

## AValiação HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO, RIM E BAÇO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS A EXTRATO HEXÂNICO DE UMA PLANTA DA CAATINGA

Danielle Feijó de Moura<sup>1</sup>; Dayane de Melo Barros; Tamiris Alves Rocha; Silvio Assis de Oliveira Ferreira; Márcia Vanusa da Silva

1- Universidade Federal de Pernambuco– UFPE, [danielle.feijo@hotmail.com](mailto:danielle.feijo@hotmail.com)

**Resumo:** A Caatinga é um dos principais biomas brasileiros que apresentam uma grande diversidade de produtos naturais com propriedades terapêuticas que são utilizadas pelas comunidades da região. A *Pityrocarpa moniliformes* é uma espécie endêmica da caatinga pouco explorada em relação a seu potencial farmacológico, mas estudos recentes revelaram importante ação biológica. Apesar dessa espécie apresentar relevantes propriedades bioativas, são necessários estudos que confirmem segurança quanto a utilização dessa planta, ou seja, é preciso conhecer a possível toxicidade desta espécie. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação histopatológica do rim, fígado e baço de camundongos expostos por via oral ao extrato de *P. moniliformes*. Os extratos foram obtidos através de extrator automático com o solvente ciclohexano. Os animais foram divididos em dois grupos A e B, ambos com três animais cada, o grupo A recebeu uma dose do extrato hexânico (2000mg/kg) e o grupo B recebeu uma dose de DMSO 10% e PBS, sendo esse o grupo controle. Após o 14º dia da administração, os animais foram eutanasiados. Os órgãos dos animais foram retirados e fixados em formaldeído a 10% neutro tamponado, por um período de 24 horas, para serem submetidos ao processo histológico, em seguida os dados foram tabulados e analisados. Na análise histopatológica foram observadas algumas alterações significativas em todos os órgãos analisados dos animais tratados quando comparados ao grupo controle. As alterações histológicas observadas nos órgãos dos camundongos sugerem uma ação tóxica da planta sobre o modelo experimental estudado.

**Palavras-chave:** Biomas. Extratos. Planta. Produtos naturais. Toxicidade.

### Introdução

A caatinga constitui um bioma exclusivamente brasileiro, de modo que sua área principal localiza-se na região Nordeste, possuindo também um pequeno trecho no Sudeste do país. Quanto a sua nomenclatura oficial, classifica-se como Savana Estépica. A caatinga apresenta uma ampla diversidade de táxons, as quais incluem um número significativo de espécies raras e endêmicas (SILVA et al., 2003; FORZZA et al., 2015).

Segundo Forzza et al. (2012), a caatinga possui um total de 4.322 espécies de plantas com sementes, sendo 744 endêmicas (o que equivale a 17,2% do total de táxons registrados). Este reservatório de biodiversidade pode ser caracterizado como vegetação arbustivo-arbórea, constituída por folhas caducas no verão, provido de espinhos, com cactáceas e bromeliáceo. Estes atributos permitem a sobrevivência das espécies em condições edafoclimáticas do semiárido nordestino (ANDRADE-LIMA, 1981).

(83) 3322.3222

[contato@conbracis.com.br](mailto:contato@conbracis.com.br)

[www.conbracis.com.br](http://www.conbracis.com.br)

Dentre as espécies da caatinga, com importantes atividades biológicas, a *Pityrocarpa moniliformis*, possui atividade antioxidante e fotoprotetora natural, com potencial capacidade de combater o estresse oxidativo (BALOGH et al., 2011). A *P. moniliformis* pertence à família Fabaceae, a qual corresponde a terceira maior família das angiospermas e uma das maiores dentre as dicotiledôneas. É uma espécie comumente encontrada no Vale do Rio São Francisco, região que margeia o rio São Francisco nos estados de Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (BENEDITO, 2011).

De acordo com Benedito (2011), esta espécie é popularmente conhecida como “angico de bezerro”, “catanduva”, “quipembe” no estado de PE, “surucucu” no estado da BA e “carrasco” no estado do PA. É largamente utilizada no fornecimento de madeira, lenha e carvão.

É considerada uma espécie rústica, de crescimento rápido, indicada para reflorestamentos heterogêneos com finalidades preservacionistas e indicada como forragem para bovinos e ovinos (AZEREDO e colaboradores, 2010). Além disso, é muito útil para a apicultura na região Nordeste do Brasil, uma vez que, a apicultura tem como fonte as flores de plantas nativas e esta espécie é evidenciada como planta melífera em potencial. Suas flores são apreciadas pelas abelhas, garantindo um mel de excelente qualidade (SILVA et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estudos evidenciaram que aproximadamente 80% da população mundial utilizou ou utiliza algum extrato natural para tratar agravos à saúde. Contudo, geralmente o uso de plantas medicinais é mediante o conhecimento empírico sem o acesso a informações científicas de seus possíveis efeitos tóxicos e reações adversas (BRASIL, 2006 a e b).

Isto torna-se um fator preocupante, pois, mesmo sendo muito utilizadas, ainda não se tem o conhecimento sobre a ação de todas as plantas medicinais no organismo bem como seu potencial tóxico. E levando em consideração a *P. moniliformes*, apesar de apresentar atividades biológicas relevantes, são necessários estudos que confirmem segurança quanto à utilização dessa planta, ou seja, faz-se necessário conhecer a toxicidade desta espécie. Desse modo, o presente estudo teve com objetivo realizar a avaliação histopatológica do rim, fígado e baço de camundongos expostos por via oral ao extrato de *P. moniliformes*.

Folhas de *P. moniliformes* foram coletadas no Parque Nacional do Catimá, em Buíque, Pernambuco, e uma exsicata da espécie foi encaminhada para Herbário IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco), para identificação. As folhas foram submetidas à secagem na estufa de circulação de ar forçado (40-45°C), durante três dias, posteriormente foram trituradas em moinho. Após a trituração o material foi pesado e submetido à extração em extrator automático ASE 350 Dionex, utilizando o solvente ciclohexano, sob temperatura de 40°C durante 15 minutos sob pressão de  $\pm 1500$  psi e fluxo de solvente de 5mL/min. Em seguida o extrato foi filtrado, e permaneceu a temperatura ambiente para secagem completa do solvente, após esse processo foram armazenados em vidro âmbar na temperatura ambiente. Para uso de animais, o experimento teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) (Protocolo nº 23076.052055/2014-21).

Foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 38-50 g. Antes dos testes, os camundongos foram aclimatados por 7 dias em condições controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  de umidade e fotoperíodo de 12h claro/escuro), receberam ração e água ad libitum, no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco em caixas de polipropileno adequadas. Após o período de aclimação, foram agrupados randomicamente e identificados como grupos controle e teste.

Para a avaliação histopatológica dos órgãos os animais foram submetidos por via oral ao extrato orgânico de *P. moniliformes* na dose limite de 2000mg/kg de acordo com a diretriz nº423 da OECD/OCDE (OECD, 2001). Os camundongos foram distribuídos igualmente em e grupos (n=3). O grupo controle negativo recebeu DMSO 10% e PBS, veículo no qual os extratos foram diluídos, o grupo teste recebeu o extrato.

Após o 14º da administração, os animais foram eutanasiados e realizou-se à retirada do fígado, rim e baço para análise histológica. Após a coleta, os órgãos foram clivados e separados em potes contendo uma solução de formol a 10 % neutro tamponado (NBF), pelo período de 48 horas. Após esse intervalo de tempo, os órgãos foram submetidos ao processador automático de tecidos (histotécnico) para serem incluídos posteriormente na parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4 $\mu\text{m}$ . Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas contendo albumina e mantidos em estufa regulada à temperatura de 60°C, por 24 horas para secagem. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.).

As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3000) acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 20 campos por lâmina com aumento final de 100 a 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImagJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

A análise estatística e os desvios (SD) para os órgãos foram realizados usando SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Os dados foram expressos como média  $\pm$  SD. Diferenças significativas foram estabelecidas pelo teste de Mann-Whitney em 5% ( $P < 0,05$ ) e comparadas com o controle negativo.

## Resultados e Discussão

A análise histopatológica do fígado, rim e baço de camundongos expostos por via oral ao extrato hexânico de *P. moniliformes* estão apresentadas na Tabela 1, 2 e 3.

Tabela 1. Análise histopatológica do fígado de camundongos expostos aos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformes*.

Grupos	Fígado	
	Hepatócito	Célula de Kupffer
Extrato Hexânico	30,28 $\pm$ 7,00	18,23 $\pm$ 5,11*
Controle negativo	28,75 $\pm$ 7,9	14,75 $\pm$ 4,86

\*Diferença estatisticamente significante por teste de Mann-Whitney em 5% ( $P < 0,05$ ) comparado com o controle negativo. Dados expressos como Média  $\pm$  DP. (n= 3 animais em cada grupo).

Tabela 2. Análise histopatológica do rim de camundongos expostos aos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformes*.

Grupos	Rim	
	Corpúsculo	Glomérulo
<b>Extrato Hexânico</b>	3507,4±1474,5*	2617,2±1186,5*
<b>Controle negativo</b>	4315,2±1500,0	2961,0±1115,9

\*Diferença estatisticamente significante por teste de Mann-Whitney em 5% ( $P < 0,05$ ) comparado com o controle negativo. Dados expressos como Média ± DP. (n= 3 animais em cada grupo).

Tabela 3. Análise histopatológica do baço de camundongos expostos aos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformes*.

Grupos	Baço		
	Estroma	Polpa vermelha	Polpa branca
<b>Extrato Hexânico</b>	3,86±1,62	43,63±11,50	52,50±10,91*
<b>Controle negativo</b>	3,21±2,22	38,69±14,58	58,09±14,08

\*Diferença estatisticamente significante por teste de Mann-Whitney em 5% ( $P < 0,05$ ) comparado com o controle negativo. Dados expressos como Média ± DP. (n= 3 animais em cada grupo).

O extrato hexânico apresentou um aumento das células de Kupffer, o que pode indicar processos inflamatórios e danos hepáticos. Essas células são de grande importância por desempenharem um papel na manutenção da função hepática em condições patológicas e fisiológicas, atuando principalmente na fagocitose de partículas estranhas (ARI; IMANURA, 2010). Além disso, as células de Kupffer removem substâncias prejudiciais e modulam a resposta imune, desempenhando ampla ação na resposta inflamatória. A ativação celular dos processos inflamatórios pode estar associada a sinais morfológicos de ativação e ao aumento da população celular e liberam substâncias biologicamente ativas como as citocinas, que promovem o processo patológico após sua ativação (EGUCHI et al., 1991; TSUTSUI; NISHIGUCHI, 2014). Sendo assim, esse aumento do

número de células de Kupffer pode estar envolvido na patogênese de alguma lesão hepática, devido à exposição a toxinas, produtos químicos e agentes farmacológicos (LUCKEY; PETERSEN 2001, ITO et al., 2003, ONO et al., 2004, KOLIOS et al., 2006).

Alterações significativas nas análises histopatológica dos rins foram observadas, ocorrendo diminuição das áreas do corpúsculo e glomérulo renal o que pode indicar deficiência na taxa de filtração. O glomérulo é o local inicial da exposição de substâncias químicas dentro do néfron o que pode acarretar em uma série de lesões neste local. Em certos casos, as substâncias podem alterar a permeabilidade glomerular e as proteínas, alterando o tamanho e a carga e conseqüentemente modificam suas funções (KLAASSEN, 2008).

Em relação ao baço, os dados apresentados na tabela 1 mostraram que houve uma diminuição significativa para a polpa branca no grupo teste quando comparado ao grupo controle. O baço está intimamente relacionado com a defesa do organismo, e especificamente a polpa branca que abriga os linfócitos T, fazendo parte do sistema de defesa. (TORRES et al., 2000; CHRISTOPHER, 2003; AGUIAR et al., 2008).

Diversos estudos da avaliação histopatológica dos mesmos órgãos avaliados no presente estudo são encontrados comumente na literatura, demonstrando a importância de avaliar a toxicidade de extratos de plantas, que são utilizados muitas vezes pela população para tratamento de doenças sem o devido conhecimento toxicológico das espécies (SANTANA et al., 2015).

As análises histológicas realizadas com extratos de origem vegetal revelaram que o órgão mais envolvido com o processo de toxicidade é o fígado, ocasionando muitas vezes alterações nos hepatócitos, focos de infiltrado inflamatório, hemorragia e aumento da presença de mitose. Vale ressaltar ainda que essas alterações podem variar entre leve, moderada e severa dependendo do tipo e da concentração da substância avaliada, para a dose utilizada no estudo, a toxicidade classifica-se como moderada (MARTINS et al, 2009).

## **Conclusões**

Pode-se concluir, que o extrato *P. moniliformes* na dose 2000mg/kg apresenta uma moderada toxicidade frente aos órgãos dos camundongos Swiss analisados. Ainda assim, ensaios adicionais de toxicidade sub-aguda e crônica são necessários, a fim de, garantir que a planta confere baixo risco ao ambiente, animais domésticos e o homem.

## Agradecimentos

Os autores expressam agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco- FACEPE pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho

## Referências

AGUIAR, G.L.M.; BARRETO, J.H.P.M.; MORAIS, L.R.; DA SILVA FILHO, A.R. Anatomic Study of the Splenic Artery Segmentation. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 35, n.5, p.311-314, 2008.

ANDRADE-LIMA, D. The Caatingas Dominion. **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, p.149-163, 1981.

ARII, S., IMAMURA, M. Physiological Role of Sinusoidal Endothelial Cells and Kupffer Cells and their Implication in the Pathogenesis of Liver Injury. **J. Hepato-biliary Pancreat. Surg.**, v.7, p. 40-48, 2010.

AZEREDO, G. A.; PAULA, R.C.; VALERI, S.V.; MORO, F.V. Superação de Dormência de Sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p.49-58, 2010.

BALOGH, T. S.et al. Ultraviolet radiation Protection: Current Available Resources  
BENEDITO, P. C.; RIBEIRO, M.C.C.; TORRES, S.B.; CAMACHO, R.G.V.; SOARES, A.N.R.; GUIMARÃES, L.M.S. Armazenamento de Sementes de Catanduva (*Piptadenia moniliformis* Benth.) em Diferentes Ambientes e Embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n.1, p.28-37, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 148p, 2006a.  
BRASIL. **Portaria nº-971** de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2006b.

CHRISTOPHER, M.M. Cytology of the Spleen. **Vet. Clin. Small Anim. Pract.**, v.33, n.1, p.135-152, 2003.

EGUCHI, H., MCCUSKEY, P. A., MCCUSKEY, R. S. Kupffer cell Activity and Hepatic Microvascular Events after acute Ethanol Ingestion in Mice. **Hepatology**, v.13, p.751-757, 1991.

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

[www.conbracis.com.br](http://www.conbracis.com.br)

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CANHOS, D.A.L.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.; COELHO, M.A.N.; COSTA, A.F.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.G.; LOHMANN, P.M.L.L.G.; LUGHADHA, E.N.; MAIA, L.C.; MARTILNELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D.C. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v.62, n.1, 2012.

FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R.B.; VERSIEUX, L. **Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Acesso em 08 de maio de 2018. in Photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, p.732-742, 2011.

KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7 th. McGraw-Hill, p.1309, 2008.

KOLIOS, G., VALATAS, V., KOUROUMALIS, E. **Role of Kupffer Cells in the Pathogenesis of Liver Disease**. *World J. Gastroentero.*, v.12, n.46, p.7413-7420, 2006.  
LUCKEY, S. W., PETERSEN, D. R. Activation of Kupffer Cells during the Course of Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury and Fibrosis in Rats. **Exp. Mol. Pathol.**, v.71, n.3, p.226-240, 2001.

MARTINS, V.G. **Avaliação da toxicidade de substâncias antivirais derivadas de Algas Marinhas e substâncias sintéticas em camundongos BALB/c**.2009. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia), Universidade Federal Fluminense de Niterói, Rio de Janeiro, 2009.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. 2001. **Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris, p.14, 2001.

ONO, M., YU, B., HARDISON, E. G., MASTRANGELO, M. A. A., TWEARDY, D. J. Increased Susceptibility to Liver Injury after Hemorrhagic Shock in Rats Chronically fed Ethanol: Role of Nuclear Factor- $\kappa$ B, Interleukin-6, and Franulocyte Colony-stimulating Factor. **Shock**, v.21, n.6, p.519-525, 2004.

SANTANA, M. A. N, SILVA, I. B, BARBOSA, J.A P., LIMA, I. R. VIEIRA, J. R. C., LIMA, LEITE, R. M.P, LEITE, S. P. L. Histomorphometric Analysis in Kidney Tissue of Mice Treated with Indigofera Suffruticosa Mill. **Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.9, p.505-506, 2015.



SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da Caatinga: Áreas e Ações Prioritárias para a Conservação**. EMBRAPA Semi-Árido. Brasília, 2003.

TORRES, O.J.M.; MACEDO, E.L.; PICCIANI, E.R.G.; NUNES, P.M.S.; COSTA, J.V.G.; CARVALHO, A.B.; LOBATO JÚNIOR, P.S. Estudo Histológico da Regeneração Esplênica de Ratos Submetidos a Esplenectomia Subtotal. **Acta Cir. Bras.**, v.15, n.2, p.1-12, 2000.

TSUTSUI, H., NISHIGUCHI, S. Importance of Kupffer Cells in the Development of Acute liver Injuries in Mice. **Int. J. Mol. Sci.**, v.15, n.5, p.7711-7730, 2014.