferentes grupos em relação ao peso da placenta por ninhada ($F=2,91$; $df=3,22$; $p<0,05$). O teste de Dunnet mostrou que as fêmeas do grupo que recebeu 9 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*, apresentaram diminuição significativa do peso da placenta por ninhada ($p<0,05$), quando comparado com os valores obtidos de ratas do grupo controle. Não houve diferenças estatísticas na porcentagem de machos e fêmeas por ninhada (dados não mostrados).

Quanto à análise óssea dos fetos de mães que receberam o RB de *S. brasiliensis* do 6º ao 20º DG, o teste estatístico empregado mostrou haver diferenças na ossificação entre os animais pertencentes aos diferentes grupos. O pós teste de Dunn revelou diminuição na ossificação ($p<0,05$) nos fetos de mães receberam as maiores doses do RB de *S. brasiliensis*, quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 42).

Em relação às possíveis lesões macroscópicas resultantes da ingestão do RB pelas ratas durante a gestação, à necropsia das mesmas, não se observou alteração digna de nota nos diversos órgãos avaliados.

Tabela 36 - Consumo de ração total (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=6)
430,6 ± 1,7	451,8 ± 25,5	436,0 ± 119,2	451,3 ± 14,8

^a número de animais empregados por grupo

Tabela 37 - Ganho de peso total (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=7) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=6)
82,7 ± 8,0	78,3 ± 7,6	83,6 ± 8,4	62,2 ± 6,0*

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 28 - Ganho de peso total (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 38 - Parâmetros hematológicos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Parâmetros hematológicos				
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=6)
RBC ^b (x10 ⁶ /mm ³)	5,8 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,8 ± 0,2	6,1 ± 0,3
WBC ^c (x10 ³ /mm ³)	3,7 ± 0,3	5,1 ± 0,4	5,7 ± 0,8*	5,5 ± 0,8
Hematócrito (%)	32,3 ± 0,9	31,6 ± 0,6	32,7 ± 0,7	33,3 ± 0,9
Hemoglobina (g/dL)	11,8 ± 0,5	12,7 ± 0,8	12,4 ± 0,5	12,3 ± 0,5
HCM ^d (pg)	20,2 ± 0,3	21,2 ± 0,3	21,0 ± 0,4	20,4 ± 0,5
VCM ^e (mm ³)	55,0 ± 0,7	55,3 ± 0,8	55,6 ± 0,5	54,8 ± 0,7
CHCM ^f (g/dL)	36,6 ± 0,2	38,2 ± 0,6	37,8 ± 0,6	37,3 ± 0,5

^a número de animais empregados por grupo.

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

^b Red Blood Cell; ^c White Blood Cell; ^d Hemoglobina corpuscular média; ^e volume corpuscular médio; ^f Concentração de hemoglobina corpuscular média

Tabela 39 - Contagem diferencial de leucócitos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	Diferencial de leucócitos (x10 ³ /mm ³)			
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=6)
Monócitos	0,29 ± 0,04	0,26 ± 0,03	0,42 ± 0,09	0,46 ± 0,10
Linfócitos	2,25 ± 0,24	3,02 ± 0,41	3,48 ± 0,61	2,60 ± 0,45
Neutrófilos	1,05 ± 0,16	1,81 ± 0,25	1,78 ± ,022	2,37 ± 0,33 ^{**}
Eosinófilos	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,01

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 29 - Contagem diferencial de leucócitos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. Média $\pm$ SEM. * $p < 0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 40 - Bioquímica sérica de ratas tratadas ou não com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=6)
AST ^b (U/L)	98,6± 2,9	176,3 ± 27,1*	174,7 ± 18,1*	178,9 ± 20,4*
FA ^c (U/L)	46,1 ± 8,1	39,6 ± 7,2	55,1 ± 5,6	32,6 ± 2,3
Uréia (mg/dL)	39,1 ± 1,9	29,6 ± 1,2**	31,9 ± 1,6*	34,3 ± 2,1
Albumina (g/dL)	2,7 ± 0,08	2,4 ± 0,04	2,2 ± 0,07**	2,3 ± 0,11*
Proteína total (g/dL)	6,6 ± 0,3	5,9 ± 0,2*	5,4 ± 0,2**	5,4 ± 0,2**
Glicose (mg/dL)	116,7 ± 9,7	74,4 ± 8,4**	94,1 ± 5,6	103,3 ± 9,2

^a número de animais empregados por grupo

* p<0,05, ** p<0,01 versus grupo controle; teste de Dunnett; ^b Aspartato aminotransferase; ^cFosfatase alcalina

Figura 30 - Bioquímica sérica de ratas tratadas ou não com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. Média $\pm$ SEM* $p<0,05$, ** $p<0,01$ versus grupo controle; teste de Dunnett. AST= Aspartato aminotransferase; FA= Fosfatase alcalina

Tabela 41 - Desempenho reprodutivo de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Desempenho reprodutivo				
	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=7) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=6)
PM (g) ^b	303,3 ± 8,3	300,8 ± 16,1	318,3 ± 10,3	291,6 ± 3,9
PU (g) ^c	70,4 ± 4,6	77,32 ± 4,2	77,3 ± 5,5	68,5 ± 5,4
PM-U (g) ^d	232,9 ± 6,9	223,5 ± 12,0	241,0 ± 5,9	223,3 ± 4,7
PP (g) ^e	0,47 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,41 ± 0,01*
PF (g) ^f	5,1 ± 0,3	4,9 ± 0,1	4,7 ± 0,3	4,7 ± 0,04
CF (cm) ^g	4,6 ± 0,04	4,6 ± 0,02	4,5 ± 0,10	4,5 ± 0,03
NF ^h	10,4 ± 1,2	11,3 ± 0,6	12,0 ± 0,6	10,7 ± 0,8
Pré-I (%) ⁱ	8,3 ± 2,7	2,7 ± 1,7	7,3 ± 3,2	12,3 ± 4,3
Pós-I (%) ⁱ	11,9 ± 7,2	9,4 ± 1,3	6,7 ± 2,8	4,7 ± 3,0

^a número de animais empregados por grupo

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

^b Peso materno aos 21 DG; ^c peso útero; ^d peso materno-peso útero; ^e peso placentário ninhada; ^f peso fetal ninhada; ^g comprimento fetal ninhada; ^h número de fetos por ninhada; ⁱ perda pré-implantação por ninhada; ⁱ perda pós-implantação por ninhada

Tabela 42 - Análise óssea dos fetos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. Para os dados paramétricos são apresentadas as médias, erros-padrões e números de animais por grupos. Para os dados não-paramétricos são apresentados o número de eventos e o número de animais por grupo.

Exame fetal		RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
		0	3	6	9
Variações esqueléticas	Por feto	5 (25)	4 (30)	5 (28)	2 (26)
	Por ninhada	2 (7)	2 (7)	3 (7)	2 (7)
Costela ondulada	Por feto	0 (25) 0%	0 (30) 0%	0 (28) 0%	0 (26) 0%
13ª costela reduzida	Por feto	0 (25) 0%	1 (30) 3,3 %	1 (28) 3,6%	0 (26) 0%
Esternébrio rudimentar	Por feto	3 (25) 8,6 %	3 (30) 10 %	0 (28) 0%	0 (26) 0%
Ausência do 5º esternébrio	Por feto	2 (25) 5,7%	0 (30) 0%	3 (28) 10,7	0 (26) 0%
Esternébrio em borboleta	Por feto	0 (25) 0%	0 (30) 0%	1(28) 3,6%	2 (26) 7,7%
Ossificação	Por feto	64,6 ± 1,1	65,3 ± 0,5	61,9 ± 0,9*	62,5 ± 0,5*

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

5.12 EXPERIMENTO 11: CARACTERIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS SOBRE ÓRGÃOS LINFÓIDES, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICA SÉRICA DE RATOS ADULTOS, FILHOS DE MÃES QUE RECEBERAM 3, 6 E 9 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis* DURANTE A GESTAÇÃO

5.12.1 Delineamento experimental

Foram empregadas ratas adultas, as quais foram alocadas em quatro grupos, um controle e três experimentais. As fêmeas foram acasaladas, conforme descrito no item 4.4.13, sendo que aquelas pertencentes aos diferentes grupos experimentais, receberam, por via oral, através de gavagem, as doses de 3 (n=5), 6 (n=5), 9 (n=6) do RB de *S. brasiliensis*, do 6° ao 20° DG. As ratas do grupo controle (n=5) receberam apenas o veículo (água destilada) pela mesma via e período, conforme descrito no item 4.4.4. Durante todo o período experimental os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de possíveis sinais clínicos. Também foi avaliado o ganho de peso total materno e da prole durante a lactação. Três dias após os nascimentos procedeu-se à transferência de filhotes, quando necessário, entre as fêmeas pertencentes ao mesmo grupo, com o objetivo de padronizar as ninhadas, quando possível, com cinco machos e três fêmeas. Os filhotes machos destas fêmeas submetidas às diferentes doses de RB, imediatamente após o desmame, foram separados e colocados em gaiolas (5 animais cada) e monitorados até atingirem a idade adulta. Os filhotes machos adultos (60 dias de idade) foram anestesiados para coleta de sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos e da bioquímica sérica (item 4.4.6 e 4.4.7) e após a eutanásia por deslocamento cervical, foi realizada a avaliação dos pesos relativos de timo e baço; celularidade de baço e medula óssea, conforme detalhado nos itens 4.4.9 e 4.3.10, respectivamente. Os animais foram analisados para possíveis alterações macroscópicas.

5.12.2 Resultados

A tabela 43 mostra e a figura 31 ilustra o consumo total de ração de fêmeas tratadas ou não com o RB de *S. brasiliensis* do 6º ao 20º DG. A análise de variância ANOVA foi capaz de detectar diferença nos dados provenientes dos animais dos diferentes grupos ($F= 2,66$; $df= 3,22$; $p<0,05$). A subsequente aplicação do teste de Dunnet mostrou diminuição significativa ($p<0,05$) no consumo de ração total daquelas fêmeas pertencentes aos grupos que receberam as duas maiores doses do RB de *S. brasiliensis* durante o período gestacional, quando comparado ao consumo de ração dos animais do grupo controle.

Quando da avaliação do ganho de peso total de fêmeas tratadas ou não com o RB de *S. brasiliensis*, do 6º ao 20º DG, o teste estatístico empregado revelou não haver diferenças nos dados obtidos dos animais dos diferentes grupos (Tabela 44).

Em relação ao número de filhotes por ninhada, o teste de variância ANOVA não foi capaz de detectar diferenças estatisticamente significantes nos dados oriundos dos animais dos diferentes grupos, conforme mostra a tabela 45. Da mesma maneira, o mesmo teste estatístico empregado também revelou não haver diferenças no peso da ninhada das ratas dos diferentes grupos (Tabela 46). Verificou-se que duas das fêmeas pertencentes ao grupo controle cometeram canibalismo.

A tabela 47 mostra os dados relativos ao consumo de ração total durante a lactação de ratas tratadas ou não com o RB de *S. brasiliensis* do 6º ao 20º DG. A análise estatística empregada não foi capaz de detectar diferença nos dados provenientes dos animais pertencentes aos diferentes grupos. O mesmo teste também revelou não haver diferença no ganho de peso total das ratas, durante a lactação (Tabela 48).

Quanto ao ganho de peso da ninhada durante a lactação, a análise estatística empregada revelou não haver diferença estatisticamente significativa dos valores obtidos entre as ninhadas (Tabela 49).

Já na tabela 50 estão contidos os dados referentes ao ganho de peso total, dos ratos machos adultos, do desmame até a idade adulta. O teste matemático

utilizado revelou não haver diferenças significantes nesse parâmetro nos animais alocados nos diferentes grupos.

Quando foram avaliados os dados referentes aos órgãos linfóides dos ratos machos adultos filhos de ratas que receberam ou não o RB durante a gestação, a análise estatística de ANOVA não detectou qualquer diferença estatisticamente significante no peso relativo do timo e do baço dos animais pertencentes aos diferentes grupos, como pode ser observado nas tabelas 51 e 52, respectivamente. Por outro lado, quando se avaliou a celularidade do baço, este mesmo teste estatístico, revelou haver diferenças significantes ($F= 3,79$; $df\ 3,29$; $p<0,05$) nos dados obtidos dos animais pertencentes aos diferentes grupos. O pós teste empregado mostrou aumento significativo ($p<0,01$) na celularidade do baço (Tabela 53 e Figura 32) de ratos machos provenientes de mães que receberam 3 mg/kg do RB de *S. brasiliensis* durante a gestação. Já, em relação à celularidade de medula óssea, o teste estatístico revelou não haver diferença nos valores obtidos dos animais pertencentes aos diferentes grupos, como apresentado na tabela 54.

Quanto à avaliação dos parâmetros hematológicos de ratos machos adultos filhos de ratas que receberam diferentes doses do RB de *S. brasiliensis* 6º ao 20º DG, a análise estatística empregada detectou diferenças estatisticamente significantes ($F=4,09$; $df= 3,28$; $p<0,05$) no RBC dos animais pertencentes aos diferentes grupos. O teste de Dunnet revelou que houve diminuição estatisticamente significativa ($p<0,01$) no número de eritrócitos de animais, cujas mães receberam a dose de 6 mg/kg do RB, durante a gestação, quando comparado com aqueles ratos filhos de mães do grupo controle. Ainda, em relação aos parâmetros hematológicos, no que se refere à hemoglobina, as análises estatísticas empregadas revelaram haver diminuição significativa ($p<0,05$) nos valores desta substância naqueles animais cujas mães receberam as doses intermediárias de RB da planta durante a gestação, quando comparados com aqueles valores de hemoglobina daqueles ratos do grupo controle (Tabela 55). Não houve diferença significativa na contagem diferencial de leucócitos, conforme mostra a tabela 56.

Finalmente, a tabela 57 mostra a bioquímica sérica de ratos machos, adultos, provenientes de mães que receberam diferentes doses do RB de *S. brasiliensis* 6º ao 20º DG. O teste de variância, ANOVA, utilizado mostrou haver diferenças estatísticas ($F= 3,37$; $df= 3,27$; $p<0,05$) nos valores da FA obtidos dos

animais dos diferentes grupos. O teste de Dunnet revelou aumento significativo ($p < 0,05$) no valor desta enzima naqueles ratos oriundos de mães que receberam a maior dose de RB durante a gestação.

Quando todos os animais foram analisados para possíveis alterações macroscópicas, a necropsia desses animais não mostrou alterações dignas de nota.

Tabela 43 - Consumo de ração total (em gramas) durante a gestação de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=5) ^a	3 (n=5)	6 (n=5)	9 (n=6)
496,2 ± 11,00	464,0 ± 11,3	437,2 ± 10,4*	435,3 ± 16,9*

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 31 - Consumo de ração total (em gramas) durante a gestação de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. Média ± SEM. * p<0,05 versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 44 - Ganho de peso total (em gramas), durante a gestação, de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=5) ^a	3 (n=5)	6 (n=5)	9 (n=6)
105,8 ± 6,5	98,6 ± 7,2	89,20 ± 7,2	87,7 ± 4,5

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 45 - Número de filhotes por ninhada, de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Número de filhotes			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=5) ^a	3 (n=5)	6 (n=5)	9 (n=6)
7,0 ± 1,3	9,0 ± 2,1	9,2 ± 1,4	9,8 ± 0,7

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 46 - Peso da ninhada (em gramas) de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Peso da ninhada (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=5) ^a	3 (n=5)	6 (n=5)	9 (n=6)
42,4 ± 7,6	48,8 ± 10,6	47,3 ± 6,1	51,3 ± 2,5

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 47 - Consumo de ração (em gramas) durante a lactação de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Consumo de ração (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=3) ^a	3 (n=5)	6 (n=5)	9 (n=6)
1046,0 ± 6,6	935,0 ± 57,9	895,4 ± 73,6	864,7 ± 17,3

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 48 - Ganho de peso (em gramas) durante a lactação de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=3) ^a	3 mg/kg (n=5)	6 mg/kg (n=5)	9 mg/kg (n=6)
22,7 ± 4,8	36,7 ± 4,2	41,1 ± 5,2	34,0 ± 4,7

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 49 - Ganho de peso (g) durante a lactação, por ninhada, de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso por ninhada (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=3) ^a	3 (n=5)	6 (n=5)	9 (n=6)
313,6 ± 16,17	248,8 ± 29,4	231,8 ± 30,0	226,3 ± 17,15

^a número de ninhadas empregadas por grupo.

Tabela 50 - Ganho de peso (g) do desmame a idade adulta de ratos machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Ganho de peso total (em gramas)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
191,2 ± 5,8	193,7 ± 4,6	195,6 ± 3,9	189,2 ± 3,6

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 51 - Peso relativo do timo (g/100g de peso vivo) de ratos machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Peso relativo do timo (g/100g de peso vivo)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=6)	6 (n=8)	9 (n=9)
0,213 ± 0,01	0,221 ± 0,01	0,236 ± 0,03	0,208 ± 0,01

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 52 - Peso relativo do baço (g/100g de peso vivo) de ratos machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Peso relativo do baço (g/100g de peso vivo)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=6)	6 (n=8)	9 (n=9)
0,306 ± 0,02	0,351 ± 0,03	0,289 ± 0,01	0,285 ± 0,01

^a número de animais empregados por grupo

Tabela 53 - Celularidade do baço (esplenócitos x 10⁶/g de baço) de ratos machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Celularidade do baço (esplenócitos x 10 ⁶ /g de baço)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 mg/kg (n=6)	6 mg/kg (n=8)	9 mg/kg (n=9)
100,2 ± 13,17	171,4 ± 11,55**	138,0 ± 18,31	121,0 ± 13,65

^a número de animais empregados por grupo.

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

Figura 32 - Celularidade do baço (esplenócitos x 10⁶/g de baço) de ratos machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. Média ± SEM. ** p<0,01 versus grupo controle; teste de Dunnett

Tabela 54 - Celularidade de medula óssea (células x 10⁶) de ratos machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Celularidade de medula óssea (células x 10 ⁶)			
RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
0 (n=10) ^a	3 (n=6)	6 (n=8)	9 (n=9)
15,7 ± 0,5	14,7 ± 1,1	13,9 ± 0,7	14,6 ± 0,5

^a número de animais empregados por grupo.

Tabela 55 - Parâmetros hematológicos de ratos machos adultos (60 dias de idade) filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=10) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=9)
RBC ^b (x10 ⁶ /mm ³)	7,3 ± 0,3	6,4 ± 0,1	6,1 ± 0,4**	6,8 ± 0,2
WBC ^c (x10 ³ /mm ³)	4,7 ± 0,4	4,8 ± 0,8	3,5 ± 0,5	4,3 ± 0,3
Hematócrito (%)	38,57 ± 1,7	34,7 ± 1,0	34,26 ± 1,4	37,18 ± 1,1
Hemoglobina (g/dL)	16,0 ± 0,5	14,2 ± 0,2*	13,8 ± 0,9**	15,3 ± 0,2
HCM ^d (pg)	21,8 ± 0,2	22,7 ± 0,2	22,6 ± 0,4	22,41 ± 0,2
VCM ^e (mm ³)	58,6 ± 0,2	59,1 ± 0,4	58,4 ± 0,4	59,3 ± 0,3
CHCM (g/dL)	37,4 ± 0,3	37,4 ± 0,2	38,73 ± 0,8	37,8 ± 0,4

^a número de animais avaliados por grupo.

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

^b RBC= *Red Blood Cell*; ^c WBC= *White Blood Cell*; ^d Hemoglobina corpuscular média; ^e volume corpuscular médio; ^f Concentração de hemoglobina corpuscular média

Tabela 56 - Contagem diferencial de leucócitos de ratos machos adultos (60 dias de idade) filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	Diferencial de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)			
	RB de <i>S. brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=10) ^a	3 (n=6)	6 (n=7)	9 (n=9)
Monócitos	0,07 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02
Linfócitos	2,95 $\pm$ 0,26	3,00 $\pm$ 0,46	2,17 $\pm$ 0,29	2,63 $\pm$ 0,18
Neutrófilos	1,69 $\pm$ 0,19	1,79 $\pm$ 0,37	1,22 $\pm$ 0,21	1,58 $\pm$ 0,17
Eosinófilos	0,04 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01

Tabela 57 - Avaliação bioquímica sérica de ratos, machos adultos (60 dias de idade), filhos de ratas tratadas ou não (controle) com 3, 6 e 9 mg/kg do resíduo butanólico (RB) de *S. brasiliensis*, por gavagem, do 6º ao 20º DG. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

	RB de <i>S.brasiliensis</i> (em mg/kg)			
	0 (n=10) ^a	3 (n=6)	6 (n=6)	9 (n=9)
AST ^b (U/L)	163,4 ± 14,1	190,2 ± 26,9	170,2 ± 11,8	162,9 ± 11,7
ALT ^c (U/L)	39,6 ± 2,0	40,8 ± 3,0	41,7 ± 2,6	35,0 ± 3,78
FA ^d (U/L)	204,5 ± 7,4	240,2 ± 25,2	236,5 ± 8,8	256,0 ± 11,3*
GGT ^e (U/L)	1,59 ± 0,24	1,18 ± 0,27	1,48 ± 0,35	1,21 ± 0,20
Uréia (mg/dL)	26,7 ± 1,3	26,2 ± 1,7	23,7 ± 0,4	26,2 ± 1,2
Creatinina (mg/dL)	0,92 ± 0,05	0,80 ± 0,06	0,81 ± 0,04	0,83 ± 0,03
Albumina (g/dL)	3,3 ± 0,04	3,2 ± 0,02	3,2 ± 0,04	3,3 ± 0,04
Proteína total (g/dL)	5,7 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1
Glicose (mg/dL)	255,9 ± 27,0	213,3 ± 23,4	241,5 ± 28,5	280,4 ± 28,2
Colesterol (mg/dL)	57,3 ± 4,1	63,3 ± 4,9	55,2 ± 3,8	68,7 ± 5,1

^a número de animais avaliados por grupo.

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

^b Aspartato aminotransferase; ^c Alanina aminotransferase; ^d Fosfatase alcalina; ^e Gama glutamiltransferase

Discussão

6 DISCUSSÃO

Em medicina veterinária, o estudo de plantas tóxicas é de extrema importância, principalmente para animais de produção. Dentre estas plantas, *S. brasiliensis* possui importante papel no que diz respeito a prejuízos causados por fitotoxinas na produção animal brasileira e consequentemente à economia do país (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; RISSI et al., 2007; SCHILD et al., 2008; KARAM; SCHILD; MELLO, 2011). Plantas do gênero *Senecio* também constituem causas importantes de intoxicação em humanos, tanto de forma direta, através do consumo da planta, como de forma indireta, quando da ingestão de alimentos contaminados.

No que se refere aos estudos fitoquímicos de *S. brasiliensis*, diversos APs foram identificados como presentes na planta, sendo a integerrimina o principal (MOTIDONE; FERRERIA, 1966; NARDI; GIMMLER; LEITE, 1980, TOMA et al., 2004). A análise inicial das folhas secas de *S. brasiliensis*, no presente estudo, revelou rendimento de 1,89 % de alcalóides. No entanto, deve-se considerar que vários fatores podem influenciar na concentração de princípios ativos na planta; desta maneira, características como o tipo de solo, índice pluviométrico, época do ano, fase de crescimento da planta, entre outros tantos fatores, influenciam no teor de alcalóides (KARAM et al., 2004). De fato, os dados aqui obtidos diferem significativamente daqueles níveis de alcalóides reportados por Karam et al. (2004) e Méndez et al. (1990), no qual a concentração destas substâncias foi de 0,25% e 31%, respectivamente.

Numa etapa posterior do estudo químico, o extrato etanólico foi então submetido ao fracionamento com diversos solventes orgânicos obtendo-se três resíduos, a saber: clorofórmico, acetato de etila e butanólico, sendo que os dois primeiros resíduos (clorofórmico e acetato de etila), embora apresentassem resultados positivos para alcalóides, seus rendimentos foram muito baixos. Já o RB apresentou uma única mancha compatível com alcalóides. A análise de espectroscopia de massa subsequente, mostrou haver a presença de 69 % de alcalóide integerrimina *N*-óxido. Este achado concorda com o estudo realizado por Hirschmann et al. (1987), o qual apontou ser a integerrimina *N*-óxido o principal alcalóide presente nas folhas de *S. brasiliensis*. Por apresentar um único alcalóide,

com grau de pureza de 69 %, alto rendimento e ser facilmente dissolvido em água, decidiu-se então iniciar os estudos de toxicologia com o RB, uma vez que seria possível atribuir os efeitos biológicos aqui apresentados exclusivamente a integerrimina, o principal alcalóide de *S. brasiliensis*.

Vários são os estudos que comprovam o efeito hepatotóxico de *S. brasiliensis*, em diferentes espécies animais (NARDI; GIMMLER; LEITE, 1980; BARROS; METZDORF; PEIXOTO, 1987; MÉNDEZ; RIET-CORREA; SCHILD, 1987; 1990; GAVA; BARROS, 1997; ILHA et al., 2001; SANTOS et al., 2008; CORREA et al., 2008; GRECO et al., 2010). Porém, nada se sabe sobre os efeitos de seus princípios ativos tóxicos no sistema imunológico. E, em relação aos efeitos de *S. brasiliensis* na toxicologia reprodutiva, muito pouco é relatado. De fato, uma busca na literatura encontrou um único trabalho sobre a ação teratogênica da integerrimina de *S. brasiliensis* (KVITKO; GIMMLER, 1986). Portanto, foi objetivo desta pesquisa verificar estes possíveis efeitos tóxicos da planta, empregando-se o rato como sujeito experimental, haja vista que é este o modelo animal proposto nos estudos de toxicologia, incluindo-se aqueles relacionados à imunotoxicologia (IPCS, 1996; LUSTER et al., 1988; DE JONG; VAN LOVEREN, 2007)

Devido à ausência de dados sobre esta planta e/ou seus alcalóides sobre o sistema imune, foi necessário inicialmente determinar quais doses seriam adequadas para serem empregadas neste estudo. Neste sentido, seria necessário encontrar doses do RB da planta que não promovessem hepatotoxicidade significativa, pois efeitos decorrentes de uma lesão hepática grave, certamente influenciariam também o sistema imune, mas não por um efeito direto das toxinas neste sistema; além do que, sabe-se que, o sistema imune, à semelhança do sistema nervoso central, é muito sensível às conseqüências de uma toxicose (IDOVA; CHEIDO; DEVOINO, 1997; ELENKOV; CHROUSOS, 2002); portanto, buscou-se obter doses relativamente baixas, que poderiam ser imunotóxicas, mas não comprometeriam outros órgãos ou sistemas.

Assim, propôs-se que as doses para ponto de partida para os estudos desta natureza seriam próximas àquelas utilizadas por Hueza et al. (2009) no estudo relativo à avaliação dos efeitos imunotóxicos da monocrotalina (MCT), um alcalóide pirrolizidínico que não está presente em plantas da espécie *S. brasiliensis*, e que apresenta características diferentes de outros alcalóides pirrolizidínicos, incluindo a integerremina, pois além de efeito hepatotóxico, a monocrotalina causa também

lesão ao nível renal e pulmonar (MEDEIROS; GÓRNIK; GUERRA, 1999). No entanto, como mais nenhum outro referencial havia, decidiu-se pelas doses do RB da planta, a saber: 3, 6 e 9 mg/kg, correspondente, respectivamente, a 2,07, 4,14 e 6,21 de integerrimina *N*-óxido. Ainda, uma dose bem maior, 20 mg/kg do RB extraído de *S. brasiliensis*, foi também empregada, para que se pudesse ter um referencial de um efeito provavelmente hepatotóxico bastante significativo, e assim ter um parâmetro para avaliar a toxicidade (ou a ausência) destas outras doses. Optou-se por administrar aos animais por 28 dias, período de tempo este correspondente à administração prolongada do protocolo de avaliação de toxicidade sugerido pela *Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD - (OECD, 1995).

Uma vez que é bem estabelecido que os APs exercem seu principal efeito tóxico sobre os hepatócitos, levando consequentemente à toxicidade hepática, para a avaliação e monitoramento da toxicidade das doses da planta aqui empregadas, tomaram-se os seguintes parâmetros como determinantes da intoxicação: análise bioquímica de função hepática e a histopatologia do fígado.

Assim, como já esperado, aqueles animais tratados com 20 mg/kg do RB da planta mostraram um quadro clínico-patológico bastante característico da intoxicação por APs, a saber: apatia, pelos eriçados, pele e mucosas branco-amareladas, queda no ganho de peso, e aumento gradativo de volume flutuante do abdômen associados a necrose hepática, proliferação de tecido conjuntivo fibroso e megalocitose (BULL; CULVENOR; DICK, 1968; MIRANDA et al., 1980; PEARSON, 1993; BARROS et al., 2007; CORREA et al., 2008; GRECO et al., 2010).

Corroborando a assertiva de que a dose de 20 mg/kg promoveu lesão hepática, o fato de haver também aumento nos níveis séricos das enzimas hepáticas e queda nos níveis de proteínas totais e a albumina. Essas últimas substâncias são sintetizadas no fígado, principalmente a albumina, a qual desempenha importante papel na manutenção da pressão oncótica dentro dos vasos. Desta forma, a sua diminuição pode ocasionar edemas (FRY; MCGAVIN, 2008). De fato, os animais tratados com 20 mg/kg do RB da planta apresentavam-se edemaciados.

Em relação aos efeitos da administração das doses de 3, 6 e 9 mg/kg do RB da planta aos animais, ao contrário das grandes alterações clínicas verificadas nos animais tratados com a dose de 20 mg/kg de RB de *S. brasiliensis*, nada digno de nota foi observado nos animais destes três grupos expostos à planta. Além disto,

embora a avaliação da função hepática, tenha revelado aumento estatisticamente significativo nos níveis das enzimas AST e ALT naqueles ratos dos grupos que receberam as doses de 6 e 9 mg/kg da planta, deve-se considerar que a faixa de variação fisiológica de ambas as enzimas em ratos é ampla (TACONIC FARMS, 2005). De fato, uma pesquisa a qual reuniu dados históricos de ratos *Sprague-Dawley*, considerando valores de referência dos parâmetros bioquímicos, revelou que valores fisiológicos de AST e ALT podem aumentar 3,5 e 6 vezes o valor da média, respectivamente (PETTERINO; ARGENTINO-STORINO, 2006).

Ainda, analisando o estudo bioquímico, não foram encontradas diferenças significantes nos demais parâmetros avaliados e que poderiam indicar alteração hepática, entre eles proteínas totais e albumina. Assim, reunindo-se todos estes dados, pode-se supor que os animais não apresentaram quadro de insuficiência hepática, o que caracterizaria a intoxicação por APs. Além disto, reforçam esta hipótese, os resultados provenientes do estudo histopatológico, no qual se verificou que, ao contrário das extensas lesões detectadas no fígado de animais que foram tratados com a dose de 20 mg/kg do RB de *S.brasiliensis*, o parênquima hepático de ratos que receberam 9 mg/kg da planta apresentou apenas congestão e discreta megalocitose.

Um dado interessante verificado é que, de maneira geral, todos os animais dos diferentes grupos tratados com a planta, da maior até a menor dose (isto é de 20 a 3 mg/kg), apresentaram diminuição estatisticamente significativa no ganho de peso, já na primeira semana de tratamento com a planta, mesmo quando seu consumo de ração não havia sido afetado. Este mesmo padrão de alteração foi observado em todos os outros experimentos subsequentes desta pesquisa.

Pouco poderia ser especulado para explicar este resultado. Entretanto, Mingatto et al. (2008) mostraram que ratos alimentados, tratados com monocrotalina, um AP presente em plantas do gênero *Crotalaria*, que causa hepatotoxicidade semelhante à produzida pelos alcalóides de *Senecio*, exibiram um aumento da glicogenólise e glicólise. Por outro lado, ratos em jejum, mostraram diminuição da gliconeogênese e da síntese de uréia a partir de L-alanina. Os autores concluíram que a monocrotalina leva a uma lipólise compensatória para gerar energia, resultando em redução no ganho de peso. Assim, é possível que este mesmo mecanismo possa ser causado pela integerrimina *N*-óxido, presente no RB de *S. brasiliensis*, explicando assim, os resultados aqui mostrados.

É bem conhecido que o sistema imunológico é altamente suscetível a uma dieta inadequada de macro ou micronutrientes. De fato, a causa mais comum de imunodeficiência em todo o mundo é a desnutrição, que afeta cerca de 50% da população em algumas comunidades carentes (CUNNINGHAM-RUNDLES; MCNEELEY; MOON, 2005; FRANÇA et al., 2009). No presente estudo, todos os animais dos diferentes grupos que receberam as diferentes doses do RB de *S. brasiliensis* mostraram diminuição no consumo de alimento. Contudo, os ratos tratados com 6 mg/kg da planta mostraram diminuição estatisticamente significativa no consumo de alimento. Assim, poderia se levantar a hipótese que a deficiência alimentar poderia produzir efeito imunossupressivo e não o tratamento com a planta em si. No entanto, deve ser considerado que, no contexto da imunodeficiência relacionada à desnutrição, a atrofia tímica trabalha como um "barômetro" da desnutrição (CHANDRA, 1992; PRENTICE, 1999). Assim, considerando que a redução no consumo de alimento, induzida pelo tratamento com RB, não promoveu alteração no peso relativo do timo de todos os ratos avaliados, pode-se assumir que todos os possíveis efeitos imunotóxicos que porventura forem relatados aqui podem ter ocorrido devido à ação direta de *S. brasiliensis*.

Para investigar a indução de imunotoxicidade direta por xenobióticos, sugere-se que os experimentos sejam elaborados racionalmente, afim de mostrarem um verdadeiro efeito imunotóxico, visto que o sistema imunológico é ~~um sistema~~ dinâmico e altamente regulado. Com base nisto, a avaliação dos órgãos linfóides foi um dos primeiros métodos a fim de detectar os efeitos tóxicos diretos de xenobióticos sobre o sistema imune (INTERNATIONAL COLLABORATIVE IMMUNOTOXICITY STUDY, 1998). Enquanto nenhuma significância estatística foi observada no peso relativo do timo de ratos expostos ao RB, foi verificado aumento significativo no peso relativo do baço de animais tratados com 9 mg/kg do RB. A esplenomegalia pode ser induzida por uma ampla gama de anormalidades e transtornos hematológicos, tais como a anemia hemolítica ou infecções, linfoma e doenças mieloproliferativas, bem como a hipertensão portal devido à doença hepática (NÜßLEIN et al., 2009). Como não foi observado qualquer sinal de infecção ou anemia, desordem mieloproliferativa com figuras de hematopoese extramedular e doença hepática, é plausível supor que o aumento no peso relativo do baço, aqui mostrado, seja uma consequência da congestão esplênica, como evidenciou a avaliação histopatológica, e não devido a um efeito imunotóxico da planta.

Quando a contagem de células do sangue foi analisada, detectou-se aumento do número de certos tipos de células de ratos tratados com 9 mg/kg do RB de *S. brasiliensis*. Há situações em algumas enfermidades em que ocorre aumento na massa de células do sangue. Por exemplo, na policitemia vera, um transtorno mieloproliferativo, caracterizada por eritrocitose variável, associada com leucocitose e trombocitose, a qual deve ser diferenciada principalmente da então chamada policitemia secundária, que é muito mais comum na prática clínica e, em alguns casos, resulta da eritropoietina relacionada à doenças renais (PRCHAL, 2003; PATNAIK; TEFFERI, 2009). De fato, foi verificado que os animais tratados com 9 mg/kg do RB mostraram congestão renal; no entanto, saber se as lesões renais verificadas aqui são suficiente para promover a eritrocitose é uma das questões levantadas. Também, não se pode responder acerca do aumento no número de leucócitos, uma vez que não foi detectado aumento na celularidade da medula óssea e processo inflamatório.

A outra condição que poderia produzir este efeito é a desidratação ou hipovolemia (WATSON, 2000), no entanto, tal situação pode ser descartada no presente estudo uma vez que os valores de hematócrito estavam normais. Além disto, considerando-se que a análise da densidade urinária permite indicar indiretamente o grau de desidratação, já que animais desidratados apresentam densidade urinária elevada, realizou-se também aqui esta prova, sendo que os dados claramente mostraram não haver diferença neste parâmetro, quando compararam-se os valores obtidos entre animais tratados ou não com o RB da planta.

Para promoverem seus efeitos citotóxicos, os APs devem ser biotransformados, por enzimas microssomais hepáticas, em seu metabólito altamente reativo, o composto pirrólico. Este tem alta reatividade nucleofílica com o DNA, o que resulta em ligação com DNA e ligação cruzada (ambos, DNA-DNA e DNA-proteína) (HINCKS et al., 1991; KIM et al., 1993; FU et al., 2001), os quais podem facilmente levar uma célula a atingir um estado anti-mitótico. Esta característica permite que alguns APs, tal como a indicina *N*-óxido (encontrada no *Heliotropium indicum* L.), possam ser empregados como quimioterápicos antiproliferativos para tratar pacientes com leucemia e tumores sólidos (POSTER et al., 1981; WHITEHEAD et al., 1990). Além disso, já foi demonstrado que a administração *in vivo* de integerrimina induz um efeito antimitótico em hepatócitos

(NARDI et al., 1980) e mesmo quando utilizada *in vitro*, é capaz de reduzir a proliferação de linfócitos (SANTOS-MELLO et al., 2002). Tendo em vista que a resposta ao dano no DNA ativa vias de “checkpoints” específicas que regulam os mecanismos de reparo do DNA e induz a parada do ciclo celular (BRANZEI; FOIANI, 2008), é provável que a redução no índice proliferativo de linfócitos T, estimulados com ConA, de ratos tratados com a maior dose do RB observado aqui, poderia ser o resultado de danos ao DNA induzido pela integerrimina. De fato, a análise do ciclo celular de linfócitos T estimulados com ConA tratados *in vitro* com o RB confirmou essa hipótese, uma vez que foi observado a parada em G1 e consequentemente, redução no percentual de células na fase S. Além disso, Hueza et al. (2009) demonstraram que a MCT, um AP da *Crotalaria spectabilis*, induz uma redução na celularidade da medula óssea, reforçando a teoria da atividade antiproliferativa dos APs.

Independentemente de nenhuma diferença estatística ter sido detectada no burst oxidativo entre os diferentes grupos, o tratamento com RB claramente promoveu uma interferência na geração rápida e liberação de intermediários reativos de oxigênio por neutrófilos, de maneira dose-dependente, mesmo quando foi empregado um estímulo forte, como acetato de forbol miristato, que é um ligante da proteína quinase C.

Diferentemente dos radicais livres de oxigênio produzidos pelo envelhecimento, infecções e citotoxicidade direta, célula imunes utilizam NADPH oxidase para reduzir O_2 à radicais livres e depois à peróxido de hidrogênio afim de combater infecções (WITKO-SARSAT et al., 2000), sendo este percurso improvável de ser o alvo do mecanismo de ação dos APs. No entanto, os neutrófilos em si poderiam ser o alvo para a atividade tóxica dos radicais livres formados pela exposição APs, reduzindo desta forma a sua propriedade bactericida.

Por outro lado, este trabalho revelou que a dose de 9 mg/kg de RB promoveu maior atividade de macrófagos peritoneais, no que diz respeito a intensidade da fagocitose. No entanto, é importante ressaltar que a atividade fagocítica dos macrófagos não estava aumentada, ou seja, tanto macrófagos de animais expostos ao alcalóide quanto aqueles do grupo controle, apresentaram atividade fagocítica semelhante, sem nenhum detrimento ou estimulação da capacidade em fagocitar partículas, podendo ser o aumento do índice um artefato de

técnica, já que também não houve nestes macrófagos peritoneais maior produção espontânea de peróxido de hidrogênio ou de óxido nítrico.

Ainda, corrobora esta suposição, o não aumento na produção de citocinas pró-inflamatória circulantes produzidas por estas células, como o TNF- α e a IL-6, evidenciando a homeostase desta população celular.

Por outro lado, quando avaliou-se os níveis séricos de IFN- γ , foi possível verificar uma diminuição nos níveis desta citocina apenas naqueles animais tratados com a menor dose do RB de *S. brasiliensis*. Sabe-se que a principal célula que produz esta citocina é o linfócito NK (*Natural Killer*) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), o qual não foi estudado no presente trabalho, assim pouco poderia ser discutido no momento que melhor embasasse o efeito observado e o por que de apenas células de animais expostos com a menor dose de *Senecio* apresentaram este perfil.

Em relação ao fenótipo das células do baço, não foi surpresa que não tenham sido observadas diferenças nos subconjuntos de linfócitos, uma vez que não se observou qualquer alteração morfológica dos órgãos linfóides, peso relativo e anormalidade na celularidade nos ratos expostos ao RB da planta.

Este estudo é o primeiro na literatura que focou nos possíveis efeitos da integerrimina *N*-óxido, contida no RB de *S. brasiliensis*, no sistema imune. Pode-se concluir até o momento, sobre os experimentos realizados nesta parte do estudo em ratos adultos, que apesar da sugestão do desenvolvimento de mais pesquisas para verificar a possível interferência deste AP no metabolismo do GSH e o papel dos radicais livres de oxigênio em células imunes, propõe-se que o integerrimina *N*-óxido *per se* não promove efeitos imunotóxicos diretos em ratos.

Em 1961 se estabeleceu a associação entre a ingestão da talidomida, um medicamento utilizado como sedativo empregado em situações para controle da ansiedade e náuseas, por mulheres gestantes, e o nascimento de crianças severamente malformadas, as quais apresentavam normalmente focomelia, anomalia caracterizada por encurtamento dos membros. Portanto, a partir desta constatação foi que a teratologia ganhou notoriedade como ciência e os primeiros princípios foram redigidos por especialistas da Organização Mundial da Saúde em 1967 (WHO, 1967). A partir deste episódio, houve um grande incremento nesta área da toxicologia.

Os diferentes xenobióticos, sejam agentes físicos ou químicos, podem causar efeitos deletérios diretamente sobre o produto da concepção, ou secundariamente, através da sua ação tóxica sobre o organismo materno (SPINOSA et al., 1999). Para os estudos experimentais relacionados aos efeitos de xenobióticos sobre a indução de anomalias e ou malformações fetais, é importante salientar que as doses utilizadas não devem causar toxicidade materna exacerbada, uma vez que o próprio estresse da intoxicação poderia promover efeitos deletérios ao conceito, interferindo, destarte, com a interpretação correta dos reais efeitos do xenobiótico (BERNARDI, 2006; GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

Em relação ao período de administração do RB de *S. brasiliensis* em ratas gestantes, determinou-se que estas receberiam a planta do 6º ao 20º DG. Este período foi escolhido, pois se sabe que, em ratas, no 6º dia de prenhez já houve implantação do embrião no útero (SZABO, 1989; BERNARDI, 2006), permitindo, desta maneira, que os possíveis efeitos da planta ocorressem somente no período de organogênese e desenvolvimento fetal, descartando-se assim a possibilidade de toxicidade na pré-implantação. A escolha deste período permitiria também evitar os possíveis efeitos imunomoduladores da integerrimina sobre células do sistema imune natural materno que poderiam promover, no momento da implantação do embrião, a rejeição da invasão trofoblástica embrionária e, conseqüentemente, sua reabsorção precoce (TODER; CARP; STRASSBURGER, 1994).

Na investigação dos efeitos tóxicos de substâncias químicas no período perinatal, o peso corporal materno e de sua prole são tidos como um índice importante de toxicidade (STEVENS; GALLO, 1989). Neste sentido, sabe-se que alterações no peso materno podem estar ligadas à desnutrição. De fato, muitos estudos têm sido realizados, colocando-se em foco os efeitos da desnutrição no desenvolvimento fetal, não só no que se refere aos conceitos clássicos de teratogênese, isto é, malformações, já muito bem estabelecidas, como também alterações que passam despercebidas no fenótipo do neonato no momento do nascimento, sendo estas disfunções verificadas apenas numa fase posterior da vida destes indivíduos. Entre estas alterações, citam-se aquelas no sistema imune (DEVEREUX; BARKER; SEATON, 2002) e as no sistema nervoso central, promovendo alterações comportamentais (VIEAU et al., 2007), entre outras.

Considerando que nos dois experimentos de toxicidade reprodutiva, aqui realizados, não foi detectada alteração consistente no consumo de ração naquelas

ratas tratadas com a planta e, em apenas um dos experimentos, fêmeas tratadas com a dose maior de RB de *S.brasiliensis* apresentaram queda no ganho de peso, pode-se supor que as fêmeas expostas à planta não se apresentavam em condição de desnutrição. Corrobora tal hipótese estudos conduzidos por Fleeman et al. (2005) e Dipe (2009), os quais verificaram que o comprometimento no desenvolvimento fetal ocorre quando há restrição alimentar de 40% ou mais do que as fêmeas ingeriram alimento normalmente na gestação.

A avaliação da *performance* reprodutiva materna é um dos principais parâmetros utilizados nos protocolos convencionais de avaliação de toxicidade do desenvolvimento. Esta avaliação permitiria verificar, com maior precisão e profundidade, se os alcalóides presentes no RB da planta produziram efeitos tóxicos, não só diretamente no organismo fetal, mas também na fisiologia reprodutiva da fêmea, o que poderia levar aos efeitos tóxicos no feto. Assim, o presente estudo revelou que, de todos os parâmetros pesquisados, detectou-se a diminuição estatisticamente significativa no peso das placentas daquele grupo de fêmea tratadas com a maior dose da planta.

Os resultados do presente estudo diferem dos relatados por Kvitko e Gimmler (1986), no qual a integerrimina em doses únicas de 0, 25, 37,5 e 50 mg/kg, foi administrada, por via intraperitoneal, nos períodos de 0 -10 horas, 3º, 5º e 8º DG de camundongos C57BL/6. Estes autores observaram perda pós-implantação e malformações fetais caracterizadas por microftalmia, anoftalmia, microcefalia e anencefalia em proles de mães que receberam integerrimina no 3º DG. Estes mesmos pesquisadores ainda relataram diminuição na percentagem de fetos vivos naquelas mães que receberam integerrimina no 3º e 8º DG. Certamente estas alterações tão drásticas estão relacionadas à elevada dosagem do alcalóide administrada às gestantes; assim, a título de comparação, verifica-se que a maior dose empregada aqui neste estudo foi aproximadamente quatro vezes menor que a menor dose administrada aos animais no estudo conduzido por Kvitko e Gimmler (1986). Portanto, não seria possível discutir as discrepâncias de resultados entre estas duas pesquisas. Além disto, embora o experimento anterior tenha sido realizado em camundongos, dos quais pouco se sabe sobre a toxicidade da integerrimina, pode-se supor que doses tão elevadas quanto as lá empregadas devam promover efeitos tóxicos graves nas gestantes, o que acarretaria, indiretamente, em grande comprometimento no desenvolvimento fetal.

É amplamente conhecido que os compostos pirrólicos possuem atividade alquilante sobre o DNA, resultando em comprometimento na mitose, podendo levar ao desenvolvimento de teratogenicidade (PETERSON; JAGO, 1980). Considerando-se que durante a embriogênese há uma alta proliferação e diferenciação celular, seria esperado que significantes alterações físicas fossem observadas nos filhotes de gestantes expostas ao RB da planta. De fato, a aflatoxina, uma micotoxina produzida por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que possui mecanismo de ação hepatotóxico semelhante ao dos alcalóides pirrolizidínicos (CHEEKE, 1994; WILLIAMS et al., 2004; KHLANGWISSET; SHEPHARD; WU, 2011), mostrou efeitos teratogênicos graves, em diferentes espécies animais, incluindo-se ratos (WANGIKAR; DWIVEDI; SINHA, 2004). Porém, no presente estudo, não foram observadas alterações teratogênicas nos filhotes estudados. Embora neste momento não se tenha outros dados que poderiam auxiliar na explicação deste resultado (por exemplo, um estudo “*in vitro*”, avaliando-se o efeito da integerrimina em células embrionárias), pode-se sugerir que as doses aqui empregadas, não foram capazes de causar alterações teratogênicas devido à grande capacidade que células embrionárias têm em se regenerar durante os “*checkpoints*” do ciclo celular e a alta capacidade proliferativa de células totipotentes (LEVITT et al., 2007).

Parcas foram as alterações encontradas nos filhotes de mães expostas à planta; assim, em relação à organogênese, nenhuma lesão foi observada e, em relação à análise óssea, verificou-se que embora tenha sido detectada diminuição significativa na ossificação dos fetos oriundos de ratas que receberam as maiores doses da planta, não foram observadas malformações ósseas, e/ou qualquer outra alteração neste tecido.

Nos mamíferos a transferência de cálcio da mãe para o feto ocorre por via transplacentária, durante o desenvolvimento fetal, ou por meio da secreção no leite durante a lactação (WYSOLMERSKI, 2002). Então, uma possível explicação para a observação da diminuição da ossificação naqueles fetos seria a alteração no transporte transplacentário, que poderia estar comprometido, sugerido pelo menor peso placentário observado no presente estudo. De fato, vários estudos vêm apontando que muitas substâncias podem alterar a transferência placentária de nutrientes da mãe para o conceito; neste sentido, sabe-se que distúrbios na circulação materno-fetal podem promover lesões do tecido placentário, alterando o

metabolismo endócrino e influenciando no desenvolvimento embrionário/fetal (GOODMAN; JAMES; HARBSON, 1982). No entanto, outras possibilidades, como hipocalcemia materna, refletindo num menor aporte de cálcio para o feto, não podem ser descartadas neste momento. Portanto, futuros estudos deverão ser realizados para melhor compreender tal alteração.

Segundo Cláudio et al. (1999), a maior limitação dos protocolos de avaliação de risco de teratogenicidade entre as agências de regulamentação é de que não há o exame dos filhotes em nenhuma fase pós-natal, o que, na maioria das vezes, poderá levar a erros no julgamento sobre o possível efeito teratogênico de uma substância. De fato, uma pesquisa, realizada neste laboratório, na qual ratas foram expostas a baixas doses de cianeto de potássio durante a gestação, mostrou que embora os filhotes destas mães se apresentassem totalmente dentro da normalidade quando da avaliação por meio dos protocolos clássicos de teratogenicidade, a avaliação numa fase posterior (após o desmame) revelou que estes animais mostravam alterações evidentes no tecido hepático, renal e no SNC (SOUZA et al., 2007). Portanto, o presente trabalho não se restringiu apenas às avaliações imediatamente após o nascimento, este também objetivou avaliar a prole de ratas após o nascimento, incluindo-se a avaliação de imunoteratogenicidade.

Geralmente, quando se realiza um estudo de teratogênese clássico, no qual são avaliados os parâmetros fetais, tais como peso, comprimento, malformações físicas externas, análise óssea e visceral, entre outros, o período de tempo decorrido entre a primeira fêmea gestante a ser submetida à cesariana e a última, dentro de um mesmo grupo, não é uma variável importante para a interpretação dos dados obtidos, haja vista que as observações são realizadas imediatamente após o nascimento. Por outro lado, tal variação tem grande importância quando se realiza um estudo pós-natal do sistema imune dos filhotes, pois as avaliações são realizadas dias após o nascimento; portanto, a heterogeneidade nas idades dos filhotes de um mesmo grupo pode levar a bias quando da interpretação dos dados provenientes dos parâmetros imunes estudados; por exemplo, a avaliação da resposta imune humoral de um filhote de 21 dias, desmamado, é bastante dispare daquele que tem dez dias a mais ou menos de idade. Assim, neste estudo, foi alocado o maior número possível de fêmeas com machos, com o objetivo de obter-se a maior quantidade possível de ratas com

diagnóstico positivo de prenhez, em um período dentro de sete dias; no entanto, devido a diversos fatores, foi possível obter apenas cinco fêmeas por grupo.

Outro ponto que deve ser levantado se refere ao fato de que os ensaios de imunoteratologia são mais adequados quando apenas machos são empregados, uma vez que é sabidamente conhecido o papel dos hormônios sexuais femininos sobre o sistema imune, como o estrógeno, por exemplo (AHMED, 2000). Porém, como consequência do canibalismo verificado nas fêmeas do grupo controle, o número de filhotes machos foi insuficiente para realizar todos os protocolos experimentais de imunotoxicidade previstos para este estudo. Deve-se salientar que em condições “normais”, este fenômeno de canibalismo materno, comum em laboratórios, ainda não é compreendido (WEBER; OLSSON, 2008). Desta maneira, optou-se por avaliar os parâmetros hematológicos, assim como órgãos linfóides, no que diz respeito a peso relativo, celularidade e estudo histológico na prole adulta (aproximadamente 60 dias de idade). Parâmetros estes, que fazem parte dos ensaios não funcionais propostos nos protocolos de imunotoxicidade (De JONG; VAN LOVEREN, 2007). Portanto, como contribuição para futuros estudos de imunoteratogenicidade, recomenda-se que o número de fêmeas para acasalamento seja no mínimo, 20% superior do que aquele de fêmeas com proles, para obter-se assim, um número adequado de machos para a realização deste tipo de avaliação.

Da mesma maneira que as avaliações pós-natais realizadas, não foram observadas alterações dignas de nota em quase todos os testes de imunoteratogenicidade. Destarte, observou-se alteração apenas na celularidade do baço e nos parâmetros hematológicos, diminuição de RBC e de hemoglobina; porém, estes animais eram provenientes de mães expostas à dose de 3 ou de 3 e 6 mg/kg de RB da planta, respectivamente. Portanto, não foram detectadas alterações em filhos de ratas que receberam a maior dose da planta durante a gestação, o que permite sugerir que tais alterações não estariam relacionadas aos efeitos tóxicos do alcalóide pirrolizidínico; além disto, com relação à RBC e hemoglobina, embora a análise estatística apontasse a diferença, estes valores encontram-se dentro da variação fisiológica da espécie (TACONICS FARMS, 2005). Portanto, como o verificado com a monocrotalina, em estudo semelhante também realizado em ratos (HUEZA et al., 2009), pode-se fortemente sugerir que doses baixas de interregimina não promovem efeitos imunotóxicos em ratos expostos “*in utero*”. Uma questão que deverá ser objeto de pesquisas futuras é o porquê de alterações imunotóxicas,

teratogênicas e imunoteratogênicas produzidas pela Aflatoxina B1 (AFB1), mas não em alcalóides pirrolizidínicos, já que ambos toxicantes possuem mecanismo de ação tóxica muito semelhante?

Concluindo, os estudos aqui realizados permitem sugerir que doses baixas de integerrimina, da mesma maneira que a monocrotalina, um outro alcalóide pirrolizidínico, não promove efeitos imunotóxicos significantes, bem como parece não ser um agente teratogêno, seja por meio das avaliações clássicas, ou pela avaliação por protocolos de imunoteratogenicidade.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

➤ ESTUDO QUÍMICO

- As folhas de *S. brasiliensis* coletadas na região de Pelotas (RS) apresentam rendimento de 1,84% de APs totais.
- integerrimina *N*-óxido é o principal AP encontrado nas folhas de *S. brasiliensis* coletadas na região de Pelotas (RS).

➤ ADMINISTRAÇÃO DE 20 mg/kg DO RB DE *S. brasiliensis*, DURANTE 28 DIAS, EM RATAS

- O tratamento com a planta causa hepatotoxicidade grave, caracterizada pelas alterações clínico-patológicas e alteração nos parâmetros bioquímicos.

➤ ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE RB DE *S. brasiliensis*, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS MACHOS ADULTOS

- A administração das doses 3, 6 e 9 mg/kg do RB promove menor ganho de peso.
- O tratamento com a dose de 9 mg/kg aumenta RBC, WBC e a contagem diferencial de neutrófilos e linfócitos.
- O tratamento com a dose de 9 mg/kg diminui a atividade proliferativa de linfócitos T.

- A maior dose do resíduo causa congestão e conseqüente aumento do peso relativo do baço.
- O tratamento com o resíduo da planta não promove interações nas respostas imunes humoral e celular.
- O tratamento com a planta não altera a fenotipagem linfocítica.
- A administração do RB não interfere de forma significativa na atividade de fagócitos.

➤ ESTUDO PERINATAL E PÓS-NATAL: ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE RB DE *S. brasiliensis* DO 6º AO 20º DG

- O tratamento com 9 mg/kg do resíduo causa leve toxicidade materna, caracterizado pela redução no ganho de peso e alteração nos parâmetros bioquímicos.
- A administração de 9 mg/kg do RB da planta diminui o peso das placentas.
- A administração durante a gestação de 6 e 9 mg/kg do RB diminui a ossificação fetal.
- O tratamento com o resíduo não promove teratogenicidade.
- Filhotes adultos de mães tratadas durante a gestação não apresentam alterações significantes no ganho de peso, nos órgãos linfóides e nos parâmetros hematológicos.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A., K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citocinas. In: ABBAS, A., K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008. p. 268-301.

AFONSO, E.; POTT, A. **Plantas tóxicas para bovinos**. Campo Grande, MS: Embrapa Campo Grande, 2000. n. 44.p.320.

AHMED, A. S. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): A new emerging field. **Toxicology**, v. 150, n. 1-3, p. 191-206, 2000.

ANJOS, B. L.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R. A.; GOMES, A. D.; KOMMERS, G. D.; BARROS C. S. L. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 501-507, 2008.

BANERJEE, B. D.; CHAKRABORTI, A.; SUKE, S. G.; AHMED, R. S.; TRIPATHI, A. K. Xenobiotic-induced immune alterations: Implications in health and disease. **Indian Journal Biochemistry and Biophysics**, v. 45, n. 1, p. 7-15, 2008.

BARROS, C. L. S.; METZDORF, L. L.; PEIXOTO, P. V. Ocorrência de surtos de Intoxicação por *Senecio* spp (compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 101-107, 1987.

BARROS, C. S. L.; CASTILHOS, L. M. L.; RISSI, D. R.; KOMMERS, G. D.; RECH, R. R. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2006. p. 807-816.

BOLZAN, A. A.; SILVA, C. M.; FRANCESCATO, L. N.; MURARI, A. L.; SILVA, G. N. S.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. Espécies de *Senecio* na medicina popular da América Latina e toxicidade relacionada a sua utilização. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 619-625, 2007.

BOPPRÉ, M.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. A. Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 594-600, 2005.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 297-308, 2008.

BRAS, G.; BROOKS, S. E. H.; WATLER, D. C. Cirrhosis of the liver in Jamaica. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 82, n. 2, p. 503-511, 1961.

BROOKS, S. E.; MILLER, C. G.; MCKENZIE, K.; AUDRETSCH, J. J.; BRAS, G. Acute veno-occlusive disease of the liver. Fine structure in Jamaican children. **Archives of Pathology**, v. 89, n. 6, p. 507-520, 1970.

BULL, L. B.; CULVENOR, C. C. J.; DICK, A. T. **The pyrrolizidine alkaloids: Their chemistry, pathogenicity and other biological properties**. Amsterdam: North-Holland Publish, 1968.

CAO, Y.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. Safety assessment of food and herbal products containing hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: interlaboratory consistency and the importance of *N*-oxide determination. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 6, p. 526-533, 2008.

CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 597-600, 1992.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants**. 2nd ed. Danville, Illinois: Interstate, 1994.

CHEEKE, P. R. Nutritional Implications of Pyrrolizidine Alkaloid Toxicosis. In: **Anais do International Symposium of Poisonous Plants**, 8., 2009, João Pessoa, PB, 2009.

CHEEKE, P. R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 9, p. 2343-2350, 1988.

CHEEKE, P. R.; PIERSON-GOEGER, M. L. Toxicity of *Senecio jacobaea* and pyrrolizidine alkaloids in various laboratory animals and avian species. **Toxicology Letters**, v. 18, p. 343-349, 1983.

CHEN, Y.; JI, L.; WANG, H.; WAN, Z. Intracellular glutathione plays important roles in pyrrolizidine alkaloids-induced growth inhibition on hepatocytes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 357-362, 2009.

CLÁUDIO, L.; BEARER, C. F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. environmental protection agency methods for identification of hazards to developing organisms, part II: the developing toxicity testing guideline. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 35, p. 554-563, 1999.

COOK, J. A.; HOFFMAN, E. O.; Di LUZIO, N. R. Influence of lead and cadmium on the susceptibility of rats to bacterial challenge. **Experimental Biology and Medicine**, v. 150, n. 3, p. 741-747, 1975.

CORREA, A. M. R.; BEZERRA, P. S. J.; PAVARINI S. P.; SANTOS, A. S.; SONNE, L.; ZLOTOWSKI, P.; GOMES, G.; DRIEMEIER, D. *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in Murrah buffaloes in Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 187-189, 2008.

CULLEN J. M. Liver, biliary system and exocrine pancreas. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY J. F. (Ed.), **Pathologic basis of veterinary disease**. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2007. p.393- 346.

CULVENOR, C. C. J.; CROUT, D. H. G.; KLYNE, W.; MOSE, W. P.; RENWICK, J. D.; SCOPES, P. M. Circular dichroism of pyrrolizidine alkaloids and related compounds. **Journal of Chemical Society C**, v. 1, p. 3653-3664, 1971.

CULVENOR, C. C. J.; EDGAR, J.; A.; SMITH, W. L.; TWEEDDALE, H. J. Dihydropyrrolizidine analogues of pyrrolizidine alkaloids. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 3599-3602, 1969.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p.1119-1129, 2005.

DE JONG, W. H.; VAN LOVEREN, H. Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. **Methods**, v. 41, n. 1, p. 3-8, 2007.

DEINZER, M. L.; THOMSON, P. A.; BURGETT, D. M.; ISAACSON, D. L. Pyrrolizidine alkaloids: Their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.). **Science**, v. 195, n. 4277, p. 497-499, 1977.

DESCOTES, JOURNAL Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective. **Toxicology Letters**, v. 149, n. 1-3, p. 103-108, 2004.

DEVEREUX, G.; BARKER, R. N.; SEATON, A. Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens. **Clinical Experimental Allergy**, v. 32, p. 43-50, 2002.

DICKINSON, JOURNAL O. Release of pyrrolizidine alkaloids into milk. **Pharmacology Society**, v. 23, p. 377-379, 1980.

DIPE, V. V. **Efeitos da Privação alimentar materna sobre a prole de ratas Wistar. Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia**. 2009. 180 f. Dissertação (Dissertação em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

EDGAR, J. A.; SMITH, L. W. Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: Food safety implications. A.C.S. **Symposium Series American Chemical Society**, v. 745, p.118-128, 1999.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. **Annal New york Academy Sciences**, v. 966, p. 290-303, 2002.

FLEEMAN, T. L.; CAPPON, G. D.; CHAPIN, R. E; HURTT, M. E. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in the rat. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 74, p. 442-449, 2005.

FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; ZORZELLA-PEZAVENTO, F. G.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; DA CUNHA, M. L. R. S. M.; SARTORI, A. Impact of malnutrition on immunity and infection. **Journal Venomous Animal Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 374-390, 2009.

FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Bone Marrow, blood cells and lymphatic system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4th ed. Mosby Elsevier, 2008. p. 809-820.

FU, P. P.; CHOU, M. W.; XIA, Q.; YANG, Y. C.; YAN, J.; DOERGE, D. R.; CHAN, P. C. Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. **Environmental Carcinogens & Ecotoxicology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 353-386, 2001.

FU, P. P.; YANG, Y. C.; XIA, Q.; CHOU, M. W.; CUI, Y. Y.; LIN, G. Pyrrolizidine alkaloids – tumorigenic components in chinese herbal medicines and dietary supplements. **Journal Food and Drug Analysis**, v. 10, n.4, p.198-211, 2002.

FU, P. P.; XIA, Q.; LIN, G.; CHOU, M. W. Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. **Drug Metabolism Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-55, 2004.

GAD, S. C., WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: HAYES, A. W. (Ed) **Principles and methods for toxicology**. 2th Ed. New York: Raven Press, 1989. p. 435-438.

GAVA, A.; BARROS, C. S. L. *Senecio* spp. poisoning of horses in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 36-40, 1997.

GOODMAN, D. R.; JAMES, R. C.; HARBSON, R. D. Placental toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 123-128, 1982.

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

GRECO, F. B.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ESTIMA-SILVA, P.; SALLIS, E. S. V. Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.5, p. 389-397, 2010.

HARTMANN, T.; TOPPEL, G. Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1639-1643, 1987.

HARTMANN, T.; WITTE, L. Pyrrolizidine alkaloids: a chemical, biological and chemoecological aspects. In: PELETIER, S. W. (Ed.). *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. Oxford, UK: Pergamon Press, 1995.v.9, p. 155-233.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HINCKS, J. R.; KIM, H. Y.; SEGALL, H. J.; MOLYNEUX, R. J.; STERMITZ, F. R.; COULOMBE, R. A. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure–activity relationships. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 111, n. 1, p. 90-98, 1991.

HIRSCHMANN, G. S.; FERRO, E. A.; FRANCO, L.; RECALDE, L.; THEODULOZ, C. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio-brasiliensis* populations. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 770-772, 1987.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphicars, 1939. 355p.

HOOPER, P. T. Pyrrolizidine alkaloids poisoning- pathology with particular reference to differences in animal and plant species. In: KEELER, R. F, KAMPEN, K.R.V, JAMES, L. (Ed). **Efeccts of poisonous plants of livestock**. New York: Academic Press, 1978. p. 162-176.

HUAN, J Y.; MIRANDA, C. L.; BUHLER, D. R. Species differences in the hepatic microsome enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. **Toxicology Letters**, v. 99, n. 2, p. 127-137, 1998.

HUEZA, I. M. **Parâmetros inflamatórios, imunológicos e histopatológicos da administração prolongada da Ipomoea carnea em ratos**: 1. avaliação em animais adultos 2. Estudo perinatal. 2006. 330 f. Tese (Doutorado em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HUEZA, I. M.; BENASSI, JOURNAL C.; RASPANTINI, P. C. F.; RASPANTINI, L. E. R.; SÁ, L. R. M.; GÓRNIK, S. L.; HARAGUCHI, M. Low doses of monocrotaline in rats cause diminished bone marrow cellularity and compromised nitric oxide production by peritoneal macrophages. **Journal of Immunotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 11-18, 2009.

HUEZA, I. M.; PALERMO-NETO, J. Immunotoxicologia. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., PALERMO-NETO, J. (Ed). **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008.

IDOVA, G.; CHEIDO, M.; DEVOINO, L. Modulation of the immune response by changing neuromediator systems activity under stress. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 9-10, p. 535-540, 1997.

ILHA, M. R.; LORETTI, A. P.; BARROS, S. S.; BARROS, C. L. S. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 123-138, 2001.

INTERNATIONAL COLLABORATIVE IMMUNOTOXICITY STUDY. Report of validation study of assessment of direct immunotoxicity in the rat. **Toxicology**, v. 125, n. 2-3, p. 183-201, 1998.

IPCS : INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY
Environmental health criteria 180. Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Geneva: World Health Organization, 1996.

KAKAR, F.; AKBARIAN, Z.; TOBY, T.; MUSTAFA, M. L.; WATSON, J.; HANS, P.; VAN EGMOND, H. P.; OMAR, M. F.; MOFLEH, J. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Toxicology**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

KARAM, F. C.; SCHIL, A. L.; MELLO, J. R. B. Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais e medidas de controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 603-609, 2011.

KARAM, F. S. C.; MÉNDEZ, M. C.; JARENKOW, J. A.; RIET-CORREA, F. Fenologia de quatro espécies tóxicas de *Senecio* (Asteraceae) na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 33-39, 2002.

KARAM, F. S. C.; SOARES, M. P.; HARAGUCHI, M.; RIET-CORREA, F., MÉNDEZ, M. C.; JARENKOW, J. A. Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 191-198, 2004.

KACMAR, P.; PISTL, J. MIKULA, I. Immunotoxicology and veterinary medicine. **Acta Veterinaria Brno**, v. 68, n. 1, p. 57–79, 1999.

KHLANGWISSET, P.; SHEPHARD, G. S.; WU, F. Aflatoxins and growth impairment: A review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 41, n. 9, p. 740-755, 2011.

KIM, H. Y.; STERMITZ, F. R.; MOLYNEUX, R. J.; WILSON, D. W.; TAYLOR, D.; COULOMBE, R. A. Structural influences on pyrrolizidine alkaloid-induced cytopathology. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 122, n. 1, p. 61-69, 1993.

KIMBER, I.; DEARMAN, R. J. Immune response: adverse versus non-adverse effects. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 1, p. 54-58, 2002.

KVITKO, K.; GIMMLER, M. C. Effects of integerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. **Revista Brasileira de Genética**, IX, v. 3, p. 439-451, 1986.

LEVITT, P. S.; ZHU, M.; CASSANO, A.; YAZINSKI, S. A.; LIU, H.; DARFLER, J.; PETERS, R. M.; WEISS, R. S. Genome maintenance defects in cultured cells and mice following partial inativação of essential cell cycle checkpoint gene Hus 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 6, p. 2189-2201, 2007.

LUSTER, M. I., DEAN, J. H.; GERMOLEC, D. R. Consensus workshop on methods to evaluate developmental immunotoxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 579-583, 2003.

LUSTER, M. I.; GERBERICK, G. F. Immunotoxicology testing: past and future. **Methods in Molecular Biology**, v. 598, p. 3-13, 2010.

LUSTER, M. I.; MUNSON, A. E.; THOMAS, P. T.; HOLSAPPLE, M. P.; FENTERS, J. D.; WHITE, K. L.; JR.; LAUER, L. D.; GERMOLEC, D. R.; ROSENTHAL, G. J.; DEAN, J. H. L. Development of a testing battery to asses chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Programs guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2-19, 1988.

LUSTER, M. I.; PAIT, D. G.; PORTIER, C.; ROSENTHAL, G. J.; GERMOLEC, D. R.; COMMENT, C. E.; MUNSON, A. E.; WHITE, K.; POLLOCK, P. Qualitative and quantitative experimental models to aid in risk assessment for immunotoxicology. **Toxicology Letters**, v. 64-65, p. 71–78, 1992.

LUSTER, M. I.; SIMEOVA, P. P.; GERMOLEC, D. R. Immunotoxicology. **Encyclopedia of life science**. p. 1-6, 2008.

MAGNABOSCO, E. M.; RIVERA, M. L. P. P.; PROLLA, I. R. D.; DE VERNEY, Y. M. F.; DE MELLO, E. S. Doença veno-oclusiva hepática: relato de um caso. **Jornal de Pediatria**, v. 73, n. 2, p. 115-118, 1997.

MARIANO-SOUZA, D. P. **Efeitos tóxicos da *Senna occidentalis* sobre o sistema linfo-hematopoético: avaliação da exposição de ratos durante a fase de crescimento e pré-natal**. 2009. 230 f. Tese (Doutorado em ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MATTOCKS, A. R.; CABRAL, J.O. Carcinogenicity of some pyrrolic pyrrolizidine alkaloid metabolites and analogues. **Cancer Letters**, v. 17, n. 1, p. 61-66, 1984.

MEI, N.; GUO, L.; PETER, P.; FU, P. O.; FUSCOE, J. C.; YANG LUAN, Y.; TAO CHEN, T. Metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity of comfrey. **Journal of Toxicology and Environmental Health B**, v. 13, n. 7-8, p. 509-526, 2010.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 51-56, 1987.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MARTS, W. Intoxicação experimental por cinco espécies de *Senecio* em bovinos e aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 3-4, p. 63-69, 1990.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 12-19, 1999.

MINGATTO, F. E.; MAIOLI, M. A.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**, v. 182, n. 1-3, p. 115-120, 2008.

MIRANDA, C. L.; CHEEKE, P. R.; SCHMITZ, JOURNAL A.; BUHLER, D. R. Toxicity of *Senecio jacobaea* (Tansy Ragwort) in rats. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 56, p. 432-442, 1980.

MOLYNEUX, R. J.; JAMES, L. F. Pyrrolizidine alkaloids in milk: Thresholds of intoxication. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 32, p. 94-103, 1990. Supplement.

MOLYNEUX, R. J.; PANTER, K. E. Alkaloids Toxic to Livestock. In: CORDELL, G.A. (Ed.), *The alkaloids: chemistry and biology*. vol. 67 . The Netherlands: Elsevier,. 2009. v.67.

MOTIDONE, M.; FERREIRA, P. C. Alcalóides do *Senecio brasiliensis* Less. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 4, p. 13-44, 1966.

NAGARKATTI, P. S.; NAGARKATTI, M. Immunotoxicology: Modulation of the immune system by xenobiotics. **Def Science Journal**, v. 37, n. 2, p. 235-244, 1987.

NARDI, N. B.; GIMMLER, M. C.; LEITE, B. G. Antimitotic action of integerrimine in rats. **Revista Brasileira de Genética III**, v. 4, p. 387-393, 1980.

NÜßLEIN, H. G.; HUPPERTZ, H. I.; MASSENKEIL, G.; MENGEL, E. Splenomegaly - An important cardinal symptom. **Aktuelle Rheumatologie**, v. 34, n. 4, p. 213-219, 2009.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for the testing of chemicals 407**. Paris: OECD, 1995.

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

PATNAIK, M. M.; TEFFERI, A. The complete evaluation of erythrocytosis: Congenital and acquired. **Leukemia**, v. 23, n. 5, p. 834-844, 2009.

PEARSON, E. G. Intoxicação por alcalóides da pirrolizidina. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. v.1.

PETERSON, J. E.; JAGO, M. V. Comparison of the toxic effects of dehydroheliotridine and heliotrine in pregnant rats and their embryos. **Journal of Pathology**, v. 131, p. 339-355, 1980.

PETRY, T. W.; BOWDEN, G. T.; HUXTABLE, R. J.; SIPES, I. G. Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotalina. **Cancer Research**, v. 44, n. 4, p. 1505-1509, 1984.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pré-clinical toxicity studies. **Experimental Toxicology and Pathology**, v. 57, p. 213-219, 2006.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

POSTER, D. S.; BRUNO, S.; PENTA, J.; MACDONALD, J. S. Indicine-*N*-oxide: A new antitumor agente. **Cancer Treatment Reviews**, v. 65, n. 1-2, p. 53-56, 1981.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; REILLY, P. E. B.; SEAWROGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research**, v. 443, n. 1-2, p. 53 – 67, 1999.

PRCHAL, J. T. Classification and molecular biology of polycythémias (erythrocytoses) and thrombocytosis. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 17, n. 5, p. 1151-1158, 2003.

PRENTICE, A. M. The thymus: A barometer of malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 5, p. 345-347, 1999.

REINA, M.; AZUCENA, G. C.; GUTIÉRREZ, C.; CABRERA, R.; RODRÍGUEZ, M. L.; FAJARDO, V.; VILLARROEL, L. Defensive chemistry of *Senecio miser*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 6-11, 2001.

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

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; PFISTER, JOURNAL; SCHILD, A. L.; DANTAS, A. F. M. **Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock**. Santa Maria: Palloti, 2009.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Toxic plants for livestock in Brazil: toxic species, economic impact and public health. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POISONOUS PLANTS, 8. 2006, Logan Utah. **Procceding**. Logan Utah, 2006.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Toxic plants for livestock in Brazil: economic impact, toxic species, control measures and public health implications. In: PANTER, K. E.; WIERENGA, T. L.; PFISTER J. A. (Ed.) **Poisonous plants: global research an solutions**. London, UK: International, 2007. p. 2-4.

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A. L.; TROST, M. E.; BRUM, J. S.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 261-268, 2007.

ROEDER, E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 55, n. 10, p. 711-726, 2000.

ROEDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, n. 2, p. 83-98, 1995.

ROEDER, E.; WIEDENFELD, H. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of Mongolia, Nepal and Tibet. **Pharmazie**, v. 64, p. 699-716, 2009.

ROGERS, J. M.; GRAY, L. E.; CARVER, B. D.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicity of dinocap in the mouse is not due to two isomers of the major active ingredients. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 7, n. 4, p. 341-346, 1987.

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

ROULET, M.; LAURINI, R.; RIVIER, L.; CALARME, A. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. **Journal of pediatrics**, v. 112, n. 3, p. 433-436, 1988.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SANTOS-MELO, R.; DEIMLIMH, L. L.; LAUER JUNIOR, C. M.; ALMEIDA, A. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. **Mutation Research**, v. 516, n. 1-2, p. 23-28, 2002.

SCHILD, A. L.; FERREIRA, J. L. M.; LADEIRA, S. R. L.; SOARES, M. P.; GRECCO, F. B.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; FISS, L. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório regional de Diagnóstico no ano 2007. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**. Pelotas: Editora Universitária, 2008. p.60-63.

SELYE, H.; TUCHWEBER, B.; BERTOK, L. Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 2, p. 834-890, 1966.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M.T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

SNEDCOR, G. W. **Statistical methods**. 4th ed. Ames: College Press, 1946.

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

SOUSA, A. B.; MAIORKA, P. C.; GONÇALVES, I. D.; SÁ, L. R. M.; GÓRNIK, S. Evaluation of effects of prenatal exposure to the cyanide and thiocyanate in *Wistar* rats. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 568-577, 2007.

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

STEGELMEIER, B. L.; EDGAR, J. A.; COLEGATE, S. M.; GARDNER, D. R.; SCHOCH, T. K.; COULOMBE, R. A.; MOLYNEUX, R. J. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. **Journal of Natural Toxins**, v. 8, n. 1, p. 95-116, 1999.

STEVENS, K. R.; GALLO, M. Practical considerations in the conduct chronic toxicity studies. In: HAYES, A. W. (Ed). **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 237-250.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey, **Public Health Nutrition**, v. 3, n. 4A, p. 501-508, 2000.

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

TACONIC FARMS. **Control Data of Br/Han: Wist@tac (GALAS) Rat**. New York: Taconic, 2005. 18 p. Disponível em: < http://www.taconic.com/user-assets/Documents/Products%20and%20Services/Animal%20Models/Wistar_Hannover_data.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2011.

TANIGUCHI, A. N. R.; CÉLIA. L.; VIEIRA, S. M.; FERREIRA, C. T.; ZAFFONATTO, D.; CERSKI, T.; SILVEIRA, T. R. Relato de caso – Doença veno-oclusiva induzida por chá de *Senecio brasiliensis*. **Revista HCPA**, v. 22, p. 183-184, 2002.

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

TODER, V.; CARP, H.; STRASSBURGER, D. Maternal immune recognition of pregnancy. **Israel Journal of Medicine Science**, v. 30, p. 922-927, 1994.

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

TOMA, W.; TRIGO, R. T.; DE PAULA, A. C. BRITO, A. R. M. S. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 345-351, 2004.

TORRES, M. B. A. M.; COELHO, K. I. R. Experimental poisoning by *Senecio brasiliensis* in calves: quantitative and semi-quantitative study on changes in the hepatic extracellular matrix and sinusoidal cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 43-50, 2008.

TRIGO, J. R. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 1, p. 83-98, 2011.

WANGIKAR, P. B.; DWIVEDI, P.; SINHA, N. Effects in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1. I. maternal toxicity and fetal malformations. **Birth Defects Research B**, v. 71, n. 6, p. 343-351, 2004.

WATSON, A. D. J. Erythrocytosis and Polycythemia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Eds). **Schalm's Veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, , 2000. p. 200-204.

WEBER, E. M.; OLSSON, I. A. S. Maternal behavior in *Mus musculus* sp: An ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, n. 1, p. 1-22, 2008.

WHITEHEAD, V. M.; BERNSTEIN, M. L.; VEGA, R.; VATS, T.; DYMENT, P.; VIETTI, T. J.; KRISCHER, J. Phase I trial of indicine-*N*-oxide in children with leukemia and solid tumors: A pediatric oncology group study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 26, n. 5, p. 377-379, 1990.

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 3, p. 282-292, 2011.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JPLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARDWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: WILSON, J.C.; WARKANY, J. (Ed.) **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press. 1965. p. 262-327.

WILSON, R. D. Principles of human teratology: Drug, chemical, and infections exposure. **Sogc clinical practice guideline**. n. 199, p. 1-7, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles of the testing of drugs for teratogenicity. **World Health Organization Technical Report**, v. 364, p. 5-18, 1967.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

WYSOLMERSKI, J. J. The evolutionary origins of maternal calcium and bone metabolism during lactation. **Journal of mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 3, p. 267-276, 2002.

VIAL, T.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G.; DESCOTES, J. Adverse effects of immunotherapeutics involving the immune system. **Toxicology**, v.174, p. 3-11, 2002.

VIEAU, D.; SEBAAI, N.; LÉONHARDT, M.; DUTRIEZ-CASTELOOT, I.; MOLENDI-COSTE, O.; LABORIE, C.; BRETON, C.; SYLVIE DELOOF, S.; LESAGE, J. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 16-20, 2007.