

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MARIANA SILVESTRE VELOSO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DA *Aristolochia*
cymbifera Mart. & Zucc. EM RATO

Uberlândia (MG)

2019

MARIANA SILVESTRE VELOSO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DA *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc. EM RATO

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Área de Concentração:

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Coorientadora: MSc. Tária Gonçalves do Carmo Oliveira

Uberlândia (MG)
2019

AGRADECIMENTOS

À minha família por me proporcionar a oportunidade de seguir meus sonhos independentes de quais sejam e no meu tempo.

Aos meus amigos, por me ouvirem e ajudarem nas horas que quase deixei tudo de lado.

A todos os professores e seus conselhos durante minha vida toda que me ajudaram a chegar até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Graciele Zanon, pela oportunidade, pelos momentos de reflexão e paciência durante todo meu tempo no Laboratório.

A todos os companheiros do Laboratório de Morfologia e Cultura Celular-LAMOC, pelo companheirismo e aprendizado ao longo desses anos.

Não somos perfeitos, nunca seremos e o que fazemos reflete isso, por isso no caminho teremos erros atrás de erros, falhas atrás de falhas, decepções atrás de decepções, porém sem cada um deles não chegaríamos aonde chegamos e não evoluiríamos ao que somos hoje. O ditado “melhor feito que perfeito” diz mais que imaginei.

Através deste trabalho, concluo uma graduação mais longa que o previsto, porém um tempo essencial para meu crescimento pessoal!

Finalizo com o pesar do fim desse ciclo maravilhoso e eufórica de perceber que ainda tenho muito que aprender e a incerteza do amanhã.

Obrigada mais uma vez a todos.

RESUMO

Em *Aristolochia cymbifera* é uma planta do cerrado usada para diversas enfermidades e, numa pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, demonstrou um importante efeito neuroprotetor. Nosso grupo de pesquisa resolveu testar o extrato bruto dessa planta na regeneração nervosa periférica. Entretanto, essa espécie contém substâncias sabidamente tóxicas ao organismo conhecidas como ácidos aristolóquios. Esse trabalho propôs investigar a toxicidade do extrato bruto etanólico da *A. cymbifera* em células neurais e também analisar histopatologicamente órgãos importantes no processo de desintoxicação e eliminação de agentes nocivos como rim e fígado. Ainda, analisar o possível comprometimento tecidual do próprio tecido nervoso, nesse caso, da medula espinhal. Pretendemos responder se o uso medicinal do extrato bruto etanólico da *A. cymbifera* pode ser considerado seguro. Os resultados deste estudo evidenciaram morte celular de astrócitos apenas em overdose de extrato bruto etanólico da *A. cymbifera*, e, também não foi detectado qualquer dano aos tecidos analisados que comprovasse alguma toxicidade em rim e fígado no uso do extrato da planta via oral pelo período de dois meses.

Palavras-chave: Ácido aristolóquico. Neuroproteção. Tóxico. Planta medicinal.

ABSTRACT

In *Aristolochia cymbifera* it is a cerrado plant used for several diseases and, in a research from the Federal University of Uberlândia, demonstrated an important neuroprotective effect. Our research group decided to test the raw extract of this plant in the peripheral nervous regeneration. However, this species contains substances known to be toxic to the body known as arylocutic acids. The aim of this study was to investigate the toxicity of the crude ethanolic extract of *A. cymbifera* in neural cells and also to analyze histopathologically important organs in the process of detoxification and elimination of harmful agents such as kidney and liver. Also, to analyze the possible tissue involvement of the nervous tissue itself, in this case, the spinal cord. We intend to answer whether the medicinal use of the crude ethanolic extract of *A. cymbifera* can be considered safe. The results of this study evidenced astrocyte cell death only in an overdose of *A. cymbifera* crude ethanolic extract, and also no damage was detected in the tissues analyzed that showed some toxicity in the kidney and liver in the use of the oral extract of the plant for the period of two months.

Keywords: Aristolochic acid. Neuroprotection. Toxic. Medicinal plant.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1	Um pouco da história do uso medicinal de plantas.....	7
2.2	<i>Aristolochia cymbifera</i> (<i>A. cymbifera</i>).....	7
2.3	Extrato da <i>A. cymbifera</i>	8
2.4	Astrócitos.....	9
2.5	Medula espinhal, rim e fígado.....	9
3	OBJETIVOS.....	11
3.1	Objetivo geral.....	11
3.2	Objetivos específicos.....	11
4	MATERIAIS E METODOS.....	12
4.1	Confecção do extrato bruto etanólico (EBE) da <i>A. cymbifera</i>	12
4.2	Estudo <i>in vivo</i>	12
4.3	Estudo <i>in vitro</i>	13
5	RESULTADOS.....	15
5.1	O extrato alcoólico de <i>A. cymbifera</i> não foi nefrotóxico, hepatotóxico ou neurotóxico.....	15
5.2	Somente a overdose de <i>A. cymbifera</i> foi tóxica às culturas de astrócitos.....	17
6	DISCUSSÃO.....	18
7	CONCLUSÃO.....	20
	REFERÊNCIAS.....	21
	ANEXO A - CERTIFICADO DO CEUA.....	23
	ANEXO B - Laudo histopatológico.....	24

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa aqui descrita foi parte de um trabalho desenvolvido no laboratório de Morfologia e Cultura Celular (LAMOC) cujo objetivo foi estudar os efeitos do extrato etanólico bruto de *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc (EBE) por ingestão via oral na regeneração nervosa em ratos que tiveram seu nervo ciático seccionado e tubulinizado, durante 60 dias. Uma etapa importante desse trabalho foi a verificação de que esse extrato não fosse tóxico ao organismo. Nesse contexto, a pesquisa aqui apresentada analisou possíveis efeitos tóxicos da ingestão do EBE ao rim, fígado, medula espinhal e em cultura de astrócitos. A intenção da utilização da *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc como meio terapêutico necessitou essa análise, já que independente dos resultados obtidos, deve-se garantir a segurança de uso sem grandes efeitos colaterais.

Pesquisas recentes apontaram o efeito de proteção nervosa encontrado no extrato de *Aristolochia cymbifera* (ANDRADE, 2015; MELO, 2016). Porém na literatura científica encontramos também evidências de toxicidade causada pelo ácido aristolóquico presente na família Aristolochiaceae, a qual ela pertence (KELLY; GONZÁLEZ, 2003), achamos de grande valia observar se esses efeitos negativos estarão presentes no rim e fígado que são órgãos de destaque na desintoxicação de substâncias nocivas, além disso, a literatura manifesta efeitos nefrotóxicos para plantas dessa família (LEITÃO; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON; ROSTETTMANN, 2003; ZHOU et al., 2004; PACHECO et al., 2010; KOHARA et al., 2002). A medula espinhal coletada e analisada foi utilizada para representar os efeitos do EBE nos tecidos do sistema nervoso central (SNC) e a cultura primária de astrócitos obtida a partir de neonatos de ratos Wistar, os efeitos nas células neurais, importantes para manutenção e desintoxicação do SNC (DRINGEN, 2015; GUYTON et al., 2011; KANDEL et al., 2013; LEE & MACLEAN, 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Um pouco da história do uso medicinal de plantas

As plantas medicinais estão presentes na história humana desde os povos mais primitivos onde quem obtinha o conhecimento sobre elas e as estudava eram curandeiros, magos e bruxas. Elas foram por muito tempo o único recurso de cura e tratamento para doenças da época (DI STASI, 1996). Seu uso mais comum e popular é pelo chá feito com o fragmento da planta que possui a substância curativa (DI STASI, 1996). Com a introdução do positivismo e do pensamento racional na ciência, o conhecimento dos curandeiros, magos e bruxas caíram em descrédito e novas pesquisas sobre as plantas medicinais começaram a ser feitas por cientistas que, na época, eram vistos como detentores da verdade. Na atualidade o estudo com plantas medicinais tem demonstrado resultados importantes e, cada vez, possui mais pesquisadores interessados nessa área. No Brasil, possuímos uma quantidade de material imensa para estudar e conhecer efetivamente seus efeitos em relação ao tratamento de doenças, e nesse sentido, temos sempre como ponto de partida: o conhecimento popular (PANNUTI ; GRINBAUM, 1995; ALVES et al., 2000).

2.2 *Aristolochia cymbifera* (*A. cymbifera*)

Conhecida pela sinonímia vulgar jarrinha, cipó-mil-homens, papo-de-peru, cassau. Pertencente à família Aristolochiaceae; nome científico *A. cymbifera*, encontrada na região do estado de Minas Gerais, nativa do cerrado (KELLY & GONZÁLEZ, 2003; LEITÃO ; KAPLAN, 1992; ZHOU et al., 2004). É uma trepadeira herbácea de ramos flexuosos, de base engrossada com casca fissurada. Folhas simples, longamente pecioladas, glabras, de 12 a 20 cm de comprimento. Flores solitárias avermelhadas ou vinosas (Figura 3). As partes utilizadas como fármaco são a casca do caule, caule e raízes em infusão alcoólica ou decocto (GRANDI, 2014).

As indicações para seu uso são inúmeras (GRANDI, 2014; KELLY ; GONZÁLEZ, 2003; LEITÃO ; KAPLAN, 1992; ZHOU et al., 2004)., um deles, está sendo testado nessa Instituição, mostrou efeito neuroprotetor. Na Dissertação de mestrado “Efeitos do extrato de *A. cymbifera* no controle de epilepsia e

neuroproteção” de Lucas Alves de Andrade (aluno na Pós-graduação do Instituto de Genética e Bioquímica/UFU) mostrou o efeito protetor do extrato de *A. cymbifera* em neurônios do hipocampo de camundongos tratados com peçonha de cascavel *Crotalus durissus terrificus* que tem efeito pró-convulsivante e induz excitotoxicidade no Sistema Nervoso Central (SNC) (ANDRADE, 2015; MELO, 2016).



Figura 1 - *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc.

Fonte: (LORENZI ; MATOS, 2008).

Nesse trabalho verificamos se o tratamento com *A. cymbifera* pode produzir algum efeito sobre a regeneração nervosa periférica e, para tanto, utilizaremos o modelo de lesão do nervo ciático em ratos e, após o tratamento, analisar a regeneração axonal e funcional. Para termos segurança dos efeitos negativos da planta sobre o organismo, precisou estudar a toxicidade da planta em alguns locais importantes que, nesse caso, foram medula espinhal, rins e fígado. Além disso, também testamos a citotoxicidade em cultura de astrócitos que, foi escolhida como representante das células neurais.

2.3 Extrato da *A. cymbifera*

No uso popular é feito uma infusão do caule na água, sendo assim, todos os componentes da planta são ingeridos pela pessoa. Optamos simular fazendo o extrato etanólico bruto para concentrar os componentes e podendo assim intensificar os potenciais efeitos que possam vir a existir.

O extrato da *A. cymbifera* possui o ácido aristolóquico (AA), uma substância tóxica aos rins e fígado. Essa substância apresenta potencial mutagênico, uma vez

que possui grande afinidade pelas bases nitrogenadas guanina e adenina, culminando em uma propriedade degradativa do DNA, contribuindo para formação de neoplasias (KOHARA et al., 2002; ZHOU et al., 2004; LEITÃO ; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON ; ROSTETTMANN, 2003). Já é conhecido e demonstrado por outros pesquisadores que o ácido encontrado na família da espécie em questão, possui efeitos nefrotóxicos, entretanto não possuem estudos que demonstram seus efeitos no fígado cuja função está relacionada à ação antitóxica contra substâncias nocivas ao organismo (LEITÃO ; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON ; ROSTETTMANN, 2003; ZHOU et al., 2004; PACHECO et al., 2010).

2.4 Astrócitos

A população da neuroglia é altamente heterogênea entre elas encontra-se os astrócitos conhecidos também como astroglia, sendo umas das células mais numerosas no cérebro dos mamíferos. Os astrócitos tem como principal função manter a homeostase do tecido nervoso e controlar, proteger e apoiar a função dos neurônios. Possui função de defesa, articulando reações contra bactérias, vírus ou mesmo uma lesão, garantindo um reparo correto (DRINGEN, 2015; GUYTON et al, .2011; KANDEL et al., 2013). Os astrócitos possuem formato irregular, geralmente estrelado, com vários processos na região terminal que permitem contato amplo com capilares e neurônios (KANDEL et al, 2013; LEE & MACLEAN, 2015), dessa forma selecionando o que passará dos capilares para o SNC.

Sendo uma célula tão importante para a manutenção do SNC, utilizaremos sua cultura para observar se a *A. cymbifera* pode ser tóxica para células neurais.

2.5 Medula espinhal, rim e fígado

Além do estudo da toxicidade da *A. cymbifera* em células neurais, fizemos essa análise *in vivo* no tecido neural, utilizando a medula espinhal como ponto de análise. A medula espinhal faz parte do SNC, encontra-se dentro do canal vertebral e sua função é conduzir impulsos nervosos da região do corpo até o encéfalo, produzir impulso e coordenar atividades musculares e reflexos (KANDEL et al., 2013).

Já é conhecido e demonstrado por outros pesquisadores que o AA, encontrado na família da espécie em questão, possui efeitos nefrotóxicos, mas nada muito claro sobre tempo de uso (LEITÃO ; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON ; ROSTETTMANN, 2003). Além disso, não foi encontrado na literatura resultado de testes que demonstram respostas do fígado que possui grande importância na metabolização de produtos químicos estranhos no nosso corpo.

Órgãos que compõem o Sistema Urinário, os rins medem, em geral, 10 cm de comprimento 5 cm de largura e 3 cm de espessura, pesando cerca de 130 á 150 gramas no adulto. Sua unidade funcional é o néfron constituído por um glomérulo e um túbulo renal. Toda a urina resulta da filtração do sangue por mais de 1 milhão de néfrons existentes em cada um dos rins humanos. Os rins filtram por volta de 120 a 150 litros de sangue por dia, se tornando o meio primário de eliminar produtos indesejáveis do metabolismo ou mesmo o material indesejado que é ingerido, ou seja, na ingestão do chá de *A. cymbifera*, seus compostos tóxicos como o AA que já foi descrito na literatura com efeitos nefrotóxicos (LEITÃO ; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON ; ROSTETTMANN, 2003; GUYTON et al., 2011; COSTA et al., 2013; LIMA, 2013).

O fígado, parte do Sistema Digestório, o maior órgão do corpo, possui funções como filtração e armazenagem de sangue; formação de bile; formação de fatores de coagulação; armazenamento de vitaminas e ferro; e metabolismo de carboidratos, proteínas, hormônios e produtos químicos estranhos. A função de metabolizar produtos químicos e estranhos é a que mais nos interessa sua capacidade de transformar os ácidos aminados supérfluos e o carbamato de amônio em ureia (que será filtrada nos rins), que é considerada uma função antitóxica. Mas vai além a atividade do fígado aniquilando, ou atenuando, várias substâncias tóxicas formadas no organismo, por fermentações e putrefações intestinais que eventualmente no organismo, são retirados pela glândula hepática, que provavelmente sobre eles reage de maneira a diminuir-lhes a toxidez.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar se o uso crônico via oral da *A. cymbifera* pode ser tóxico em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- a) realizar a análise histopatológica do rim, fígado e medula espinhal de animais tratados por dois meses com extrato bruto etanólico da *A. cymbifera*;
- b) realizar teste de citotoxicidade em culturas purificadas de astrócitos tratadas com extrato bruto etanólico de *A. cymbifera*.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Confeção do extrato bruto etanólico (EBE) da *A. cymbifera*

Fragmentos de caules secos de *A. cymbifera* foram coletados na área rural da cidade de Uberlândia, Brasil. O *voucher* do espécime de *Aristolochia cymbifera* está depositado no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (76869).

Após higienizar o material com água e detergente, borrifamos álcool 70% e deixamos secar na estufa a 37°C. Os fragmentos devidamente limpos e seco nós trituramos o caule em um moinho de facas tipo willye produzindo um pó de caule ao final. Submergimos o pó de caule em álcool absoluto, mantendo em repouso ao abrigo da luz por 14 dias e filtramos em seguida a solução de álcool mais pó do caule, descartando os sólidos preso no filtro e armazenando o extrato concentrado. Removemos os solventes do extrato concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 45°C e acondicionamos em frascos bem vedados a -20°C conforme descrito anteriormente por Silva et al. (2013).

4.2 Estudo *in vivo*

Utilizamos dez ratos Wistar machos jovens (6 a 8 semanas, ~200g) disponibilizados pelo CBEA (protocolo CEUA 132/16, anexo A). Os animais foram separados em dois grupos: **grupo controle** - nervo ciático lesado, tratado com solução placebo constituído de água filtrada e 0,1% de Tween 20 e **grupo tratado** - nervo ciático lesado e tratado com 24mg de EBE diluído com 0,1% Tween 20 em água filtrada. Cada grupo permaneceu com o tratamento por via oral durante 60 dias após a lesão do nervo.

Durante o período do experimento, os animais foram mantidos no Depositário de Animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), em gabinetes com controle de temperatura, de umidade e de ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à ração.

Findo os 60 dias os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cetamina (15mg/kg e 100mg/kg, intraperitoneal) e submetidos à eutanásia com aprofundamento da anestesia para realização de torocotomia e perfusão transcardíaca, respectivamente, com solução salina tamponada (50mL tampão

fosfato com 0,9% de NaCl, 0,1M, pH 7,4; PBS) e solução fixadora (50mL de paraformaldeído 4 %). Com auxílio de material cirúrgico adequado e lupa, extraímos as medulas espinhais lombares, rim esquerdo e o menor lóbulo do fígado. Todo o material extraído foi mantido em solução fixadora por 24h em temperatura de 4°C, posteriormente desidratamos e emblocamos em parafina. Dos blocos obtivemos cortes histológicos em micrótomo com espessura de 5µm, colocados em lâminas gelatinizadas, e coradas com hematoxilina e eosina para analisadas “às cegas” pelo avaliador em microscópio de luz (TS-100, Nikon). Gerando ao final dela um laudo histopatológico das lâminas de rim e fígado (Anexo B) e as lâminas de corte de medula foram analisadas pela Prof.^a Dr.^a Renata Graciele Zanon.

4.3 Estudo *in vitro*

Realizamos a extração do tecido com material cirúrgico estéril. Culturas purificadas de astrócitos foram estabelecidas através da dissociação do córtex cerebral de ratos neonatos Wistar pela dissecação, fragmentação e tripsinização durante 10min a 37°C do tecido. Essa solução de células em solução tampão sem cálcio e magnésio (PBS flush, 0,1M, pH 7,4, com antibiótico, Gibco), após bloqueio com soro fetal bovino da ação enzimática, foi colocada sobre um gradiente de albumina bovina diluída a 4% em meio de cultura DMEM utilizando para tanto tubo de 15 ml que foi à centrifugado (1500 RPM por 10 minutos). O sobrenadante eliminamos e o precipitado semeado em garrafa de cultura de 25cm² e estocadas em incubadora (Nuair) sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até atingir a confluência. Após a confluência celular na garrafa de cultivo, descolamos as células com tripsina e semeamos em placas de 96 poços (10⁴ células por poço) e adicionado 100µl de meio DMEM com 10% de SFB por poço. Após 24h na placa, o meio foi descartado e adicionado o extrato com diferentes concentrações. Os poços foram separados em 5 grupos, o grupo controle (**GC**) que recebeu a solução controle (DMEM mais soro fetal bovino 5%), grupo de 25µl/ml de extrato (**G25**), grupo 50µl/ml de extrato (**G50**), grupo 100µl/ml de extrato (**G100**) e grupo overdose 1g/ml (**overdose**). Seu contato com a solução foi de 48h. Ao término das 48h adicionamos o Alamar blue (10%) por 8h. Após esse tempo, medimos a absorbância em comprimentos de onda de 570nm e 600nm em espectrofotômetro de placa (tunable ,VersaMax).

Diante dos resultados do teste de viabilidade foi escolhido o teste mais adequado, considerando o nível de significância $p < 0,001$ (***) a partir da análise de variância ANOVA *one way* com pós-teste de Bonferroni utilizando para as análises e construção de gráficos o programa estatístico GraphPad Prism 4.0.

5 RESULTADOS

5.1 O extrato alcoólico de *A. cymbifera* não foi nefrotóxico, hepatotóxico ou neurotóxico

A técnica aplicada com intuito de observar possíveis sinais de toxidade na arquitetura microscópica dos órgãos rim e fígado foi avaliada “às cegas” por histopatologista. O laudo histopatológico (Anexo B) não apontou presença de infiltrado inflamatório e indicou arquitetura preservada para ambos os órgãos nos dois grupos estudados como demonstrado na Figura 2.

Os rins, em ambos os grupos, apresentaram o parênquima com aspectos usuais de normalidade, os corpúsculos renais indicados pelas setas de cor preta também estavam preservados com espaço capsular de dimensão normal e sem sinais de alterações aparentes no glomérulo (Figuras 2A e 2B), o mesmo foi encontrado nos túbulos renais indicados pelas setas verdes com aspecto de normalidade e luz preservada sem aumento aparente. Nos cortes possíveis de observar o hilo renal, não foi identificado infiltrado inflamatório, necrose ou fibrose.

Com relação aos cortes de fígado para ambos os grupos, identificaram-se parênquima preservado como indicado pela seta roxa, com veia centrolobular indicada pela seta vermelha sem sinal de alteração, como em todos os espaços porta (Figuras 2C e 2D), com aspectos usuais normais, o número de células de Kupffer e os espaços sinusóides indicados pelas setas laranjas também dentro da normalidade. Não foram encontrados infiltrados inflamatórios, necrose, fibrose, degeneração ou depósitos de qualquer natureza.

Nas Figuras 2E e 2F também verificamos a integridade de secções transversais da medula espinhal constituída de duas regiões a de substância cinzenta indicada pelo asterisco cinza escuro e a região de substância clara indicada pelo asterisco azul escuro, região lombar, de animais tratados. Infiltrado inflamatório ou aumento da densidade celular não foram verificados em relação às medulas de animais controles.

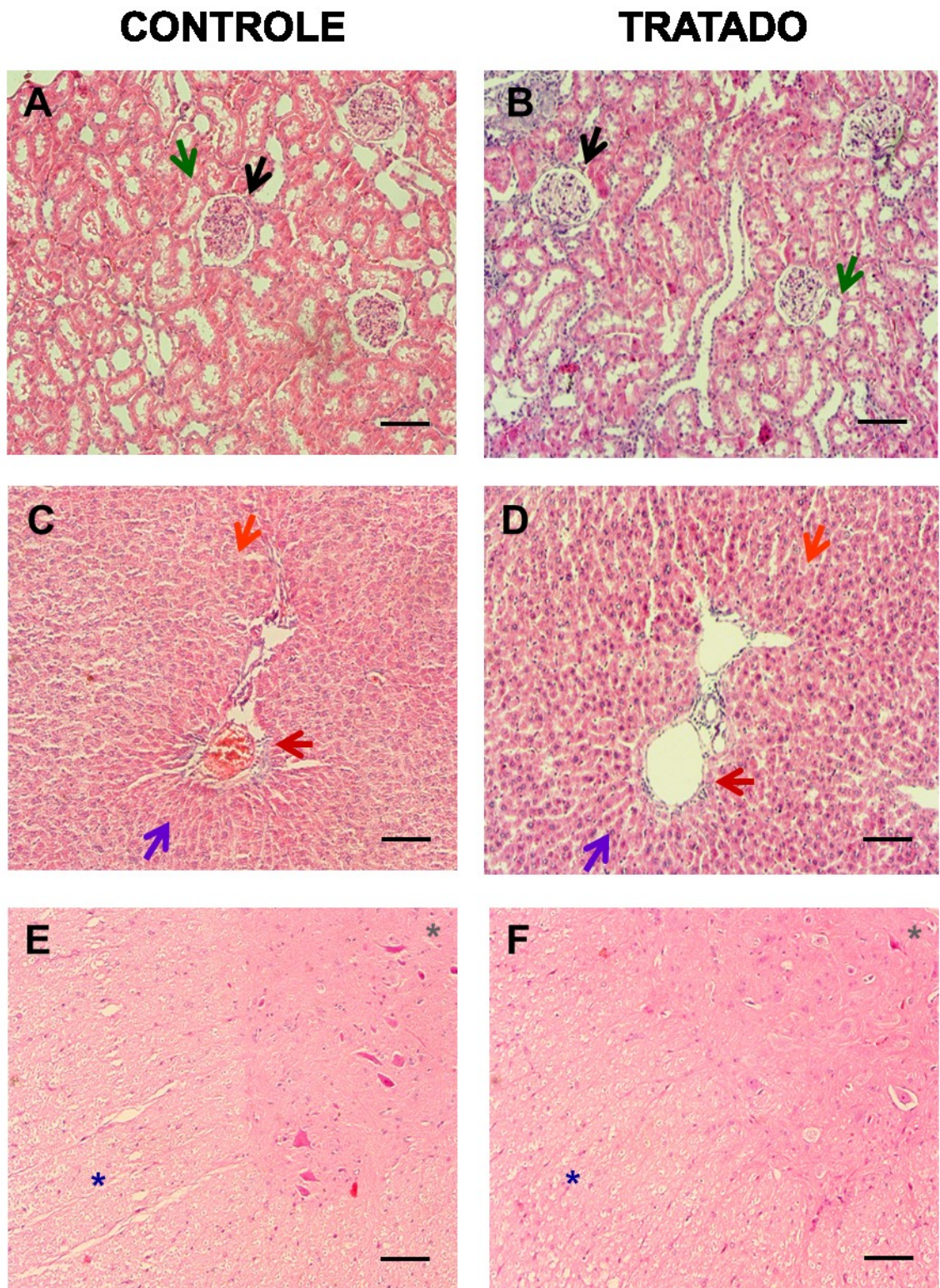
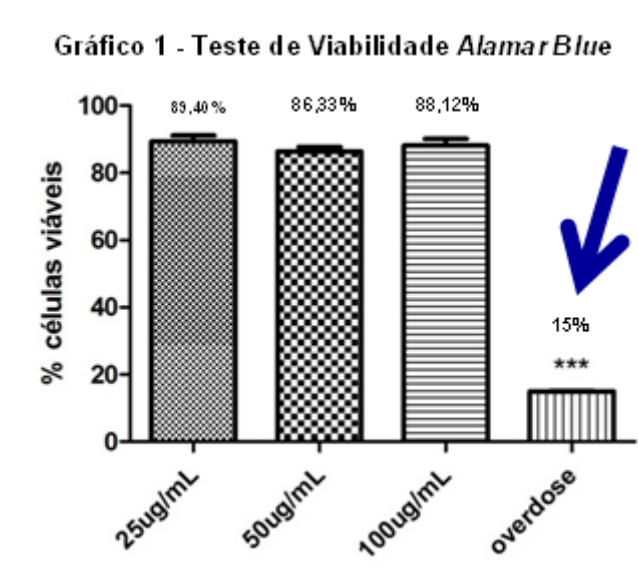


Figura 2: Fotomicrografias de microscopia de luz em aumento 10x, representativas dos cortes transversais de fragmentos do rim controle (A), rim tratado (B), fígado controle (C), fígado tratado (D), medula espinal control (E) e medula espinal tratado (F) corados com HE após dois meses de administração por via oral do EBE de *A. cymbifera*, demonstrando aspectos usuais normais. Escala = 100µm. Fonte: A autora.

5.2 Somente a overdose de *A. cymbifera* foi tóxica às culturas de astrócitos

O Gráfico 1 apresenta o resultado do teste de viabilidade em cultura de astrócitos tratadas com EBE de *A. cymbifera* através do uso do corante *Alamar blue*. A quantidade de células viáveis foi calculada em relação ao controle (não tratado) e não apresentou importante perda de células com as doses de 25, 50 e 100ug de *A. cymbifera*/mL de meio de cultura. Doses essas que apresentaram viabilidade celular de 85 a 90%, assim em 25ug/ml obtemos 89,40% de células viáveis, em 50ug/ml o valor de 86,33% e em 100ug/ml o valor de 88,12%. Sendo observada importante morte celular apenas com uso de overdose (1g/mL) com apenas 15% de células viáveis apontado pela seta azul.



Representando o resultado do teste de viabilidade em cultura de astrócitos tratadas com diferentes doses de extrato de *A. cymbifera*. O eixo x apresenta as diferentes concentrações de EBE usadas no meio de cultura e, o eixo y, a porcentagem de células viáveis após 48h de tratamento. $P < 0,001$ (***, ANOVA *one way* com pós-teste de Bonferroni). Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais está cada vez mais popular sendo de extrema importância conhecer, em longo prazo, se causará malefícios à saúde do indivíduo. Em nosso caso, testamos a ingestão da *Aristolochia cymbifera*, da família Aristolochiaceae conhecida pelos seus ácidos aristolóquicos (AA), substância que apresenta potencial mutagênico, contribuindo para formação de neoplasias (KOHARA et al., 2002; ZHOU et al., 2004; LEITÃO ; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON ; ROSTETTMANN, 2003). Dessa forma, o presente trabalho avaliou a toxicidade sistêmica do extrato bruto etanoico (EBE) de *A. cymbifera* em rim, fígado e neural pela medula espinhal e em cultura de astrócitos.

Quando ingerido, os componentes do EBE misturada à água filtrada chegam ao fígado, que o metaboliza, sendo, portanto, um dos principais alvos das doenças relacionadas ao metabolismo de compostos estranhos que são predominantemente biotransformado pela ação de enzimas (STICKEL et al., 2005). Estudos, como o de Melo et al. (2007), trataram coelhos com extrato de *A. cymbifera* obtido pelo isopropanol e de aplicação subcutânea por curto tempo. Nessas condições, os autores não observaram alterações da histologia do fígado. Nossos resultados confirmam esses achados e, ainda, estendemos a um maior período de tratamento, dois meses, mantendo a normalidade da estrutura do órgão.

Posteriormente os compostos do EBE são encaminhados para os rins que filtram por volta de 120 a 150 litros de sangue por dia, se tornando o meio primário de eliminação de produtos indesejáveis, como os AA, que já foi descrito na literatura com efeitos nefrotóxicos (LEITÃO ; KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON ; ROSTETTMANN, 2003; GUYTON et al., 2011; COSTA et al., 2013; LIMA, 2009). Apesar da existência dessa substância, o tratamento com EBE de *A. cymbifera* , ao final de dois meses, não causou danos ao rim como apresentado nos resultados. O mesmo foi observado no estudo citado anteriormente, de Melo et al. (2007). Estudos sobre os AA de diversas espécies da família Aristolochiaceae confirmam que esses ácidos podem se distinguir quanto à bioquímica da substância (CHEN et al., 2010). Nesse sentido, apesar de alguns relatos médicos apontarem a toxicidade de AA da família Aristolochiaceae nos rins com uso à longo prazo, nada foi implicado diretamente aos AA provenientes da *A. cymbifera* (LORD et al., 1999; SILVA et al., 2013).

Após sua passagem pelo sistema digestório, os compostos da *A. cymbifera* chegarão ao sangue, e, através da grande circulação passarão pelos diversos tecidos, inclusive podendo chegar às estruturas neurais, podendo ali exercer sua toxicidade.

Testes com o extrato e seu comportamento em contato com os componentes do Sistema Nervoso visaram observar a possibilidade do tratamento ser neurotóxico. Como apresentado na metodologia do presente trabalho, os grupos de animais passaram por uma lesão nervosa periférica, esse procedimento foi realizado para possibilitar o estudo da regeneração do nervo com o tratamento com *A. cymbifera*. A análise dos nervos foi realizada por outro pesquisador (SANTOS, 2019), cabendo ao presente estudo, a análise da segurança do tratamento proposto. Como nos demais tecidos, a medula espinhal se mostrou preservada, sem qualquer indício de toxicidade. A medula espinhal é um componente do Sistema Nervoso Central, formada por duas substâncias: a branca, mais externa, contendo axônios mielinizados e a substância cinzenta, mais interna, que possui formato de “borboleta” (GUYTON et al., 2011). Nenhum sinal de lesão ou alteração na quantidade de células foi verificado em ambas as substâncias que compõem a medula.

Adicionalmente, buscando um possível efeito direto na célula, testamos a ação citotóxica da planta em cultura de astrócitos corticais. Os astrócitos são células gliais do SNC e possui a função de selecionar o que passará a barreira hematoencefálica (GUYTON et al., 2011), portanto, tendo uma posição estrategicamente importante na primeira linha de defesa contra compostos potencialmente tóxicos, se ocupando da função de desintoxicação do Sistema Nervoso (DRINGEN et al., 2015). Na literatura, os testes *in vitro* envolvem células dos rins e macrófagos (ESTEVES, 2017), não evidenciando citotoxicidade. Nossos resultados, da mesma forma, para várias doses de EBE de *cymbifera*, não mostrou importante perda celular após 48h de tratamento. Somente a overdose foi capaz de apresentar resultados significativos, o que era esperado devido a total alteração da qualidade do meio de cultura que serve para nutrir e manter o ambiente ideal para a sobrevivência da célula.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos a partir deste trabalho concluiu-se que a ingestão do extrato bruto de *Aristolochia cymbifera* é segura à saúde de pequenos roedores dentro do período de dois meses em uso contínuo por via oral.

A análise histopatológica não evidenciou sinal de toxicidade nos rins, fígado ou medula espinhal dos ratos.

Com relação à viabilidade celular testada em astrócitos houve perda significativa apenas em overdose.

REFERÊNCIAS

- ALVES, T. M. de A. *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ANDRADE, L. A. **Efeitos do extrato de Aristolochia cymbifera no controle de epilepsia e neuroproteção.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Genética e Bioquímica. Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- CHEN, Y. *et al.* Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. **Oncology Reports**, Athens, v. 24, n. 1, p. 141-153, 2010.
- COSTA, T. N. **Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do aspidosperma subincanum (apocynaceae) em camundongos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Editora da UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 1996.
- DRINGEN, R. *et al.* Glutathione-dependent detoxification processes in astrocytes. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 40, n. 12, p. 2570-2582, 2015.
- ESTEVES, B. *et al.* **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antitumoral dos extratos de Solidago chilensis, Aristolochia cymbifera e Piper umbellatum.** 2017. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Doenças infecto) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- GADHI, C. A. *et al.* Bactericidal properties of the chloroform fraction from rhizomes of Aristolochia paucinervis Pomel. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 207-212, 2001.
- GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Medicinais: mineiras, nativas e cultivadas.** Belo Horizonte: Adequatio Estúdio, 2014.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica.** [S.] Elsevier Brasil, 2011.
- IOSET, J.-R.; RAOELISON, G. E.; HOSTETTMANN, K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2003.
- KANDEL, E. R. *et al.* **Principles of Neural Science.** 5. ed. New York: Mcgraw Hill, 2013.
- KELLY, L. M.; GONZÁLEZ, F. Phylogenetic relationships in Aristolochiaceae. **Systematic Botany**, Laramie, v. 28, n. 2, p. 236-250, 2003.
- KOHARA, A. *et al.* Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (Muta™ Mouse). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 515, n. 1-2, p. 63-72, 2002.

LEE, K. M.; MACLEAN, A. G. New advances on glial activation in health and disease. **World Journal of Virology**, Pleasanton, v. 4, n. 2, p. 42, 2015.

LEITÃO, G. G. & KAPLAN, M.A.C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, 73:65-75. 1992.

LIMA, A. P. de. **Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos**. 2009.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2009.

LORD, G. M. *et al.* Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK. **The Lancet**, Amsterdam, v. 354, n. 9177, p. 481-482, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2: ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

MELO, H. B. **Atividade neuroprotetora do extrato etanólico de *aristolochia cymbifera* sobre o sistema nervoso central e periférico de vertebrados**.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2016.

MELO, M. M.; LÚCIA, M.; HABERMEHL, G. G. Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2007.

PACHECO, A. G. *et al.* Estudo químico e atividade antibacteriana do caule de *Aristolochia esperanzae kuntze* (Aristolochiaceae). **Química Nova**, São Paulo. v. 33, n. 8, p. 1649-1652, 2010.

PANNUTI, C. S.; GRINBAUM, R. S. An overview of nosocomial infection control in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 16, n. 3, p. 170-174, 1995.

SANTOS, C. M. dos. **Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* sobre a regeneração nervosa periférica**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SILVA, L. C. **Efeito do extrato da *Aristolochia cymbifera* na regeneração axonal após lesão nervosa periférica**. 2018. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SILVA, W. F. *et al.* Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potential antibacterial drug. **SpringerPlus**, Athens, v. 2, n. 1, p. 430, 2013.

STICKEL, Felix; PATSENKER, Eleonora; SCHUPPAN, Detlef. Herbal hepatotoxicity. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 43, n. 5, p. 901, 2005.

ZHOU, S. *et al.* Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. **Life sciences**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 935-968, 2004.

ANEXO A – CERTIFICADO DO CEUA



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do Extrato da *Aristolochia cymbifera* na Regeneração Axonal, Plasticidade Sináptica e Gliose após Lesão Nervosa Periférica”, protocolo nº 132/16, sob a responsabilidade de **Renata Graciele Zanon** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **09 de dezembro de 2016**.

(We certify that the project entitled “Efeito do Extrato da *Aristolochia cymbifera* na Regeneração Axonal, Plasticidade Sináptica e Gliose após Lesão Nervosa Periférica”, protocol 132/16, under the responsibility of Renata Graciele Zanon - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 09th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/03/2017 Término: 30/09/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	69
Peso / Idade	200 g – 5-10g / 8 semanas – 1-3 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	CEBEA – UFU / ARFIS
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 14 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO B - Laudo histopatológico

Laudo emitido pela Prof.^a Dr.^a Karen Renata Nakamura Hiraki.

Os cortes histológicos corados em H.E. de fragmentos de rim revelaram que a arquitetura do órgão estava preservada, sendo possível visualizar as porções cortical e medular. O parênquima renal apresentava aspectos usuais de normalidade sem sinais de infiltrado inflamatório, necrose, degeneração, fibrose e depósitos hialinos. Os corpúsculos renais estavam preservados com espaço capsular de dimensão normal sem sinais de alterações aparentes no glomérulo renal. Os túbulos renais apresentavam-se com aspecto de normalidade e luz preservada sem aumento de interstício renal. Em alguns cortes foi possível observar a presença do hilo renal que encontrava-se sem sinais de infiltrado inflamatório, necrose ou fibrose.

Os cortes histológicos corados em H.E. de fragmento de fígado revelaram parênquima hepático preservado apresentando lóbulos pouco delimitados com veia centrolobular sem sinais de alterações. Não foram observadas áreas de infiltrado inflamatório, necrose, fibrose, degeneração e depósitos de qualquer natureza. Os espaços porta estavam normais apresentando vasos sanguíneos e ductos biliares com aspectos usuais. Os espaços sinusóides sem sinais de dilatação ou obstrução estavam permeando os hepatócitos que não apresentavam sinais aparentes de alterações. Não foi observado aumento do número de células de Kupffer.