

## APRESENTAÇÃO ORAL - CATEGORIA DOUTORADO

### EFETOS CRÔNICOS DO USO DE SEMENTES DE *SENNA OCCIDENTALIS* SOBRE O TECIDO HEMATOPOIÉTICO DE RATOS

TELES, AVFF<sup>1</sup>; FOCK, RA<sup>2</sup>; GÓRNIAC SL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Química Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil

**Introdução:** *S. occidentalis* é uma planta leguminosa nativa da América do Sul, mas também pode ser encontrada em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (Tokarnia et al., 2000), como por exemplo, na Europa, Austrália, sul e leste dos Estados Unidos, África Oriental e Índia. Todas as partes da planta são tóxicas, mas a maior toxicidade da planta é encontrada nas suas sementes. Apesar da toxicidade, a *S. occidentalis* é amplamente utilizada para fins terapêuticos em seres humanos. Embora alguns defendam que a utilização de *S. occidentalis* é segura para os seres humanos (Bin-Hafeez et al., 2001), a perda de fluidos, hipocalcemia e diarreia estão bem documentadas com o uso desta planta (Spiller et al., 2003). Outros efeitos secundários observados em seres humanos incluem a hepatite e as reações alérgicas associadas com o uso excessivo de sementes de *S. occidentalis* (Beuers et al., 1991; Marks et al., 1991; Helin e Makinen-Kiljunen, 1996; Spiller et al., 2003; Seybold et al., 2004; Vanderperren et al., 2005). Dor abdominal, atividade intestinal excessiva e assaduras também foram relatadas (Spiller et al., 2003). Além disso, estudos toxicológicos revelaram alguns efeitos prejudiciais potentes a partir do uso de sementes de *S. occidentalis* em diferentes espécies animais, tais como miototoxicidade (Haraguchi et al., 1998; Furlan et al., 2014), hepatotoxicidade (Tasaka et al., 2000; Soyuncu et al., 2008) e neurotoxicidade (Barbosa-Ferreira et al., 2005). Embora a toxicidade da *S. occidentalis* tenha sido bem descrita em vários tecidos, não há relatos de seu efeito sobre o sistema hematopoiético. O tecido hematopoiético apresenta alta capacidade proliferativa e, por conseguinte, pode ser alvo de ação tóxica de várias substâncias, incluindo a *S. occidentalis*. **Objetivo:** Investigar, pela primeira vez, os efeitos da administração crônica de sementes *S. occidentalis* em órgãos hematopoiéticos de ratos, incluindo a medula óssea e baço. **Métodos:** Cinquenta ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos de 10 animais: controle negativo, os quais receberam apenas ração comercial; três grupos experimentais, tratados, respectivamente, com 0,5% (So0.5), 1% (So1) e 2% (So2) de sementes de *S. occidentalis* na ração por 90 dias. Além destes grupos, também foi incluído o grupo Pair-fed (PF), em que os animais receberam a mesma quantidade de ração consumida pelos animais tratados com 2% de *S. occidentalis*, porém, isentas de sementes da planta. Para tanto, iniciou-se a administração ao grupo So2 vinte e quatro horas antes do grupo PF. Este procedimento permitiu o cálculo da média da quantidade de ração consumida pelos animais do grupo experimental So2; a quantidade obtida por intermédio deste cálculo foi administrada aos animais do grupo PF. Foram utilizadas sementes de *S. occidentalis* do Instituto Biológico de São Paulo. Após a coleta, as sementes foram alojadas em local seco até o momento de serem moídas e adicionadas à ração. Devido à possibilidade de inativação dos princípios ativos pelo aquecimento e, conseqüentemente, perda da toxicidade das sementes quando da trituração em moinhos de facas, foi realizado o procedimento a frio. Assim, as sementes de *S. occidentalis* foram separadas dos cotilédones, congeladas em nitrogênio líquido, trituradas em liquidificador comercial e incorporadas à ração. Foram adicionadas diferentes concentrações de sementes (0,5%, 1% e 2%) a ração, sendo esta mistura homogeneizada em misturador e, imediatamente, peletizada. Os ratos receberam, pela via oral, veiculadas na ração, diferentes concentrações de *S. occidentalis* e foram observados por 90

dias para detecção de possíveis alterações físicas e ocorrência de morte. O grupo controle recebeu água e ração pela mesma via e período. Ao término de 90 dias de administração das sementes de *S. occidentalis*, todos os animais foram profundamente anestesiados com uma solução de cetamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg) por injeção intraperitoneal. Após a anestesia e eutanásia, a medula óssea e baço foram coletados para a determinação da celularidade. As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral dos animais, após a lavagem da mesma com 5 mL de solução gelada de meio RPMI. E, os esplenócitos foram obtidos a partir de um fragmento do baço de peso conhecido. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas em hemocítmetro, utilizando o corante Tripán Blue diluído 6x em PBS. A partir das amostras de suspensão total de células da medula óssea obtidas conforme descrito anteriormente, foram preparadas lâminas de citocentrifugado e coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado para avaliação do mielograma. A classificação das células da linhagem granulocítica foi baseada na relação núcleo-citoplasma; na afinidade tintorial do citoplasma; na presença ou não de granulações primária ou secundária no citoplasma; no padrão de cromatina nuclear; na presença ou não de nucléolos; no diâmetro e segmentação ou não do nucléolo. Na série granulocítica, foram considerada quatro etapas maturativas: (I) blastos, envolvendo o hemocitoblasto e o mieloblasto; (II) formas jovens, englobando o promielócito e o mielócito; (III) formas em anel, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; (IV) segmentados, envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares. Os precursores eritróides foram classificados em: (I) eritroblastos jovens, envolvendo os proeritroblastos e eritroblastos basófilos; (II) eritroblastos policromáticos, englobando todas as etapas em que as células apresentaram cromatina condensada e citoplasma policromático; (III) eritroblastos ortocromáticos, incluindo células com núcleo de cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico. As células da linhagem linfocitária, envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos. Os promonócitos, monócitos e macrófagos foram reunidos em um grupo de células denominadas monomacrófágicas. Também foram avaliadas as células da linhagem megacariocítica. Após análise do mielograma foi importante estabelecer a razão Mielóide/Eritróide (M/E). Esta razão foi obtida por meio do cálculo do total de precursores mielóides em proporção ao total de precursores eritróides. Um índice igual a um determina que ambas as populações sejam iguais em números; índices acima indicam uma predominância das células mielóides enquanto que valores inferiores indicam que as células eritróides são mais numerosas. Após a eutanásia dos animais pertencentes aos diferentes tratamentos, foram realizados os procedimentos: hemograma completo; avaliação macroscópica de possíveis lesões e a coleta de órgãos para análise histológica. Dentre estes órgãos, foram coletados o baço e medula óssea para avaliação de possíveis lesões microscópicas a partir de cortes histológicos corados por Hematoxilina-eosina. A avaliação dos estoques de ferro nos órgãos foi realizada com o emprego da Reação de Perls.

Todos os resultados obtidos foram analisados com o emprego do programa Graph Pad Prism 5. Os resultados foram, primeiramente, submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos e não paramétricos. Em seguida, foi utilizado o teste One-way Anova seguido do teste de Dunnett para comparação entre os grupos controle, tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração e grupo PF. O nível de significância adotado foi de 0,05. Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com a Comissão de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório de Recursos da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (n° 152 / FMVZ / 2012 - 2692/2012 projeto).

**Resultados e Discussão:** A hematotoxicidade pode ser manifestada pela alteração do número de células maduras no sangue ou na medula óssea e, pode ser expressa pela destruição excessiva ou supressão da produção de

células do tecido hematopoiético (SHEN et al, 2005). O presente trabalho mostrou que os ratos submetidos a diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração apresentaram diminuição no número de leucócitos totais bem como alterações nos parâmetros referentes a série vermelha, tais como diminuição do VCM e HCM, caracterizando uma anemia microcítica hipocrômica. Os valores do hemograma corroboram as alterações observadas no mielograma destes animais, uma vez que foi constatada a redução significativa da relação M/E e, portanto, um possível efeito tóxico da *S. occidentalis* sobre a medula óssea durante o tratamento crônico de 90 dias. A redução significativa da relação M/E nos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ocorreu devido ao aumento progressivo de eritroblastos jovens e policromáticos na medula óssea. Índices baixos da relação M/E podem estar associados a uma anemia regenerativa em função de hemólise extravascular ou, ainda, à eritropoiese ineficaz. A partir do mielograma foi observada a redução significativa de células blásticas e de todos os tipos celulares, especialmente, da linhagem granulocítica, com predomínio da linhagem linfocitária. No entanto, uma vez que os linfócitos estão, continuamente, recirculando, o seu aumento ou diminuição não reflete, necessariamente, alteração na linfopoiese.

A análise diagnóstica da medula óssea compreende, classicamente, a citologia. Mais recentemente, tornou-se rotina o estudo histológico. Desde o início do projeto, estes dados foram integrados, pois, enquanto a citologia fornece uma análise mais detalhada das características das células e permite a sua quantificação, a biópsia, analisar o tecido como um todo e permite o estudo da estrutura do tecido hematopoiético. A análise anatomopatológica da medula óssea de animais dos grupos experimentais indicou a existência de um aumento progressivo da celularidade, caracterizando hiperplasia medular. Estes resultados se correlacionam aos dados do mielograma.

Na anemia regenerativa foi observada diminuição da sobrevivência das hemácias na circulação, resultante de hemólise extravascular realizada por macrófagos, especialmente, do tecido esplênico. Assim, o tratamento crônico com *S. occidentalis* poderia estar associado ao processo hemolítico, haja vista a observação de aumento de hemossiderina no baço de animais tratados com esta planta. O tratamento crônico com *S. occidentalis* também promoveu a redução significativa na celularidade do baço bem como alterações anatomopatológicas, incluindo espessamento de cápsula e rarefação celular.

Na avaliação dos estoques de ferro medular efetuada com a Reação de Perls foi constatada uma redução no score de ferro dos animais tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração quando comparados aos respectivos controles. A redução observada de grânulos de ferro na medula óssea poderia estar associada a um distúrbio de reutilização deste mineral. Estes dados confirmam os resultados obtidos na análise morfométrica do baço destes animais, haja vista a constatação de um aumento de depósito de ferro, na forma de pigmentos de hemossiderina, em amostras esplênicas dos ratos tratados com *S. occidentalis* na ração por 90 dias. **Conclusão:** A administração a longo prazo de sementes de *S. occidentalis* pode promover hematotoxicidade.

**Palavras-chave:** *Senna occidentalis*; hematotoxicidade; medula óssea; hiperplasia eritróide, ratos.

## Referências

- 1 TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000.
- 2 BIN-HAFEEZ, B. et al. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 75, n. 1, p. 13-18, Apr. 2001.
- 3 SPILLER, H. A. et al. Skin breakdown and blisters from senna-containing laxatives in young children. **Ann. Pharmacother.**, v. 37, n. 5, p. 636-39, May 2003.
- 4 BEUERS U.; SPENGLER, U.; PAPE, G. R. Hepatitis after chronic abuse of senna. **Lancet**, London, v. 337, n. 8737, 372-373, Feb. 1991.
- 5 MARKS, G. B.; SALOME, C. M.; WOOLCOCK, A. J. Asthma and allergy associated with occupational exposure to ispaghula and senna products in a pharmaceutical work force. **Am. Rev. Respir. Dis.**, Baltimore, v. 144, n. 5, p. 1065-1069, Nov. 1991.

- 6 HELIN, T.; MAKINEN-KILJUNEN, S. Occupational asthma and rhino conjunctivitis caused by senna. **Allergy**, v. 51, n. 3, p. 181-184, Mar. 1996.
- 7 SEYBOLD, U. et al. Senna-induced hepatitis in a poor metabolizer. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 141, n. 8, p. 650-651, Oct. 2004.
- 8 VANDERPERREN, B. et al. Acute liver failure with renal impairment related to the abuse of senna anthraquinone glycosides. **Ann. Pharmacother.**, Cincinnati, v. 39, n. 7-8, p. 1353-57, July-Aug. 2005.
- 9 HARAGUCHI, M. et al. Muscle atrophy induced in broiler chicks by parts of *Senna occidentalis* seeds. **Vet. Res. Commun.**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 265-271, June 1998.
- 10 FURLAN, F. H. et al. Toxic myopathy and acute hepatic necrosis in cattle caused by ingestion of *Senna obtusifolia* (sicklepod; coffeesenna) in Brazil. **Toxicol.**, Oxford, v. 92, p. 24-30, Dec. 2014.
- 11 TASAKA, A. C. et al. Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. **Vet. Res. Commun.**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 573-580, Dec. 2000.
- 12 SOYUNCU, S.; CETE, Y.; NOKAY, A. E. Portal vein thrombosis related to *Cassia angustifolia*. **Clin. Toxicol. (Phila)**, Philadelphia, v. 46, n. 8, p. 774-777, Sept. 2008.
- 13 BARBOSA-FERREIRA, M. et al. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 497-503, Apr. 2005.
- 14 SHEN, S. G. et al. The distribution patterns of trace elements in the blood and organs in a rabbit experimental model of copper pollution and study of haematology and biochemistry parameters. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 19, n. 2, p. 379-384, Feb. 2005.

## PROJETO EM ANDAMENTO: AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ANTI E PRÓ-APOPTÓTICAS EM CULTURA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS EXPOSTOS À COCAÍNA, AEME E ASSOCIAÇÃO: RESULTADOS PRELIMINARES

UDO, MARIANA SAYURI BERTO<sup>1</sup>; SILVA, MARIANA AGUILERA ALENCAR<sup>1</sup>; DURO, STEPHANIE OLIVEIRA<sup>1</sup>; DAL'JOVEM, LEANDRO FERREIRA<sup>2</sup>; GARCIA, RAPHAEL CAIO TAMBORELI<sup>3</sup>; MARCOURAKIS, TANIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Ciências do Meio Ambiente, Química e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil.

**Introdução:** A cocaína é uma das substâncias com alto poder de adição utilizada, nos dias de hoje pela sociedade que pode causar desejo, busca e uso compulsivo e abusivo, mesmo diante de consequências negativas [1]. O número de usuários de cocaína na forma de crack vem crescendo e a escolha por essa forma decorre do baixo custo, facilidade de administração e da velocidade e intensidade com que os efeitos aparecem [2]. O uso dessa substância está associado ao prejuízo das habilidades de atenção, memória e funções executivas, dificuldades em tomadas de decisão, abstração e planejamento, possivelmente associadas ao alto índice de recaídas e baixa adesão ao tratamento por parte desses pacientes [3]. É sabido que o hipocampo é uma das principais estruturas envolvidas com os processos de memória e aprendizagem e que os diferentes tipos celulares dessa região são altamente vulneráveis à injúrias, dessa forma, morte celular nessa área cerebral pode comprometer essas habilidades cognitivas [4]. Os usuários de crack estão expostos não somente à cocaína volatilizada, mas também à AEME, principal produto de pirólise da cocaína, assim, Garcia et al. [5], examinando os neurônios hipocampais mostraram que tanto a cocaína, quanto o AEME e a associação de ambas são passíveis de reduzir a viabilidade celular a partir de 12h. Dessa forma, o presente trabalho investigou a via de ativação das mortes celulares nesse tipo de exposição.

**Material e Métodos:** Neurônios hipocampais, obtidos de fetos de ratos no 18º dia de gestação, foram cultivados (1,8 x 10<sup>6</sup> célula/poço) por sete dias à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio neurobasal acrescido de 50µM glutamina + 25µM glutamato + 1% de penicilina:estreptomicina (10.000U : 10.000µg/mL) + 2% de suplemento b27 (Gibco). No sétimo dia de cultivo, as células foram expostas à 2mM de cocaína (Coc), 1mM de AEME (A) ou à associação de ambas por 3 e 6h. Dez mM de glutamato (Glu) foram utilizados como controle