

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DANIEL PRUDENTE MORAES

**ALTERAÇÕES GONADAIS EM RATOS WISTAR MACHOS PRÉ-PÚBERES E
PÚBERES CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO AGUDA POR *Senecio brasiliensis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiiana, RS, Brasil

2019

DANIEL PRUDENTE MORAES

ALTERAÇÕES GONADAIS EM RATOS WISTAR MACHOS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO AGUDA POR *Senecio brasiliensis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Leite dos Anjos

**Uruguaiiana, RS, Brasil
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M827a Moraes, Daniel Prudente

ALTERAÇÕES GONADAIS EM RATOS WISTAR MACHOS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO AGUDA POR *Senecio brasiliensis* / Daniel Prudente Moraes.

77 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2019.

"Orientação: Bruno Leite dos Anjos".

1. alterações testiculares. 2. alcaloides pirrolizidínicos. 3. distúrbios reprodutivos. 4. plantas tóxicas. I. Título.

DANIEL PRUDENTE MORAES

ALTERAÇÕES GONADAIS EM RATOS WISTAR MACHOS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO AGUDA POR *Senecio brasiliensis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

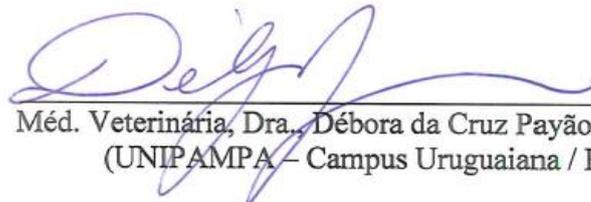
Área de concentração: Patologia Veterinária

Dissertação defendida e aprovada em, 20 de maio de 2019.

Banca examinadora:



Méd. Veterinário, Dr., Bruno Leite dos Anjos
Orientador
(UNIPAMPA – Campus Uruguaiana / RS)



Méd. Veterinária, Dra., Débora da Cruz Payão Pellegrini
(UNIPAMPA – Campus Uruguaiana / RS)



Méd. Veterinária, Dra., Maria Elisa Trost
(UNIPAMPA – Campus Uruguaiana / RS)

Dedico, esta conquista a minha família, em especial aos meus pais, minha esposa Catia Daiane e meus filhos Yasmim e Felipe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter guiado todos os caminhos nessa jornada.

A minha família, que esteve sempre ao meu lado apoiando e incentivando na conquista de meus objetivos.

Aos Professores do LPV – UNIPAMPA em especial, pela contribuição, auxílio e disponibilidade no desenvolver do processo das atividades de pesquisa.

Aos professores, que contribuíram com seu grande conhecimento para a qualificação profissional do programa de Mestrado em Ciência Animal e que contribuíram de maneira ímpar no meu processo de aprendizado.

Aos colegas de mestrado e colaboradores da UNIPAMPA pelo acompanhamento, auxílio e contribuição durante este período.

Agradeço também a toda a equipe do LPV da UNIPAMPA pela colaboração e amizade nesse processo de pesquisa durante o período de mestrado.

Muito Obrigado à TODOS!!!

“Se teus projetos são para um ano, semeia o grão.
Se são para dez anos, planta uma árvore.
Se não para cem anos, instrua o povo.

Semeando uma vez o grão,
colherás uma vez;
plantando uma árvore,
colherás dez vezes;
instruindo o povo,
colherás cem vezes.

Se deres um peixe a um homem
ele comerá uma vez.
Se, porém, o ensinares a pescar,
Ele comerá a vida inteira.”

Kuan-Tzy, sábio chinês,
Século VII a.c.

RESUMO

ALTERAÇÕES GONADAIS EM RATOS WISTAR MACHOS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO AGUDA POR *Senecio brasiliensis*

AUTOR: Daniel Prudente Moraes

ORIENTADOR: Bruno Leite dos Anjos

Local da Defesa e Data: Uruguaiana, 20 de maio de 2019

Alcaloides pirrolizidínicos (APs) são compostos tóxicos encontrados em diversas plantas do gênero *Senecio spp*, sendo descrito como a principal causa de intoxicação natural em animais de produção (bovinos) provocado principalmente pelo consumo da planta *Senecio brasiliensis* (*S. brasiliensis*). No Rio Grande do Sul, a ocorrência desta planta é marcante, sendo encontrada em todas as regiões do Estado. Recentemente foi atribuído a essa planta ação deletéria no tecido gonadal de vacas prenhes e também é relatado que rebanhos de produção bovina apresentam baixos índices reprodutivos.

Muitas vezes o fator etiológico que desencadeou índices inferiores aos esperados na reprodução é subdiagnosticado, uma vez que pouco se sabe sobre a ação dos APs no sistema reprodutor de rebanhos. O presente trabalho visa avaliar os efeitos tóxicos deletérios dos APs em testículos de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), em que será administrado por gavagem extrato aquoso obtido na relação (2g planta dessecada X 100g de peso corpóreo), obtendo-se a forma aguda da intoxicação. No experimento foram formados quatro grupos para avaliação aguda da intoxicação em ratos pré-púberes e púberes. Os animais desafiados receberam extrato aquoso da planta suficiente para o desenvolvimento da forma aguda da intoxicação, possibilitando a análise das estruturas histologicamente quanto à presença de alterações nas células testiculares nos diferentes estágios de desenvolvimento (pré-púberes e púberes). Inicialmente, pretende-se reproduzir a intoxicação aguda pelos APs em ratos e a partir da intoxicação aguda por extrato aquoso de *S. brasiliensis* confirmar a ação tóxica deletéria no tecido gonadal, propiciando iniciar estudos futuros para avaliação do comportamento toxicológico gonadal em espécies de interesse econômico como os bovinos.

Palavras chaves: alcaloides pirrolizidínicos, alterações testiculares, degeneração testicular, distúrbios reprodutivos, plantas tóxicas.

ABSTRACT

GONADAL CHANGES INDUCED BY ACUTE POISONING BY *Senecio brasiliensis* IN PREPUBERTAL AND PUBERTAL WISTAR MALE RATS

AUTHOR: Daniel Prudente Moraes

ADVISER: Bruno Leite dos Anjos

Date and Place of the Defense: Uruguaiana, May 20, 2019

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are toxic compounds found in several plants of the genus *Senecio* spp, being described as the main cause of natural intoxication in cattle caused mostly by the consumption of the plant *Senecio brasiliensis* (*S. brasiliensis*). In Rio Grande do Sul, Brazil, the occurrence of this plant is remarkable, being found throughout the State. Recently, deleterious effect on the gonadal tissue of pregnant cows was attributed to this plant and low reproductive rates in the cattle herd was also reported.

Oftentimes, the etiologic factor that triggered lower rates in reproduction than expected is underdiagnosed, since there is a very little knowledge about the action of PAs in the herd reproduction system. The present study aims to evaluate the toxic deleterious effects of PAs in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) testicles, in which the aqueous extract obtained at the ratio (2g of dry plant per 100g of body weight) will be administered by gavage, obtaining the acute form of poisoning. For this experiment, four groups were formed to evaluate the acute form of poisoning in prepubertal and pubertal rats. The challenged animals received sufficient aqueous extract of the plant for developing acute form of poisoning, allowing the histological structures analysis that search the presence of changes in different stages of development testicular cells (prepubertal and pubertal). Initially, the purpose is to reproduce the acute poisoning by PAs in rats and confirm the toxic deleterious effects in the gonadal tissue from the acute intoxication by *S. brasiliensis* aqueous extract, allowing to initiate future studies to evaluate the gonadal toxicological behavior in species of economic interest such as cattle.

Keywords: pyrrolizidine alkaloids, testicular changes, testicular degeneration, reproductive disorders, toxic plants.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - *Senecio brasiliensis* em estado de crescimento vegetativo (A); *Senecio brasiliensis* em floração (B); inflorescência de *Senecio brasiliensis* (C). 20
- FIGURA 2 - Forma estrutural dos principais alcaloides pirrolizidínicos encontrados no *S. brasiliensis*. 22
- FIGURA 3 - Representação esquemática de porção de um corte histológico de túbulo seminífero. 25
- FIGURA 4 - *Senecio brasiliensis* em estágio de coleta (A); *Senecio brasiliensis* em esteira para secagem (B); Planta triturada em moinho (C); Acondicionamento da planta triturada (D). 29
- FIGURA 5 - Preparo do extrato aquoso relação *Senecio*/água destilada “1X5” (A); Extrato líquido recuperado (68% do volume de água destilada utilizada no processo de infusão) (B). 30
- FIGURA 6 - Ratos grupo piloto. Ratos Wistar adultos, animais hígidos previamente a administração do extrato aquoso de *S. brasiliensis*. 31
- FIGURA 7 - Administração do extrato aquoso de *S. brasiliensis* por gavagem. 32
- FIGURA 8 - Ratos grupo Piloto. Ratos com sinais clínicos: pelos eriçados, dispneia e letargia. 36
- FIGURA 9 - Rato “P – II”. Fígado. Necrose e hemorragia difusa acentuada, megalocitose, hepatócitos com citoplasma vacuolizado, núcleo picnótico. 37
- FIGURA 10 - Grupo Pré-púberes “A” e “B”. Ratos com 43 dias de idade, animais sem alterações clínicas após 2ª administração. 39
- FIGURA 11 - Rato pré-púbere “B II”. Intoxicação por APs, em decúbito dorsal durante quadro convulsivo, cauda e extremidades apendiculares pálidas, escroto com transudato modificado na cavidade vaginal. 40
- FIGURA 12 - Rato pré-púbere “B IV”. Escroto, após remoção da derme observa-se cavidade vaginal: com líquido avermelhado (transudato modificado) de origem cavitária. 41

- FIGURA 13 - Rato pré-púbere “B I”. Fígado com alteração e evidenciação da congestão e padrão lobular. 42
- FIGURA 14 - Rato pré-púbere “B IV”. Testículo: coleta de testículos, apresentam moderada reserva de tecido adiposo na periferia da cauda do epidídimo. 42
- FIGURA 15 - Fígado grupo pré-púbere “A e B” - Rato controle A I (A), espaço portal e periportal sem alteração. Rato intoxicado B I (B), hemorragia difusa acentuada, hepatócitos (megalocitose, cromatina vacuolizada) necrose e apoptose. 44
- FIGURA 16 - Túbulos seminíferos grupos pré-púberes “A e B” - Rato controle AV (A), túbulos seminíferos sem alteração. Rato intoxicado BV (B), túbulos seminíferos com lumem reduzido, as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico e túbulos seminíferos apresentam degeneração e necrose, células germinativas com núcleo picnótico e desorganização com perda de células germinativas para a luz tubular. 44
- FIGURA 17 - Rato pré-púbere “A – V”. Ductos cabeça do epidídimo. Ausência de espermatozoides, indicando a imaturidade sexual do rato. HE. Obj. 40X. 45
- FIGURA 18 - Rato pré-púbere “B – III”. Túbulos seminíferos. Lumem aumentado, as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico com desorganização das células germinativas e diminuição do número de camadas de células germinativas. Túbulo seminífero central apresentando severa perda celular para a luz do túbulo. HE. Obj. 40X. 45
- FIGURA 19 - Grupos púberes “A e B”. Ratos controle sem alterações (A) e ratos que receberam extrato aquoso *S. brasiliensis* imagem três horas após última dosagem, apresentam leve depressão e pelos levemente eriçados (B). 47
- FIGURA 20 - Grupo púbere “B”. Ratos desafiados apresentando pelos eriçados, depressão acentuada, dispneia. 48
- FIGURA 21 - Rato púbere controle “A II”. Visualiza-se os principais órgãos sem alteração. 50

- FIGURA 22 - Rato púbere intoxicado “B II”. Visualiza-se: hidrotórax, hidroperitônio, alteração do padrão hepático, veia cava caudal ingurgitada. 50
- FIGURA 23 - Rato púbere “B II”. Testículo: coleta de testículos, apresentam acúmulo moderado de tecido adiposo na periferia da cabeça e cauda do epidídimo. 51
- FIGURA 24 - Fígado grupos púberes “A e B” – (A) Rato controle “A I”, espaço centrolobular sem alteração. (B) Rato intoxicado “B I”, hemorragia difusa acentuada, hepatócitos (múltiplos hepatócitos com núcleo picnótico, citoplasma vacuolizado) necrose e apoptose difuso acentuado 53
- FIGURA 25 - Rato púbere “B V”. Fígado. Espaço periportal. Apresenta núcleos picnóticos; hemorragia; megalocitose; congestão. HE. Obj. 40X. 53
- FIGURA 26 - Rato púbere controle “A I”. Corte longitudinal. Lumem diminuído onde visualiza-se as caudas dos espermatozoides, as células germinativas apresentam a cromatina normocoradas onde visualiza-se a divisão celular até espermatozoides. HE. Obj. 40X. 54
- FIGURA 27 - Rato púbere intoxicado “D I”. Túbulos seminíferos. Lumem aumentado, as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico, visualiza-se descontinuidade das células germinativas com diminuição e perda das camadas adjacentes. HE. Obj. 40X. 54
- FIGURA 28 - Rato púbere controle “A IV”. Ductos cabeça do epidídimo. Presença de grande quantidade de espermatozoides, indicando a maturidade sexual do rato. HE. Obj. 20X. 55
- FIGURA 29 - Rato púbere intoxicado “B V”. Ductos cabeça do epidídimo. Diminuição significativa de espermatozoides na luz dos ductos. HE. Obj. 40X. 55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Correlação dose tóxica entre espécies, planta verde e planta dessecada.	31
TABELA 2 -	Distribuição e identificação dos grupos experimentais.	33
TABELA 3 -	Grupo Piloto - Dose, número de administrações e evolução da intoxicação até a morte dos ratos.	35
TABELA 4 -	Grupo piloto: sinais clínicos observados nos ratos.	36
TABELA 5 -	Grupo piloto: alterações macroscópicas observadas.	36
TABELA 6 -	Grupo piloto: avaliação microscópica do fígado.	37
TABELA 7 -	Grupos pré-púberes (controle “A” e desafiado “B”): peso dos ratos usados no experimento, volume extrato aquoso de <i>S. brasiliensis</i> e/ou água destilada administrado, número de administrações e desfecho da administração.	38
TABELA 8 -	Ratos pré-púberes, grupos “B”: Sinais clínicos observados previamente a morte.	39
TABELA 9 -	Ratos pré-púberes - Grupo “B”: Alterações macroscópicas e intensidade das lesões.	41
TABELA 10 -	Grupo pré-púbere “B”: Alterações microscópicas observadas nos fígados de ratos intoxicados por <i>S. brasiliensis</i> .	43
TABELA 11 -	Grupos púberes “A (controle) e B (desafiado)”: Peso dos ratos, volume extrato aquoso de <i>S. brasiliensis</i> e/ou água destilada administrado, número de administrações e desfecho após administração.	47
TABELA 12 -	Ratos púberes, grupo “B”: Sinais clínicos observados após a administração do extrato aquoso de <i>S. brasiliensis</i> .	48
TABELA 13 -	Grupo púbere “B”: Avaliação macroscópica e intensidade das lesões.	49
TABELA 14 -	Ratos púberes, grupo “B”. Avaliação microscópica de fígado e intensidade das lesões.	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Intoxicação por <i>Senecio</i> spp. em bovinos.....	18
2.2	<i>Senecio</i> spp.....	20
2.3	Alcaloides pirrolizidínicos.....	22
2.4	Toxicodinâmica dos alcaloides pirrolizidínicos.....	23
2.5	Risco para saúde pública.....	24
2.6	Testículos e espermatogênese.....	24
3	OBJETIVO.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Coleta e processamento da planta.....	29
4.2	Obtenção do extrato.....	30
4.3	Dose tóxica (letal).....	30
4.4	Grupo piloto (GP).....	31
4.5	Administração do extrato.....	32
4.6	Modelo e grupos experimentais.....	32
4.7	Avaliação macroscópica.....	33
4.8	Avaliação histopatológica.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Grupo piloto (GP) para padronização da intoxicação.....	35
5.2	GRUPOS PRÉ-PÚBERES.....	37
5.2.1	Avaliação clínica dos ratos, grupos pré-púberes da intoxicação ao desfecho morte.....	37
5.2.2	Achados de necropsia ratos grupos pré-púberes (A / B).....	42
5.2.3	Exame histopatológico ratos pré-púberes (A / B).....	43
5.3	GRUPOS PÚBERES.....	46
5.3.1	Avaliação clínica dos ratos grupos púberes da intoxicação ao desfecho morte.....	46
5.3.2	Achados de necropsia ratos púberes grupos “A e B”.....	49
5.3.3	Exame histopatológico ratos púberes grupos “A e B”.....	51
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÕES.....	62

8	REFERÊNCIAS.....	63
9	ANEXO.....	76
9.1	ANEXO A – Certificado CEUA/UNIPAMPA (Grupo Piloto).....	76
9.2	ANEXO B – Certificado CEUA/UNIPAMPA (Experimento).....	77

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul é criada de maneira extensiva em áreas que comumente observa-se a ocorrência espontânea de vários gêneros de plantas que contém alcaloides pirrolizidínicos (APs), destacando-se nessas áreas de pastoreio, plantas do gênero *Senecio*, especialmente *Senecio brasiliensis* (*S. brasiliensis*). Essa é uma das plantas tóxicas que apresenta distribuição geográfica em toda a região sul do Brasil (Riet-Correa et al., 1993; Pilati & Barros, 2007; Grecco et al., 2010).

As plantas do gênero *Senecio spp.* (família *Asteraceae*) são conhecidas popularmente como “maria-mole” ou “flor-das-almas” e figuram como a principal causa tóxica de morte de bovinos no Rio Grande do Sul. A mortalidade provocada por essa planta, especialmente na espécie bovina que é a mais acometida pelas intoxicações, ocorre devido a dano hepático crônico que é irreversível na maioria das vezes (Karam et al., 2004; Lucena et al., 2010). Das formas de intoxicação “aguda ou crônica”, a principal forma de intoxicação descrita é a seneciose crônica, que resulta em morte de bovinos após eventos em que ocorre a ingestão da planta presente nas pastagens principalmente devido ao déficit forrageiro (Tokarnia et al., 2012; Krabbe et al., 2015, 2017).

Embora popularmente muitas plantas sejam incriminadas como tóxicas, poucas informações são conhecidas sobre a real abrangência do seu efeito tóxico nos diferentes sistemas orgânicos, em especial, no que diz respeito a possíveis efeitos no sistema reprodutivo. Na maioria das vezes o efeito tóxico causado por plantas está associado com abortos, Krabbe et al. (2015) descreveu lesão direta em células luteínicas de vacas intoxicadas por Aps com presença de megalocitose, condição esta associada à ação tóxica proveniente dos Aps que quando biotransformados são inibidores de mitose que é o caso da patologia observada (Riet-Correa et al., 2012b; Krabbe et al., 2015).

No Rio Grande do Sul diversos agentes são citados como causadores de distúrbios reprodutivos em bovinos, embora em muitos destes casos, o diagnóstico conclusivo não seja estabelecido. Acredita-se ainda que, o consumo de *S. brasiliensis* possa interferir nas funções gonadais de bovinos machos e fêmeas, já que o processo de mitose é fundamental no desenvolvimento dos oócitos, bem como na espermatogênese (Krabbe et al., 2015). Os APs presentes no *Senecio spp* promovem inibição da mitose em células que apresentam sistema enzimáticos citocromo P450, como é o caso das células das gônadas (Krabbe et al., 2015; Santos, 2017). Atualmente, são escassas as informações sobre o efeito deletério desses

compostos químicos para com o sistema reprodutivo em bovinos e recentemente foi observada a relação entre alterações em células luteínicas grandes do corpo lúteo que, microscopicamente apresentaram megalocitose, indicando ação direta dos APs nessas estruturas (Krabbe et al., 2015). Dessa forma, acredita-se que o *S. brasiliensis* possa causar dano gonadal que pode ser permanente ao ponto de interferir na função reprodutiva de animais, tanto em indivíduos machos como fêmeas, repercutindo diretamente na fertilidade dos rebanhos.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo reproduzir experimentalmente a intoxicação aguda por *S. brasiliensis* e comprovar os efeitos dos APs nos testículos de ratos Wistar pré-púberes e púberes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos

É estimado que acima de 10% das mortes de bovinos no RS ocorram devido à intoxicação por plantas. Esse dado representa aproximadamente 70 mil bovinos mortos por ano (Riet-Correa & Medeiros 2001) e cerca de 50% destas mortes são correlacionadas a plantas do gênero *Senecio* spp (Riet-Correa & Medeiros, 2001; Schild et al., 2004; Rissi et al., 2007), sendo a intoxicação por *Senecio* spp a principal causa-morte tóxica de bovinos na região central e sul do Rio Grande do Sul (Karam et al., 2004; Rissi et al., 2007). Nos bovinos, os sinais clínicos manifestam-se dias ou meses após a ingestão da planta, que normalmente evoluem até a morte do animal, associada principalmente à fibrose e cirrose hepática. Os sinais clínicos da doença podem regredir completamente, mas por se tratar de uma intoxicação crônica os animais poderão apresentar novamente os sinais da intoxicação meses mais tarde (Prakash et al., 1999).

A intoxicação crônica pelos alcaloides pirrolizidínicos (APs) causam grandes prejuízos caracterizados por acentuada mortalidade em rebanhos bovinos na região Sul do Brasil. Esses bovinos acabam apresentando dificuldade de ganho de peso e emagrecimento progressivo, culminando na maioria das vezes na morte desses animais (Krabbe et al., 2015).

No fígado, os principais aspectos histopatológicos observados são fibrose e megalocitose que, posteriormente, desencadeiam um quadro de cirrose hepática e proliferação de ductos biliares (Barros et al., 1992; Méndez, 1993; Pearson, 1993; Méndez & Riet-Correa, 2000). Os metabólitos pirrólicos primários de vida longa, são biotransformados a partir da ação enzimática do citocromo P450 nos hepatócitos (Kelly, 1993; Knight & Walter, 2001) e podem alcançar a circulação sistêmica (efeito de transbordamento) afetando outros tecidos, causando danos característicos de megalocitose em túbulos renais, fibrose e megalocitose de células Clara nos pulmões (Prakash et al., 1999; Nobre et al., 2004). É observada também lesão no sistema nervoso central (vacuolização), causada de forma secundária pela não metabolização hepática da amônia em ureia (hiperamonemia) (Barros et al., 1992).

Embora tenha sido relatado que plantas tóxicas possam induzir alterações reprodutivas de forma direta e indireta em bovinos, esses mecanismos de ação ainda não estão totalmente definidos (James et al., 1992; Riet-Correa et al., 2007, 2012; Tokarnia et al., 2012). Recentemente foi relatada a ocorrência de alterações histopatológicas no corpo lúteo de ovários que foram coletados de vacas prenhes que morreram de seneciose crônica (Krabbe et al., 2015). A condição de intoxicação está relacionada à ingestão de plantas como *S. brasiliensis*, uma das principais plantas tóxicas nativas que contém os APs e esses podem ser identificados em todas

as partes da planta. A presença destes APs vão desde os primeiros estágios de crescimento até o término do desenvolvimento vegetativo. Segundo Krabbe et al. (2015), a megalocitose visualizada no corpo lúteo de ovários de vacas intoxicadas por *Senecio*, possivelmente ocorreu pelo efeito antimitótico dos compostos pirrólicos que atuam diretamente na divisão nuclear, e também impedindo a divisão celular o que ocasionou megalocitose em células luteínicas grandes.

Os APs são agentes alquilantes que ligam-se facilmente às moléculas de DNA causando danos severos e irreversíveis nas células, o que ocorre pela inibição da divisão da cadeia de DNA resultando em células gigantes (megalocitose) que posteriormente se tornam apoptóticas. O processo de biotransformação primeiramente ocorre no fígado, onde os APs convertem-se a uma forma pirrólica reativa conhecida como de-hidropirrolizidinas, sendo estes metabólitos tóxicos primários, e como secundários o álcool pirrol (Prakash et al., 1999).

No estudo de casos de intoxicação em bovinos realizado na mesorregião Oeste do Rio Grande do Sul, entre os anos de 2011 e 2014, Krabbe et al. (2017) observou a ocorrência natural e abundante de diversas variedades de *Senecio* spp. A intoxicação por plantas desse gênero foi também apontada como uma das principais causas de morte de bovinos na região, sendo o consumo maior da planta nos meses em que ocorre escassez de forrageiras, momento este, que coincide com o período de inverno quando ocorre a germinação e o pleno desenvolvimento da planta que se mantém verde até a floração. Também pode causar sérios problemas que podem evoluir até o comprometimento testicular, refletindo assim na diminuição da fecundidade dos touros, refletindo na diminuição dos índices reprodutivos dos rebanhos (Karam et al., 2004; Cruz et al., 2010; Tokarnia et al., 2012; Krabbe et al., 2015, 2017).

Com base nos efeitos já reconhecidos dos APs contidos em plantas do gênero *Senecio* spp., evidenciados em múltiplos tecidos (fígado, rins, pulmão e sistema nervoso), foi descrito que essa ação deletéria é capaz de causar danos também no sistema reprodutivo pela presença de células luteínicas grandes com megalocitose no corpo lúteo de vacas com diagnóstico de seneciose (Krabbe et al., 2015), fazendo-se necessário a avaliação experimental da ação tóxica em tecidos gonadais, bem como caracterização das lesões e mecanismos pelos quais esses danos são gerados, buscando assim medidas de controle e possibilitando a orientação adequada para redução aos danos causados nos rebanhos de cria.

2.2 *Senecio* spp

Em várias regiões no mundo são encontrados plantas nativas do gênero *Senecio* spp, estas plantas contém APs, que estão presentes em todas as partes da planta e que, ao serem consumidas por animais de produção, acarretam perdas econômicas marcantes na atividade pecuária e de criação de animais (Carvalho & Maugé, 1946; Basile et al., 2005). Das espécies de plantas desse gênero existente no Brasil a mais difundida e de grande importância toxicológica está o *S. brasiliensis* (Maria-Mole, tasneirinha ou flor-das-almas) (Fig. 1) que possui presença marcante nos campos nativos e cultivados, margens de estradas, córregos, bordas de matas, campos úmidos e em áreas brejosas, ocorrendo em todos os estados da região sul e estendendo-se até pequenas áreas na região sudeste onde desenvolve-se naturalmente em seu habitat, sendo pouco exigente em condições de solo (Motidome & Ferreira, 1966; Basile et al., 2005; Pessoa et al., 2013; Oliveira et al., 2015).



FIGURA 1 - (A) *Senecio brasiliensis* em estado de crescimento vegetativo; (B) *Senecio brasiliensis* em floração; (C) inflorescência de *Senecio brasiliensis*.

A intoxicação natural em bovinos por plantas do gênero *Senecio* spp já foram descritas em diversos países como: Alemanha, Argentina, África do Sul, Canadá, Estados Unidos, Grã-Bretanha, Paraguai, Uruguai e entre outros (Tokarnia & Dobereiner, 1984; Basile et al., 2005).

Nas intoxicações experimentais com bovinos que apresentaram evolução na forma aguda a morte ocorreu entre 22 a 25 horas após a ingestão da planta e subaguda entre 16 e 21 dias; casos crônicos apresentaram sinais clínicos que podem ser observados de 2 a 92 dias após a ingestão da planta (Tokarnia & Dobereiner, 1984). Em condições normais as intoxicações em bovinos geralmente ocorrem de maneira crônica, com sinais clínicos evidentes variando entre 72 à 144 horas após a ingestão (Barros et al., 1987; Méndez et al., 1987; Driemeier et al., 1991).

A toxicidade e a sensibilidade ao princípio tóxico é variável, acredita-se que animais que consomem quantidades pequenas da planta durante um período prolongado cursam com uma lesão gradual no fígado e sem o aparecimento dos sintomas clínicos evidentes, desencadeando os sinais clínicos e o agravamento da doença após longos períodos posterior ao consumo da planta, momento este em que a lesão hepática está grave e uma única dose é capaz de desencadear a morte, situação esta em que é configurado a ação progressiva da toxicidade pelos agentes das pirrolizídnas (Tokarnia & Dobereiner, 1984; Basile et al., 2005).

Em propriedades onde ocorreram surtos de seneciose na região da campanha foi constatado que *S. brasiliensis* foi predominante, seguido por *Senecio selloi*, *Senecio oxyphyllus*, *Senecio heterotrichius*, *Senecio leptolobus* e *Senecio madagascariensis*, nessas propriedades em geral foi observado pouca oferta forrageira seja de campo nativo ou pastagem de boa qualidade, enquanto que as populações de *Senecio* encontravam-se em todos os estágios vegetativos e bom vigor, foi notado também que estas propriedades apresentavam sobrecarga de animais em áreas de pastoreio (Karam et al., 2004; Cruz et al., 2010; Stigger et al., 2014; Krabbe et al., 2017).

Predominantemente as intoxicações por *Senecio* spp são relatados acometendo bovinos adultos em sistema de pastoreio (Karam et al., 2004; Tokarnia et al., 2012). Essas intoxicações causadas por *Senecio* spp acarretam em consideráveis perdas econômicas no Rio Grande do Sul e é considerada como a segunda causa de morte entre bovinos, superada somente pela tristeza parasitária (Riet-Correa & Medeiros, 2001; Karam et al., 2004; Pessoa et al., 2013; Krabbe et al., 2017; Panziera et al., 2018).

Bovinos que consumiram *Senecio* spp, podem apresentar lesões hepáticas subclínicas meses após terem cessado o consumo da planta, podendo morrer devido a evolução da ação das lesões decorrente da ação dos APs (Betty & Marksom, 1954, Lloyd, 1957, Tokarnia & Dobereiner, 1984; Panziera et al., 2018). A intoxicação por APs pode ser caracterizada como aguda quando este é consumido em doses elevadas e a doença cursa em morte rápida, variando de poucas horas até 72 horas.

Os APs contidos no *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less, foram analisadas e apontadas como altamente tóxico, e com capacidade de induzir toxidez aguda e causar morte em modelos experimentais ocorrendo em menos de 24 horas, e mesmo quando a planta for dessecada e armazenada por períodos superiores a 23 anos e em condições variáveis de luminosidade, temperatura e umidade apresentam-se viáveis (Tokarnia & Dobereiner, 1984; Barros et al., 1989; Santos-Melo et al., 2002; Tokarnia et al., 2012).

O efeito tóxico dos APs é variável entre espécies animais, isso é devido a eficácia da metabolização e bio-eliminação destes metabolitos tóxicos, o que é particular a cada espécie, sendo esta toxicidade observada no material vegetal que contém pirrolizidinas na seguinte correlação: suínos 1 unidade, frangos 5 unidades, equinos e bovinos 14 unidades, ratos 50 unidades, camundongos 150 unidades, caprinos e ovinos 200 unidades (Hooper, 1978). Já com relação a planta, os níveis de APs podem variar em função do estágio vegetativo, solo e outros fatores ambientais; e a maior concentração dos APs é encontrada nas extremidades florais. (Hirschmann et al., 1987).

2.3 Alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides pirrolizidínicos (APs) são formados por compostos químicos tóxicos produzidos no processo de biossíntese e são encontrados em diversas plantas. A planta *S. brasiliensis* possui em sua composição principal os alcaloides integerrimina e a senecionina, e como componente secundário o alcaloide retrorsina (Trigo et al., 2003) (Fig. 2). Esses alcaloides são compostos químicos muito estáveis, sendo convertidos em metabólitos tóxicos denominados ésteres pirrólicos (de-hidropirrolizidinas) e álcoois pirrólicos pelas enzimas nonooxigenases de função mista presentes principalmente no fígado (McLean, 1970; Prakash et al., 1999).

Esses derivados pirrólicos são reativos e por sua vez inibem o processo de mitose, ocasionando megalocitose e posterior morte celular (Prakash et al., 1999; Radostitis et al., 2002). Em animais e humanos os principais gêneros de plantas envolvidos nas intoxicações espontâneas e medicinais são causados por plantas do gênero *Senecio spp*, *Crotalaria*, *Heliotropium* e *Echium* (Cheeke, 1994; Lucena et al., 2010).

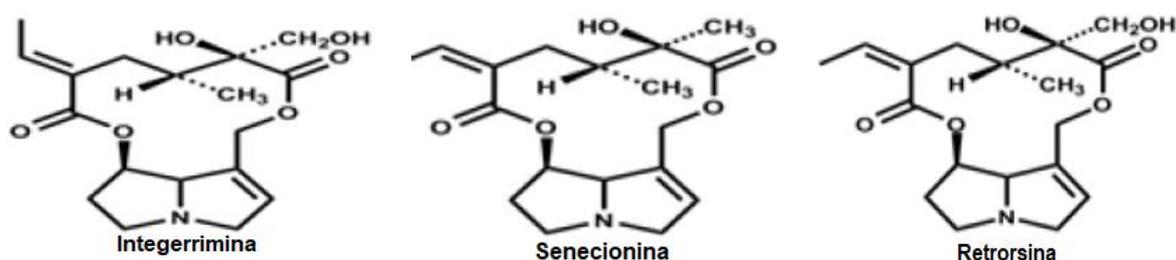


FIGURA 2 - Forma estrutural dos principais alcaloides pirrolizidínicos encontrados em *S. brasiliensis*. (Fonte: Sandini et al. 2013).

2.4 Toxicodinâmica dos alcaloides pirrolizidínicos

Após os processos de detoxificação hepática, os APs acabam sendo convertidos a formas altamente reativas, conhecidas como de-hidropirrolizidinas e posteriormente ao álcool pirrol (McLean, 1970; Prakash et al., 1999). Essas formas apresentam efeito hepatotóxico, acarretando diversas lesões hepáticas que evoluem para a insuficiência do órgão (Haraguchi, 2003; Pilati & Barros, 2007). Nesse processo é observada ação reativa que bloqueia o processo de mitose, ocasionando megalocitose e morte celular, proliferação de células de ductos biliares e fibrose periportal devido aos processos de degeneração, regeneração e morte celular com aumento de fibroblastos com fibrose difusa (Karam et al., 2004; Panziera et al., 2018). Também em alguns casos são visualizados hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos, hemorragias multifocais, nódulos regenerativos, células inflamatórias, espessamento da cápsula de Glisson ou necrose centrolobular (Karam et al., 2004). Os padrões histopatológicos da lesão hepática podem variar dependendo da evolução e tempo de intoxicação (Grecco et al., 2010).

A dose tóxica para bovinos é variável entre 0,5 a 5 g/kg/dia de folhas verdes nas intoxicações crônicas (Prakash et al., 1999; Haraguchi, 2003; Basile et al., 2005).

Animais intoxicados por APs podem apresentar sinais clínicos cursando com quadros neurológicos muito graves como andar a esmo, andar cambaleante, disfagia, movimentos de pedagem, perda de tônus da boca e compressão da cabeça (Pilati & Barros, 2007; Panziera, 2014). As alterações observadas no sistema nervoso são descritas como encefalopatia hepática, que é apresentada como degeneração esponjosa (*Status spongiosus*) ocorrendo na substância branca do SNC (Summers et al., 1995; Ilha et al., 2001). As lesões histopatológicas consistem em edema nas bainhas de mielina na substância branca do encéfalo e formação de vacúolos periaxoniais bem delimitados conferindo o aspecto esponjoso ao tecido, apresentando maior aspecto de espongiose em regiões do mesencéfalo, tálamo, e pedúnculos cerebelares (Kellerman et al., 1988; Ilha et al., 2001; Karam et al., 2004; Panziera et al., 2017). Essas lesões estão associadas à forma secundária da lesão ocorrida no fígado ao qual este órgão perde a capacidade de eliminar metabólitos tóxicos do organismo sendo um dos principais a amônia, e resultando na síndrome hepatocerebral (Kellerman et al., 1988; Ilha et al., 2001).

A nível pulmonar, tem-se como principais alterações histológicas associadas a intoxicação por APs a presença de edema, pneumonia intersticial fibrosante difusa, espessamento de septos interalveolares, infiltrado inflamatório mononuclear caracterizado principalmente por macrófagos espumosos (Santos et al., 2008).

2.5 Risco para saúde pública

As principais evidências da ação tóxica causada por APs em humanos é a doença veno-oclusiva, onde ocorre à oclusão parcial ou total na região centrolobular que posteriormente progride para substituição por tecido fibroso (Odriozola et al., 1994; Prakash et al., 1999).

As intoxicações por plantas tóxicas podem ser variáveis de acordo com a época do ano e a idade da planta. A hepatotoxicidade em humanos decorrentes da intoxicação por APs é bem estabelecida e dose-dependente. Esta intoxicação foi descrita pela primeira vez na África do Sul onde ficou conhecida como “doença do Senecio”, seguido por casos relatados na Jamaica onde crianças desenvolviam ascite, hepatomegalia e eventualmente cirrose por ingestão de chás.

A DVO ocorre em pequenos ramos venosos intra-hepáticos propiciando uma oclusão não trombóllica parcial ou total, devido a formação de tecido conjuntivo frouxo no sub-endotélio. Essa patologia provavelmente é decorrente dos processos inflamatórios ou destruição do endotélio vênular, foram observado frequentemente necrose em hepatócitos perivenulares com posterior colagenização e esclerose. A deficiência no fluxo venoso resulta em congestão hepática, necrose centrolobular, fibrose ou cirrose resultando em falência hepática aguda (Stickel, 2005).

As espécies de *S. brasiliensis* (maria-mole), são normalmente consumidas como alimentos, como fitomedicamentos e algumas vezes ocorre contaminação de cereais na agricultura (César, 2003).

2.6 Testículos e espermatogênese

Os testículos, possuem duas funções principais que são a produção hormonal (andrógenos) que induz as características masculinas aos indivíduos, e a produção de células germinativas que resultaram nos gametas masculinos (espermatozoides) pelo processo da gametogênese, responsáveis pela fecundação do óvulo e transmissão dos genes do reprodutor para a prole (Stanbenfeld & Edqvist, 1996; Junqueira & Carneiro, 2004).

A gônada masculina é envolvida externamente por uma grossa cápsula de tecido conjuntivo denso (túnica albugínea) que dá sustentação ao parênquima, sendo espessado na superfície dorsal dos testículos formando o mediastino do qual partem septos fibrosos que penetram no parênquima, que é subdividindo em compartimentos piramidais formando os lóbulos testiculares o qual é preenchido pelos túbulos seminíferos (Johnson, 1991; O'Donnel et al., 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

Os túbulos seminíferos são formados externamente por uma estrutura denominada de lâmina basal que é composta por fibrilas colágenas (colágeno tipo I) e por células mióides peritubulares. No interior existem dois grupos celulares as células de Sertoli e células germinativas (linhagem espermatogênicas) que progridem em direção centrípeta conforme a progressão da espermatogênese (Junqueira & Carneiro, 2004). Os gametas masculinos são produzidos no interior dos túbulos seminíferos (Stanbenfeld e Edqvist, 1996), sendo originários das células espermatogênicas que evoluem progressivamente pelos processos de mitose e meiose (espermatogônia, espermatócitos e espermátides – Fig. 3) e a diferenciação final em espermatozóides é chamada de espermiogênese, este grupo celular estão entremeados por células de Sertoli que são responsáveis pela sustentação, nutrição e fagocitose dos corpos residuais (Dadoune e Demoulin, 1993; Junqueira & Carneiro, 2004).

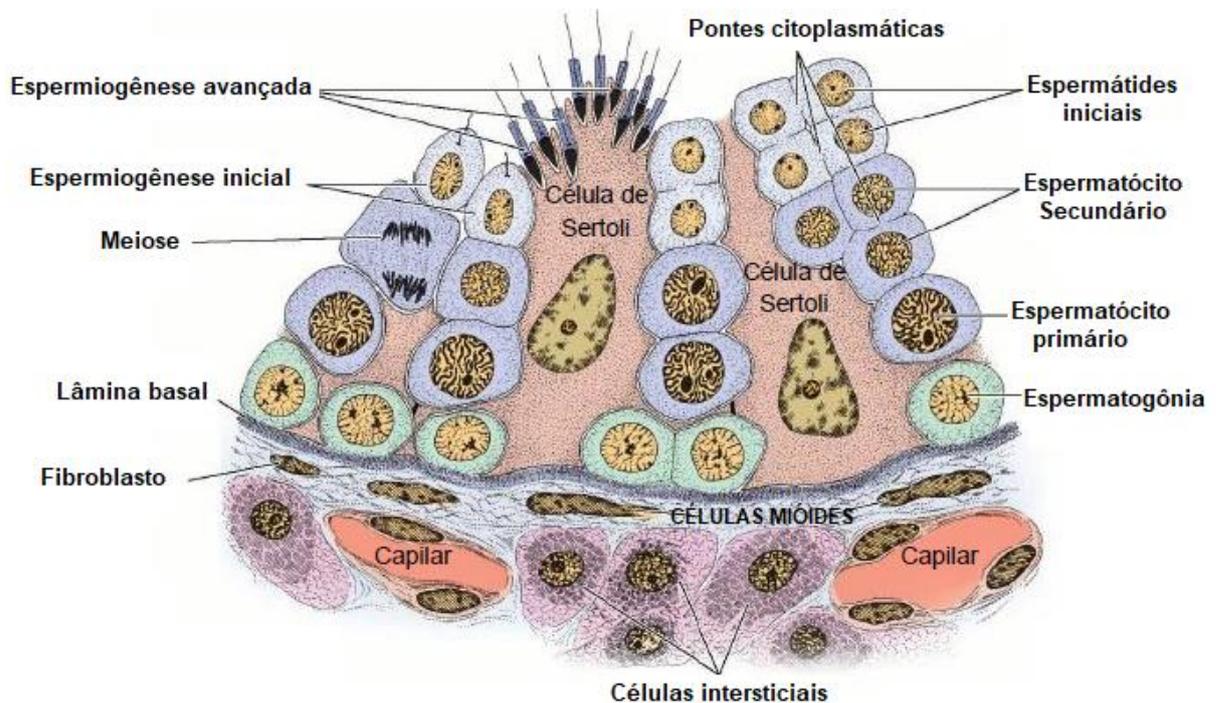


FIGURA 3 - Representação esquemática de porção de um corte histológico de túbulo seminífero, o túbulo seminífero é composto pela lâmina basal, e seu epitélio é formado por duas populações de celulares: as células de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica. Os túbulos seminíferos são contornados por células mióides, tecido conjuntivo, células intersticiais (Leydig) e vasos sanguíneos. Fonte: Histologia Básica, Junqueira & Carneiro 2004.

Ao iniciar a puberdade as espermatogônias começam a se dividir pelo processo de mitose produzindo sucessivas gerações de células. A mitose ocorre nas células da espermatogênese progressivamente desde a fase de espermatogônia tipo A (células tronco) até espermatogônias tipo B (células progenitoras) enquanto que o processo de meiose está compreendido entre as fases de espermatócito primário (primeira divisão meiótica) que

histologicamente são as maiores células da linhagem espermatogênica (distinguíveis pela presença de acrossomo no seu núcleo) e o espermatócito secundário (segunda divisão meiótica), seguido pelo processo de espermatogênese fase final em que as espermatídes transformam-se em espermatozoides (Junqueira & Carneiro, 2004). O espaço extra tubular é composto por tecido conjuntivo frouxo (fibroblastos) contendo numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e células de Leydig responsáveis pela produção de andrógenos do qual se destaca a testosterona, bem como outros esteroides incluindo o estrógeno (Dadoune e Demoulin, 1993; O'Donnel et al., 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

A fisiologia e anatomia testicular e seus envoltórios é bastante complexa, de modo a proporcionar o desempenho da função gonadal, e que este se mantenha a uma temperatura corporal interna variável entre 36,5°C e 37,5°C, temperaturas em desconformidade com essa média e ultrapassando o conforto térmico gonadal, podem resultar diversos comprometimentos fisiológicos e patológicos (Guyton e Hall, 2006).

Na maioria das espécies os testículos necessitam de uma temperatura que varia entre 2°C a 6°C inferior a temperatura corpórea, mantendo assim todas as suas funções fisiológicas como produção de hormônios e espermatogênese, esta função é controlada fisiologicamente pelo sistema neuroendócrino sofrendo influência direta da termorregulação escroto-testicular (Wanke & Gobello, 2006).

Os mecanismos estruturais que estão envolvidos na termorregulação gonadal são: o plexo pampiniforme composto por um emaranhado de artéria e veia ao qual contribui para a diminuição da temperatura sanguínea que chega ao testículo. Esse mecanismo está associado à transferência de temperatura entre sangue arterial e venoso, sendo dependente da diferença de temperatura, tempo de contato entre fluídos e distância entre os vasos. Esse mecanismo complexo é auxiliado pela túnica dartos e músculo cremaster os quais auxiliam na termo regulação no interior do escroto, favorecendo a distensão e aproximação das gônadas a superfície corpórea inguino-abdominal, essa região também conta com glândulas apócrinas responsáveis pela sudorese que acaba facilitando a eliminação de calor e umidade e está em contato com o ar para aumentar a dissipação do calor (Villares, 1976; D'Arce e Flechtmann, 1980; Gabaldi e Wolf, 2002; Nunes, 2005).

O plexo pampiniforme é capaz de diminuir em determinadas espécies de animais a temperatura gonadal em até 4°C em relação ao sangue arterial, os ovinos são uma referência notória, a diferença térmica sanguínea pode ser observada desde o canal inguinal interno até a camada externa do estroma gonadal (Hafez e Hafez, 2003).

A degeneração testicular é a patologia que mais contribui para a infertilidade de machos, devido ao fato do epitélio seminífero ser extremamente sensível, onde o processo degenerativo frequentemente ocorre em um processo agudo a crônico. Essas patologias gonadais podem ocorrer unilateral ou bilateralmente, de forma zonal ou difusa dependendo da etiologia. A degeneração testicular pode estar correlacionada a diversos fatores como: temperatura ambiente inapropriada, toxemia, infecção local, desequilíbrios nutricionais, alteração na vasculatura, traumas, intoxicações, dermatites, excesso de tecido adiposo no funículo espermático, distúrbios hormonais, fatores autoimunes, obstrução do epidídimo e agentes químicos (Nascimento et al., 2010).

O processo de regeneração testicular e o restabelecimento da função espermatogênica ocorre quando a degeneração das células do epitélio germinativo não for severa, podendo ocorrer a recuperação total da função testicular, pois espermatogônias, células de Sertoli e de Leydig possuem resistência relativa, permitindo o retorno da espermatogênese aproximadamente 60 dias (bovinos) após a remoção da causa primária. Esse fator é variável conforme a espermatogênese de cada espécie (Lagerlof, 1938; Nascimento e Santos, 2011).

Variados agentes tóxicos são descritos como causa primária nas patologias reprodutivas em machos. Romano et al. (2008), avaliaram a exposição ao herbicida glifosato em ratos pré-púberes, os quais apresentaram atraso significativo no início da puberdade. Estudos posteriores revelaram que a desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal causada pelo herbicida causa também alteração na arquitetura dos túbulos seminíferos e alterações na produção espermática (Romano et al., 2012).

A degeneração testicular pode ser avaliada através da observação histopatológica. Através dessa avaliação observa-se redução das células da linhagem germinativa, túbulos seminíferos contendo células gigantes multinucleadas, diminuição da espessura do epitélio germinativo, espermatogônias bizarras com vacúolos e citoplasma granuloso e núcleos picnóticos (Bezerra et al., 2008).

3 OBJETIVO

Geral

Desenvolver a intoxicação aguda por extrato aquoso de *Senecio brasiliensis* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e avaliar o dano testicular.

Específico

- Adaptar e padronizar o modelo experimental da intoxicação aguda por *S. brasiliensis* em ratos Wistar machos;
- Avaliar a toxicodinâmica dos alcaloides pirrolizidínicos contidos no *Senecio brasiliensis* no tecido testicular de ratos pré-púberes e púberes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e processamento da planta

Para a realização do experimento foram utilizadas partes superiores de *S. brasiliensis* (ramos, folhas e flores) (Fig. 4-A), em estágio de inflorescência, coletadas na primeira quinzena de outubro de 2016, realizada no município de Uruguaiiana – RS. Os ramos, folhas e flores foram desidratados à sombra (Fig. 4-B) e após este processo o material foi triturado em moinho de facas, obtendo assim o produto finamente moído (Fig. 4-C) que posteriormente foi embalado em pote hermeticamente fechado e identificado (Fig. 4-D), permanecendo acondicionado em temperatura ambiente e protegido da incidência direta de luz.

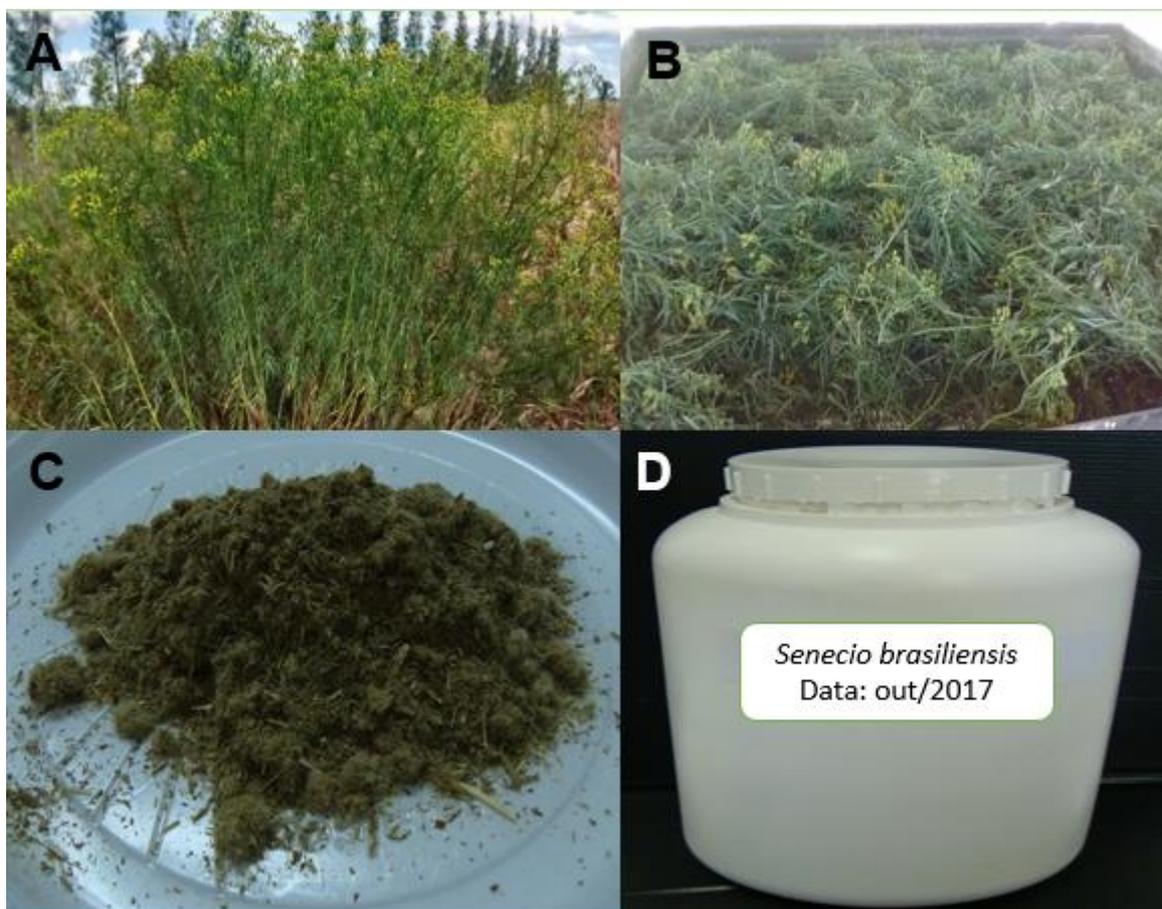


FIGURA 4 - (A) *Senecio brasiliensis* em estágio de coleta; (B) *Senecio brasiliensis* em esteira para secagem; (C) Planta triturada em moinho; (D) Acondicionamento da planta triturada.

4.2 Obtenção do extrato

Para a obtenção do extrato utilizou-se a correlação entre peso do animal e quantidade de *S. brasiliensis* a ser administrada; para cada rato utilizou-se a relação de 2g de *S. brasiliensis* para cada 100g do peso corpóreo. Após o cálculo da quantidade de *S. brasiliensis* a ser administrado por animal foi adicionado água destilada na relação 1:5 (10g planta seca X 50ml água destilada) para a obtenção do extrato aquoso e na sequência realizou-se homogeneização da infusão, que permaneceu em repouso e refrigerada (4°C) por 24h. A filtração foi realizada sob pressão manual em funil de vidro utilizando-se tela sintética fina com recuperação de 68% do extrato líquido. Essa quantidade corresponde a 6,8% do peso corpóreo (pc) do rato, obtendo assim a dose tóxica do extrato aquoso recuperado. A dose tóxica letal foi administrada em três frações (cada fração corresponde a 2,27% do pv) com intervalos de 4 horas.

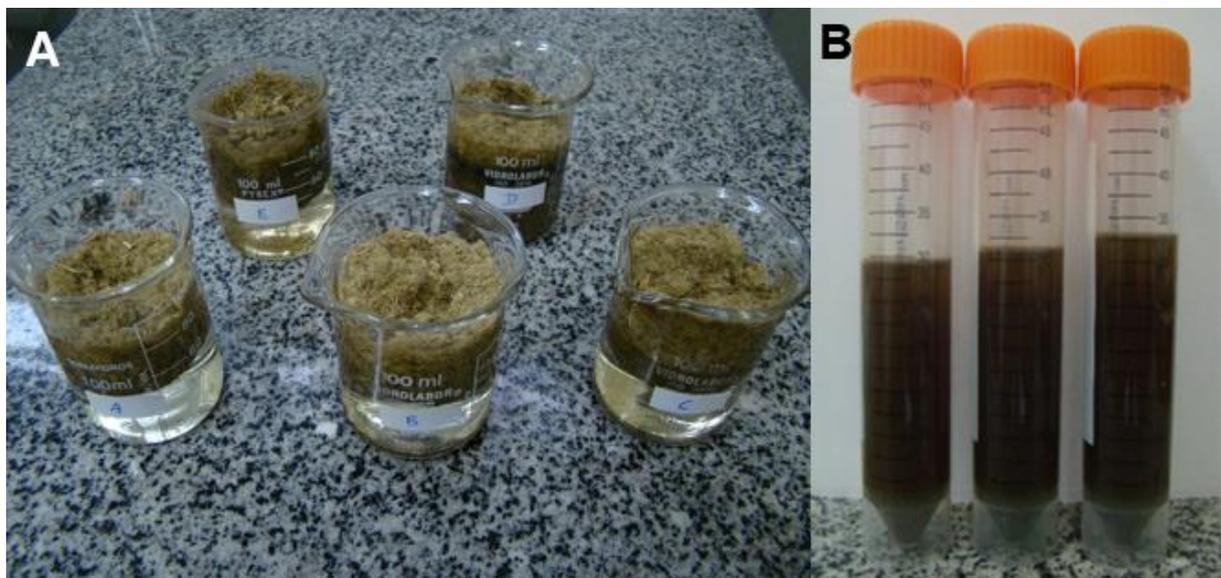


FIGURA 5 - (A) Preparo do extrato aquoso relação *Senecio*/água destilada “1X5”; (B) Extrato líquido recuperado (68% do volume de água destilada utilizada no processo de infusão).

4.3 Dose tóxica (letal)

A dose tóxica foi estabelecida e adaptada com base em experimentos anteriores realizados por Tokarnia & Dobereiner (1984) e parâmetros de toxicidade entre diferentes espécies de animais (Hooper, 1978). O que possibilitou aproximar a relação da dose tóxica necessária para o desenvolvimento da intoxicação na forma aguda em ratos Wistar (Tab. 1).

TABELA 1 – Correlação dose tóxica entre espécies, planta verde e planta dessecada.

	DOSE LETAL - INTOXICAÇÃO AGUDA	
	Planta verde g / Kg pc	Planta dessecada g / Kg pc
BOVINOS	35g	5,25g
RATOS (BOV. X 4)	(35g X 4) = 140g	21g

Obs.: A dose tóxica aguda pode variar devido à quantidade de APs contido na planta (extrato padrão).

4.4 Grupo piloto (GP)

Para a comprovação do efeito tóxico letal do extrato aquoso de *S. brasiliensis*, foi realizado sob aprovação do CEUA 044/2015 a intoxicação de três ratos adultos (Fig. 6) conforme protocolo padrão estabelecido para o experimento, para avaliação do efeito tóxico e a comprovação da intoxicação aguda, bem como evolução dos sinais clínicos e período até o desfecho da morte.



FIGURA 6 - Ratos grupo piloto. Ratos Wistar adultos, animais hígidos previamente a administração do extrato aquoso de *S. brasiliensis*.

4.5 Administração do extrato

A solução de extrato aquoso de *S. brasiliensis* foi administrada pelo método de gavagem orogástrica, em que cada rato recebeu respectivamente a dose letal (6,8% pc) conforme a relação do extrato obtido e o peso corpóreo individual (Fig. 7). A dose letal foi fracionada em três porções iguais, e administradas com intervalos de 4 horas, com jejum prévio de 12h, realizado para início do experimento. Após a primeira administração os ratos tiveram acesso a água e comida *ad libitum*, permanecendo nas mesmas condições ambientais que previamente foram adaptados.



FIGURA 7 - Administração do extrato aquoso de *S. brasiliensis* por gavagem.

4.6 Modelo e grupos experimentais

O experimento foi realizado no biotério da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) – Campus Uruguaiana. Para o experimento foram utilizados 23 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, sendo 10 ratos jovens pré-púberes com 43 dias de vida no momento da administração do extrato líquido e 13 ratos adultos púberes com mais de 120 dias, sendo 3 utilizados como grupo piloto. Os ratos foram mantidos em caixas de criação com alimentação comercial própria para roedores de laboratório e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura e luminosidade controlados (gabinetes para experimentação). A temperatura

manteve-se entre $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a iluminação artificial foi obtida por lâmpadas fluorescentes (40W), estabelecendo um fotoperíodo de 12 horas luz (entre as 7:00 e 19:00h) e 12 horas de escuridão. O protocolo experimental adotado foi padrão para todos os grupos utilizando-se a mesma metodologia. Os ratos foram aleatoriamente distribuídos nos grupos desafio e controle (Tab. 2). O grupo desafio recebeu por técnica de gavagem extrato aquoso de *S. brasiliensis* (em volume correspondente a 6,8% do peso corporal) e o grupo controle recebeu água destilada na mesma proporção (6,8% do peso corporal).

A eutanásia foi realizada *in extremis*, utilizando a indução por barbitúrico e transecção medular conforme protocolo experimental animal aprovado sob o registro CEUA 012/2017, UNIPAMPA. Todos os animais foram necropsiados logo após a morte, momento este em que foi efetuada a coleta dos órgãos para posterior avaliação histopatológica.

TABELA 2 – Distribuição e identificação dos grupos experimentais:

	GRUPO	GRUPO			GRUPO		
	Piloto	Pré-púbere			Púbere		
	Desafio	Controle	-	Desafio	Controle	-	Desafio
Rato I	GP I	A I		B I	A I		B I
Rato II	GP II	A II		B II	A II		B II
Rato III	GP III	A III		B III	A III		B III
Rato IV	-	A IV		B IV	A IV		B IV
Rato V	-	A V		B V	A V		B V

4.7 Avaliação macroscopia

Foi realizada avaliação visual e registro fotográfico dos principais órgãos e coleta de fragmentos com cerca de 1 cm de espessura de diversos órgãos, incluindo fígado, baço, intestino, adrenal, rim, estômago, bexiga, testículos, músculo esquelético, coração, pulmões e todo o sistema nervoso central (SNC). Os fragmentos foram acondicionados em solução de formol a 10% e após fixados, processados e corados, para avaliação histopatológica.

4.8 Avaliação histopatológica

Os fragmentos de tecidos fixados em formol foram clivados, processados rotineiramente para histopatologia e embebidos em parafina. Os testículos e fígado foram submetidos a cortes histológicos com cerca de 3 μm em micrótomo manual e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Cortes histológicos de testículo e fígado foram submetidos a avaliação microscópica (duplo cego). Imagens foram obtidas através de câmera digital Olympus associada a software cellSens 1.7. Os tecidos foram avaliados quanto ao tipo, a distribuição e a intensidade das alterações morfológicas.

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO PILOTO (GP) para padronização da intoxicação

Os ratos do grupo piloto após receberem a dose letal do extrato aquoso de *S. brasiliensis* (6,8% do pc) morreram em um período que variou entre 15 e 17 horas após a última administração do extrato conforme apresentado na tabela 3. Os sinais clínicos observados previamente à morte dos animais foram dispneia, pelos eriçados, letargia, convulsão e palidez nas extremidades, esses sinais clínicos individuais são apresentados na tabela 4. Os sinais clínicos manifestaram-se em diferentes graus de intensidade entre as avaliações nos ratos intoxicados devido a evolução da biodetoxificação. Foram observados pelos eriçados e depressão do sistema nervoso (Fig. 8), que evoluiu com intensidade significativa em média de duas horas antes da morte.

Na necropsia foram visualizadas mucosas pálidas, bem como alteração do padrão lobular (moteado) e congestão hepática intensa, conforme pode ser observado na tabela 5.

Microscópicamente, as lesões hepáticas foram caracterizadas por hemorragia difusa acentuada, megalocitose intensa, hepatócitos com citoplasma vacuolizado, apoptose e necrose difusa com maior intensidade nas bordas do fígado (Fig. 9). A intensidade e apresentação das lesões estão apresentadas na tabela 6.

TABELA 3 – Grupo Piloto - Dose, número de administrações e evolução da intoxicação até a morte dos ratos.

Piloto	Peso (g)	Dose letal do extrato mL (6,8% pc)	Nº administrações / intervalo 4 horas	Morte após última administração
P III	519	35,3	1 ^a – 11,8ml 2 ^a – 11,8ml 3 ^a – 11,7ml	15 horas
P I	450	30,6	1 ^a – 10,2ml 2 ^a – 10,2ml 3 ^a – 10,2ml	16 horas
P II	472	32,1	1 ^a – 10,7ml 2 ^a – 10,7ml 3 ^a – 10,7ml	17 horas

TABELA 4 – Grupo piloto: sinais clínicos observados nos ratos.

GRUPO / RATO	SINAIS CLÍNICOS
P I	1; 2; 3; 4; 5
P II	1; 2; 3; 5
P III	1; 2; 3; 5

Sem sinais clínicos (0); dispneia (1); pelos eriçados (2); letargia (3); convulsão (4); palidez de membros e orelhas (5).



FIGURA 8 – Ratos grupo piloto. Ratos com sinais clínicos: pelos eriçados.

TABELA 5 – Grupo piloto: alterações macroscópicas observadas.

Grupo / rato	Mucosas pálidas	Fígado	
		Acentuação padrão lobular	Congestão
P I	++	+++	+++
P II	++	+++	+++
P III	+	+++	+++

Ausente (-); grau leve (+); grau moderado (++); grau intenso (+++).

TABELA 6 – Grupo piloto: avaliação microscópica do fígado.

Grupo / rato	Hemorragia	Congestão	Megalocitose	Apoptose	Necrose	Degeneração	Leucocitose
P I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
P II	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
P III	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Ausente (-); grau leve (+); grau moderado (++); grau intenso (+++).

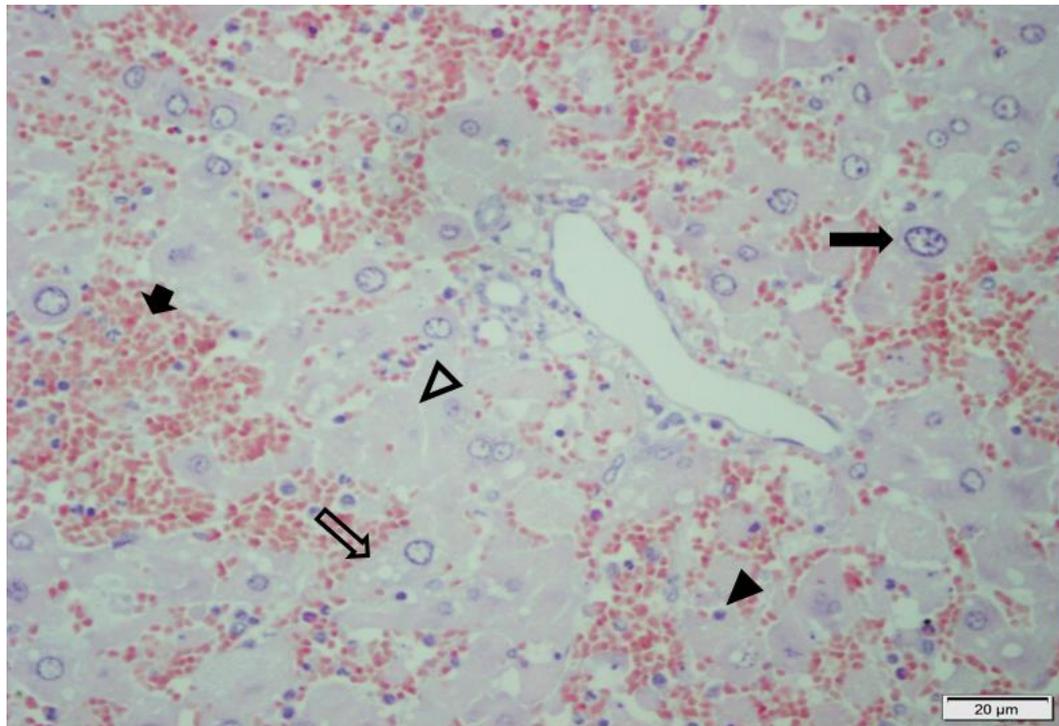


FIGURA 9 - Grupo Piloto - Rato “P II”. Fígado. Necrose (cabeça seta vazada) e hemorragia difusa acentuada (seta preta curta), megalocitose (seta preta longa), hepatócitos com citoplasma vacuolizado (seta preta vazada), núcleo picnóticos (cabeça seta preta). HE. Obj. 40X.

5.2 GRUPOS PRÉ-PÚBERES

5.2.1 Avaliação clínica dos ratos grupo pré-púberes da intoxicação ao desfecho morte

Logo após as administrações das dosagens, os ratos do grupo pré-púberes não apresentaram alterações (Tab. 7), assim como os ratos controle (Fig. 10).

O grupo B (grupo desafio) foi submetido à avaliação clínica e um dos ratos foi eutanasiado (B III) após apresentar sinais clínicos como pelos levemente eriçados e leve letargia

após 16 horas da última administração. Na necropsia não foi observado alterações macroscópicas significativas e os demais ratos do grupo foram acompanhados até sinais clínicos mais acentuados.

Os ratos BI, BII, BIV e BV apresentaram sinais da intoxicação caracterizados por sinais clínicos e morte entre 59 e 68 horas após a última administração do extrato. Os sinais clínicos observados variaram em tempo e intensidade sendo observados em um período aproximado de 2 horas previamente a morte dos ratos e corresponderam a pelos eriçados, letargia, quadro convulsivo (Fig. 11), palidez de extremidades dos membros e orelhas, líquido flutuante vermelho no interior da cavidade vaginal do escroto, esses achados foram classificados em estágios de leve, moderado a intenso e podem ser observados na tabela 8.

Os ratos pré-púberes controle (grupo A) foram submetidos a eutanásia em tempo equivalente a morte dos ratos intoxicados (grupo B) e não apresentaram qualquer alteração clínica.

TABELA 7 - Grupos pré-púberes (“A” controle e “B” desafio): peso dos ratos usados no experimento, volume extrato aquoso de *S. brasiliensis* e/ou água destilada administrado, número de administrações e desfecho da administração.

Grupo / Rato	Peso corpóreo (g)	Dose (mL) H ₂ O / Ext. aquoso	Nº de administrações / intervalo	Desfecho / horas
A III	211	14,35 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 16h
A I	185	12,58 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 59h
A V	229	15,57 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 59h
A IV	214	14,55 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 64,5h
A II	196	13,33 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 68h
B III	207	14,03 (E. A.)	3 / 4 h	Eutanásia / 16h
B I	188	12,74 (E. A.)	3 / 4 h	Morte / 59h
B V	222	15,05 (E. A.)	3 / 4 h	Morte / 59h
B IV	212	14,36 (E. A.)	3 / 4 h	Morte / 64,5h
B - II	189	12,81 (E. A.)	3 / 4 h	Morte / 68h

Obs. O volume da dose do extrato aquoso obtido corresponde a 6,8% em relação pv do rato.



FIGURA 10 – Grupo pré-púberes “A e B”. Ratos com 43 dias de idade, animais sem alterações clínicas após 2ª administração.

TABELA 8 - Ratos pré-púberes, grupo “B”: Sinais clínicos observados previamente a morte.

GRUPO / RATO	SINAIS CLÍNICOS
B I	1; 2; 3; 5
B II	1; 2; 3; 4; 5; 6
B III	2
B IV	1; 2; 3; 5; 6
B V	1; 2; 3; 5; 6

Sem sinais clínicos (0); dispneia (1); pelos eriçados (2); letargia (3); convulsão (4); palidez de membros e orelhas (5) e transudato modificado na cavidade escrotal (6).



FIGURA 11 – Grupo pré-púbere - Rato “B II”. Em decúbito dorsal durante quadro convulsivo, caracterizado por pelos eriçados, cauda e extremidades apendiculares pálidas, escroto com transudato modificado avermelhado na cavidade vaginal (seta preta).

5.2.2 Achados de necropsia ratos grupo pré-púberes (A / B)

Os principais achados de necropsia observados nos ratos intoxicados foram palidez acentuada das mucosas e extremidades, escroto com transudato modificado na cavidade vaginal (Fig. 12), pelos eriçados, ausência de diarreia. No exame interno observou-se o tempo de coagulação prolongado, órgãos internos congestos, hidrotórax, hidroperitônio, acentuação do padrão lobular hepático e congestão hepática (Fig. 13), cavidade vaginal com transudato modificado (origem peritoneal via canal inguinal), testículos apresentam moderada reserva de tecido adiposo próximo a cauda do epidídimo (Fig. 14), estômago com conteúdo, intestino com vasos sanguíneos congestos e conteúdo gastro intestinal sem alterações. As principais alterações macroscópicas podem ser observadas na tabela 9.

TABELA 9 – Ratos pré-púberes - Grupo “B”: Alterações macroscópicas e intensidade das lesões.

Grupo / rato	Hidrotórax	Ascite	Fígado		Transudato escrotal
			Acentuação padrão lobular	Congestão	
B I	+	+	+++	+++	-
B II	+++	+++	+++	+++	++
B III	-	-	-	-	-
B IV	+++	+++	+++	+++	+++
B V	+++	+++	+++	++++	+++

Ausente (-); grau leve (+); grau moderado (++); grau intenso (+++).



FIGURA 12 – Rato pré-púbere “B IV”. Escroto, após remoção da derme observa-se cavidade vaginal: com líquido avermelhado (transudato modificado) de origem cavitária (seta preta).

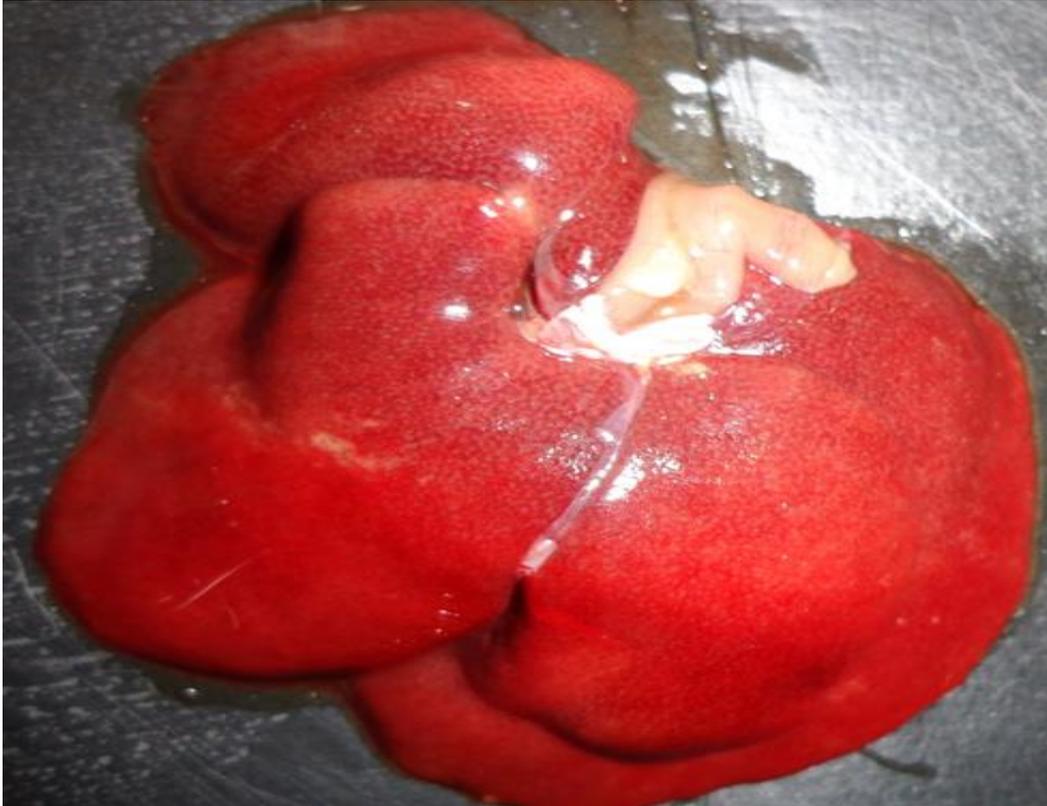


FIGURA 13 – Rato pré-púbere “B I”. Fígado com alteração e evidência da congestão e padrão lobular.



FIGURA 14 – Rato pré-púbere “B IV”. Testículo: coleta de testículos, apresentam moderada reserva de tecido adiposo na periferia da cauda do epidídimo.

5.2.3 Exame histopatológico ratos pré-púberes (A / B)

Microscopicamente, os ratos do grupo B (desafiados) apresentaram alterações nas estruturas hepáticas em diferentes graus de lesão sendo observadas áreas de necrose centrolobular difusa acentuada, com hemorragia, leucocitostase leve, congestão, megalocitose e degeneração (Fig. 15). As lesões hepáticas observadas no grupo pré-púbere B foram classificadas e quantificadas na tabela 10. Não foram observadas alterações significativas nos fígados dos ratos do grupo pré-púbere controle (A).

TABELA 10 – Grupo pré-púbere “B”: Alterações microscópicas observadas nos fígados de ratos intoxicados por *S. brasiliensis*.

Grupo / rato	Hemorragia	Congestão	Megalocitose	Necrose	Degeneração	Leucocitostase
B I	+	++	-	+	+++	++
B II	+++	++	++	+++	+++	+++
B III	-	-	-	-	+++	-
B IV	+++	++	++	+++	+++	+++
B V	+++	++	++	+++	+++	+++

Ausente (-); grau leve (+); grau moderado (++); grau intenso (+++).

Na avaliação dos testículos os ratos do grupo controle “A” apresentam túbulos seminíferos sem espermatozoides (Fig. 16), as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico (Fig. 16); o epidídimo apresenta ausência de espermatozoides na sua luz indicando assim o estágio de imaturidade sexual dos ratos pré-púberes (Fig. 17).

A avaliação histopatológica das lâminas dos testículos dos ratos desafiados (Grupo B) apresentaram necrose de células da camada germinativa, células da camada basal com núcleo basofílico e diminuição desorganizada com morfologia estrutural diminuída e células livres na luz tubular (Fig.16 e 18). Cortes da cabeça do epidídimo apresentam ausência de espermatozoides, compatível com animais fisiologicamente pré-púberes.

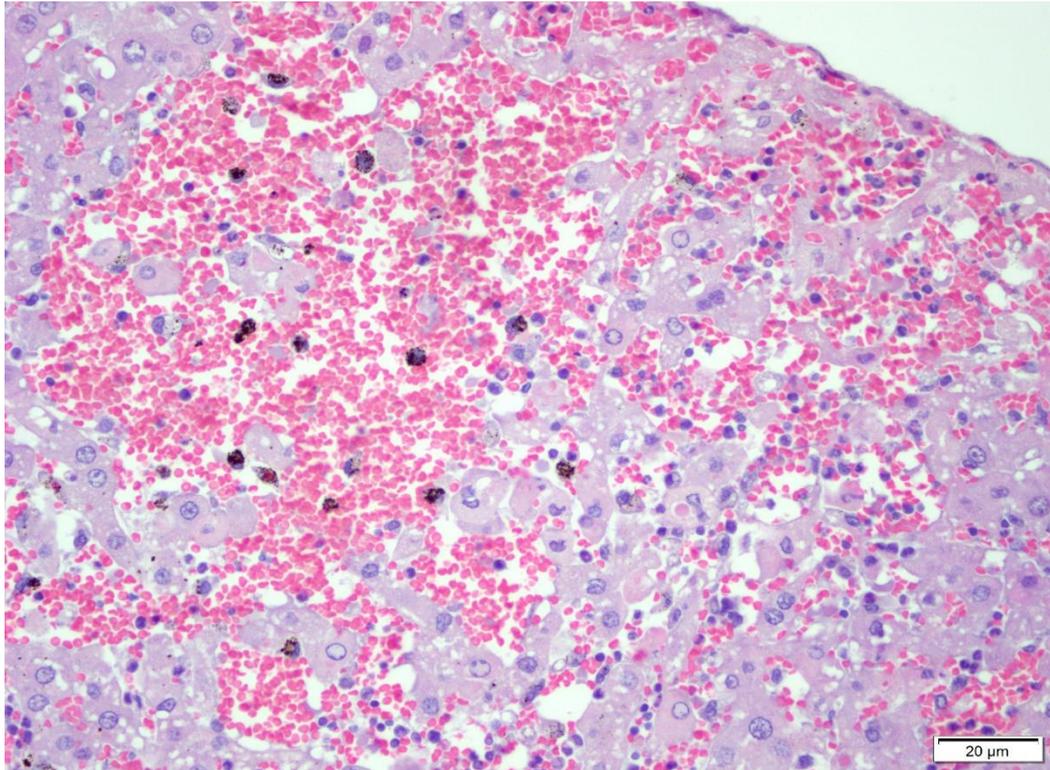


FIGURA 15 - Fígado grupo pré-púbere “B” - Rato intoxicado “B IV”, hemorragia difusa acentuada, hepatócitos (megalocitose, cromatina vacuolizada) necrose e apoptose. HE. Obj. 40X.

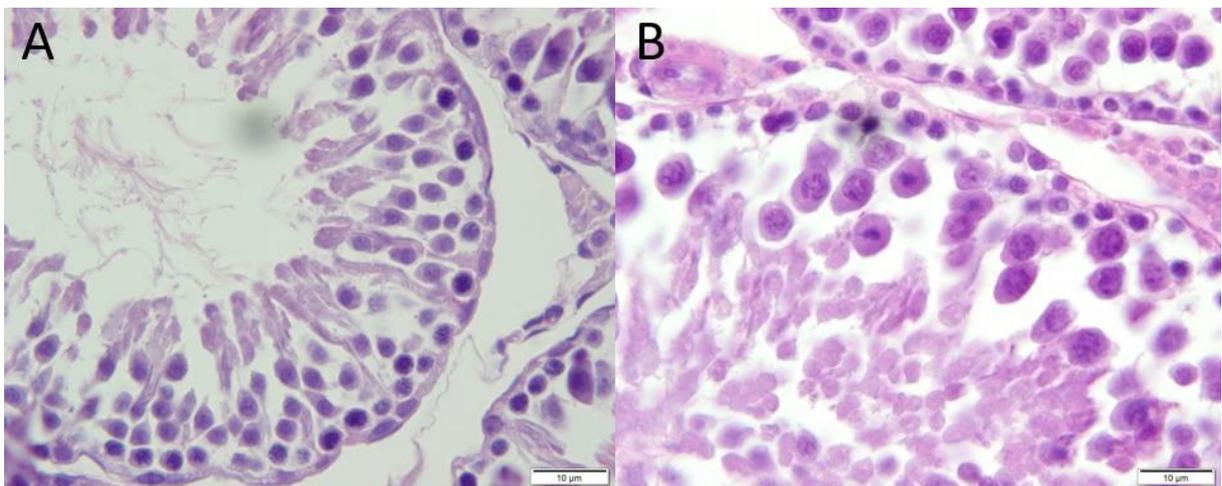


FIGURA 16 – Túbulos seminíferos grupo pré-púbere A e B - (A) Rato controle “AV”, túbulos seminíferos sem alteração. (B) Rato intoxicado “BV”, túbulos seminíferos com lumem reduzido, as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico e túbulos seminíferos apresentam degeneração e necrose, células germinativas com núcleo picnótico e desorganização com diminuição de células germinativas. HE. Obj. 100X.

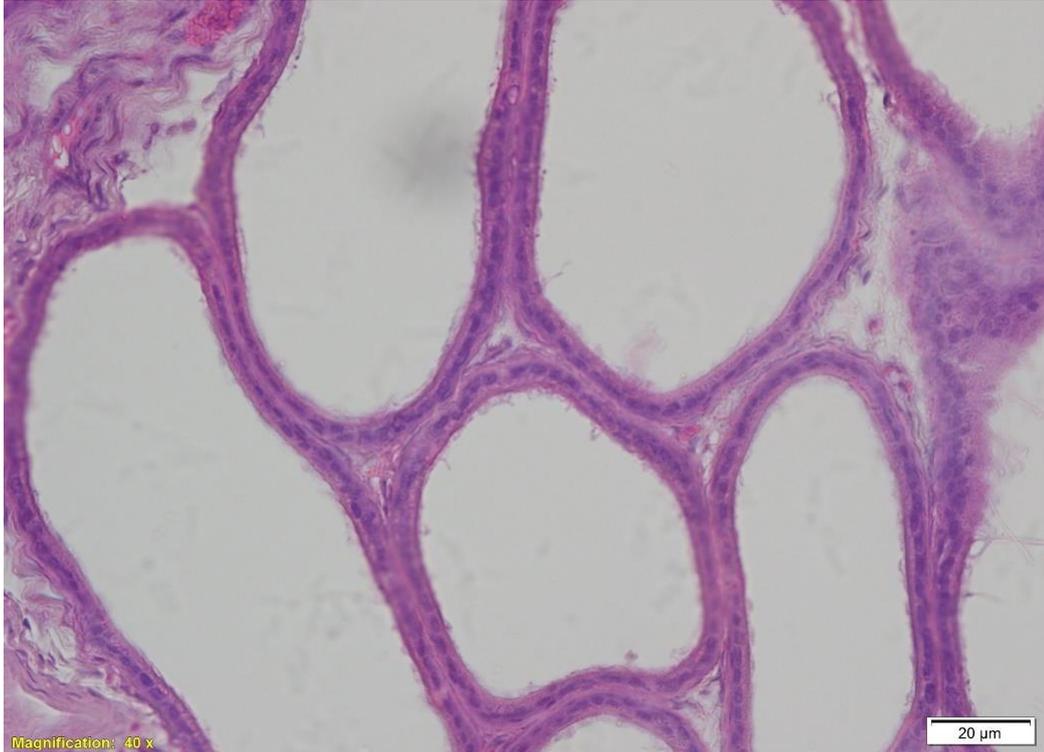


FIGURA 17 - Ductos cabeça do epidídimo- Rato pré-púbere “A V”. Ausência de espermatozoides na luz dos ductos, indicando a imaturidade sexual do rato. HE. Obj. 40X.

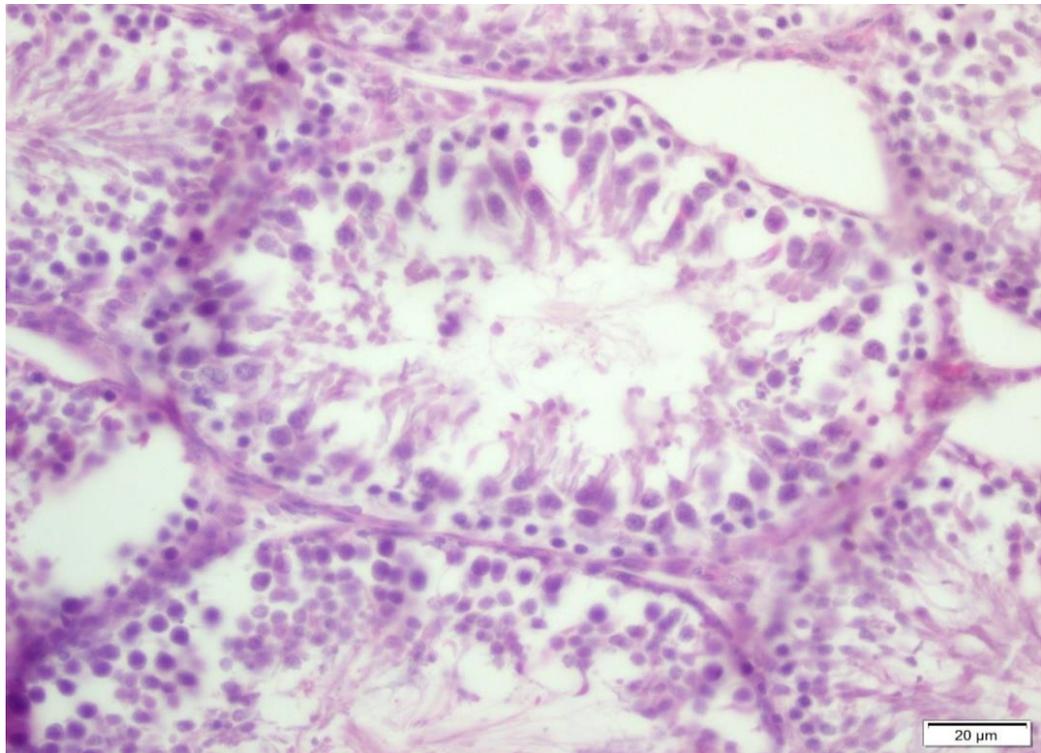


FIGURA 18 - Túbulos seminíferos - Rato pré-púbere “B III”. Lúmen aumentado, as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico com desorganização das células germinativas e diminuição do número de camadas de células germinativas. Túbulo seminífero central apresentando severa perda celular para a luz do túbulo. HE. Obj. 40X.

5.3 GRUPOS PÚBERES

5.3.1 Avaliação clínica dos ratos, grupo púbere da intoxicação ao desfecho morte

Após a administração das dosagens aos ratos dos grupos púberes (A e B), notou-se leve depressão transitória 3 horas após a última administração nos ratos do grupo intoxicado (B) (Fig. 19).

Foi possível observar sinais clínicos iniciais como pelos eriçados, depressão acentuada, dispneia (Fig. 20), e com a evolução da intoxicação acentuam-se significativamente observando-se dispneia, pelos difusamente eriçados, letargia, palidez de membros e orelhas, os quais foram dispostos na tabela 12.

Os ratos do grupo “B” intoxicados, apresentaram sinais clínicos acentuados característicos da intoxicação aproximadamente duas horas antecedendo a eutanásia. Os sinais clínicos evidenciados variaram em tempo e intensidade entre os indivíduos do grupo e a eutanásia foi realizada em um período compreendido entre 12 e 17 horas após a última administração do extrato (Tab. 11).

Os ratos DI, DII, DIII, DIV e DV, foram eutanasiados (*in extremis*) conforme a acentuação dos sinais clínicos, enquanto que os ratos do grupo controle “A” foram eutanasiados paralelamente ao animal do grupo intoxicado.

TABELA 11 – Grupos púberes “A” (controle) e “B” (desafiado): Peso dos ratos, volume extrato aquoso de *S. brasiliensis* e/ou água destilada administrado, número de administrações e desfecho após administração.

Grupo / Rato	Peso corpóreo (g)	Dose (mL) H ₂ O / Ext. aquoso	Nº de administrações / intervalo	Desfecho / horas
A III	443	30,12 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 12h
A IV	565	38,42 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 12h
A V	490	33,32 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 12h
A I	458	31,14 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 16h
A II	469	31,89 (H ₂ O)	3 / 4 h	Eutanásia / 17h
B III	423	28,76 (E. A.)	3 / 4 h	Eutanásia / 12h
B IV	429	29,17 (E. A.)	3 / 4 h	Eutanásia / 12h
B V	456	31,00 (E. A.)	3 / 4 h	Eutanásia / 12h
B I	493	32,70 (E. A.)	3 / 4 h	Eutanásia / 16h
B II	510	34,68 (E. A.)	3 / 4 h	Eutanásia / 17h

Obs. O volume da dose do extrato administrado corresponde a 6,8% em relação pv do rato.

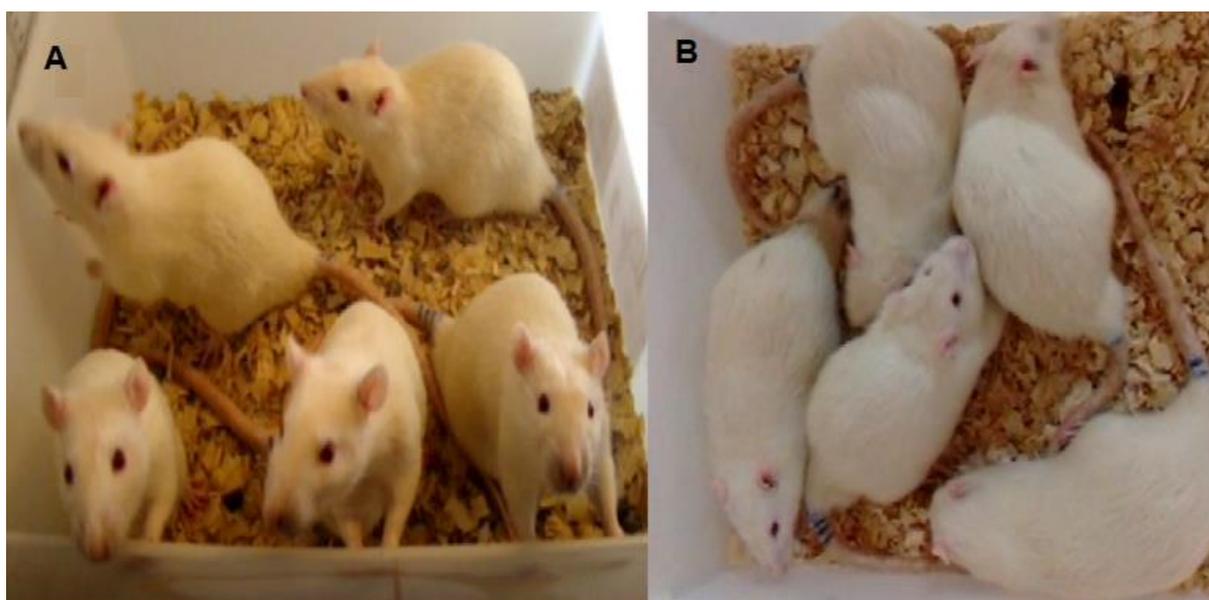


FIGURA 19 – Grupo púberes “A e B”. (A) Imagem obtida três horas após última administração. Ratos controle grupo C, sem alterações. (B) Ratos grupo D que receberam extrato aquoso *S. brasiliensis*, os ratos intoxicados apresentam leve depressão e pelos levemente eriçados.

TABELA 12 - Ratos púberes, grupo B: Sinais clínicos observados após a administração do extrato aquoso de *S. brasiliensis*.

GRUPO / RATO	SINAIS CLÍNICOS
B I	1; 2; 3; 5
B II	1; 2; 3; 5
B III	1; 2; 3; 5
B IV	1; 2; 3; 5
B V	1; 2; 3; 5

Sem sinais clínicos (0); dispneia (1); pelos eriçados (2); letargia (3); convulsão (4); palidez de membros e orelhas (5).



FIGURA 20 – Grupo púbere “B”. Ratos desafiados apresentando pelos eriçados, depressão acentuada, dispnéia.

5.3.2 Achados de necropsia ratos grupos púberes “A e B”.

Macroscopicamente, as ratos apresentaram, palidez das mucosas e extremidades e pelos eriçados. No exame interno foram observados órgãos com leve congestão, hidrotórax, acentuação do padrão lobular do fígado e congestão hepática (Fig. 22), estômago com conteúdo, intestinos com vasos sanguíneos congestos. As alterações observadas na avaliação de necropsia estão demonstradas e quantificadas na tabela 13, com diferenciação do grau de acometimento entre os indivíduos. Os testículos apresentavam moderada reserva de tecido adiposo nas regiões da cabeça e cauda de epidídimo, nota-se a visualização dos túbulos seminíferos com alguns de coloração mais brancacentos (padrão de mosaico) (Fig. 23).

Os ratos do grupo controle (C) não apresentaram alterações macroscópicas (Fig. 21).

TABELA 13 – Grupo púbere “B”: Avaliação macroscópica e intensidade das lesões.

Grupo / Rato	Hidrotórax	Fígado
		Acentuação padrão lobular
B I	-	++
B II	++	++
B III	-	++
B IV	-	+
B V	-	++

Ausente (-); grau leve (+); grau moderado (++); grau intenso (+++).

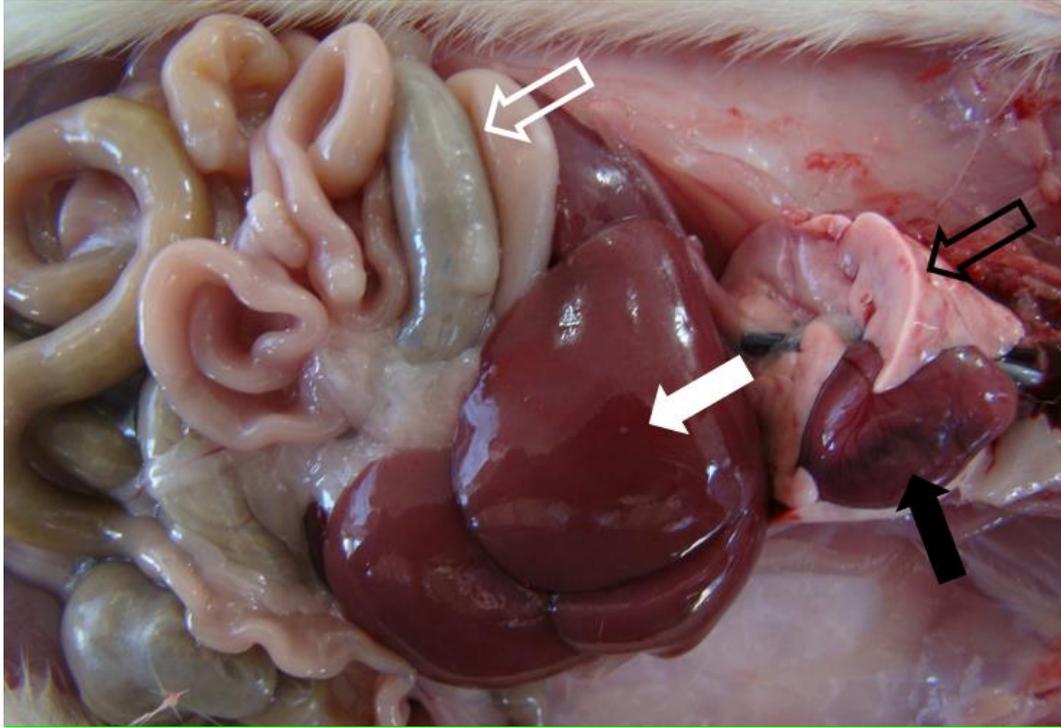


FIGURA 21 – Rato púbere, controle “A II”. Visualiza-se os principais órgãos sem alteração: fígado (seta branca), coração (seta preta), pulmão (seta preta vazada), intestino delgado e intestino grosso (seta branca vazada).

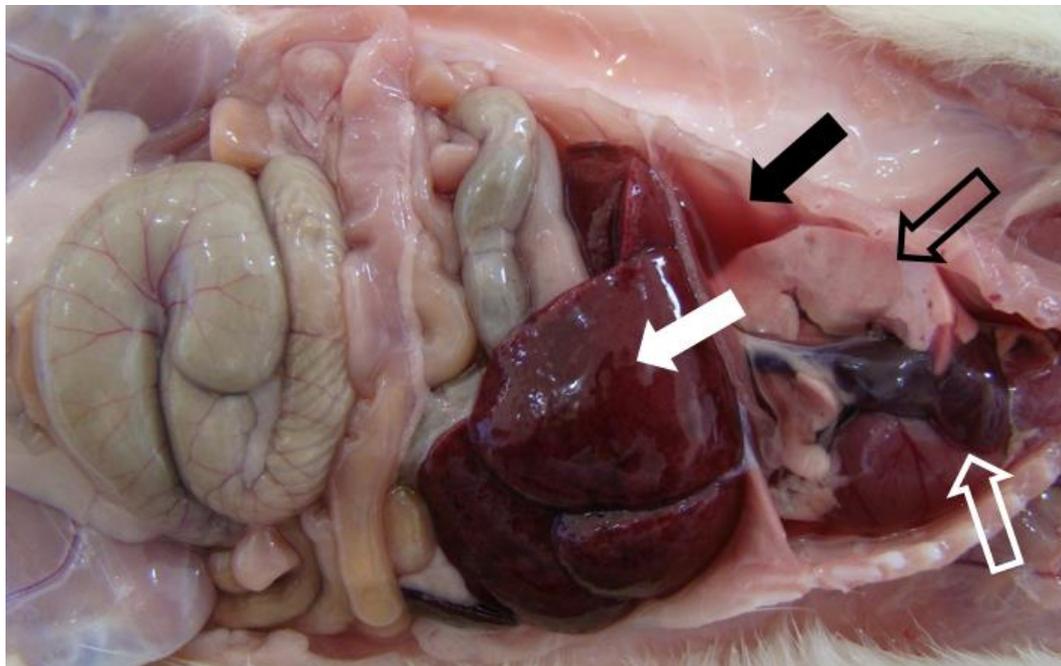


FIGURA 22 – Rato púbere, intoxicado “B II”. Visualiza-se: hidrotórax (seta preta), veia cava caudal ingurgitada (seta branca vazada), alteração do padrão hepático (seta branca) e pulmão (seta preta vazada).



FIGURA 23 – Rato púbere, “B II”. Testículo: coleta de testículos, apresentam acúmulo moderado de tecido adiposo na periferia da cabeça e cauda do epidídimo, visualiza-se túbulos seminíferos do parênquima testicular com padrão de coloração tipo mosaico.

5.3.3 Exame histopatológico ratos grupos púberes “A e B”

Observa-se no fígado dos ratos intoxicados (Grupo B) lesões caracterizadas por necrose centrolobular e mediozonal, além de leve infiltrado inflamatório neutrofílico com megalocitose moderada (Fig. 25). A necrose foi observada preferencialmente na periferia do lobo hepático e com distribuição multifocal à coalescente com intensa perda de hepatócitos, hemorragia e congestão acentuada, leucocitostase neutrofílica acentuada em sinusoides adjacentes em áreas de necrose.

São observados alguns hepatócitos mediozonais degenerados, com até quatro megalócitos por campo de maior aumento (40x) especialmente em áreas com menor quantidade de células necróticas. Os megalócitos caracterizavam-se por apresentarem cromatina mais frouxa e núcleo grande. Além disso observou-se grande número de hepatócitos com núcleo picnótico, o grau de lesão observado nas lâminas do tecido hepático estão descritas na tabela 14).

Os animais do grupo púbere controle (A) não apresentaram alterações dignas de nota (Fig. 24).

Cortes de testículo e epidídimo foram avaliados em ambos os grupos púberes “A e B”.

Os ratos do grupo B apresentaram leve a moderada diminuição do número de espermatídes iniciais e tardias com consequente diminuição do número de espermatozoides e em alguns túbulos seminíferos foram observadas células multinucleadas características de degeneração testicular (Fig.27). Foi possível observar quando comparado com o controle congestão de grandes vasos periféricos (na túnica vaginal). No lúmen dos túbulos seminíferos e no epidídimo foi observada considerável diminuição do volume de espermatozoides e presença de substância amorfa significativa (Fig. 29).

O Grupo púbere “A” não apresentou alterações microscópicas. Nos túbulos seminíferos dos ratos pode-se observar até 4 camadas de células germinativas com grande quantidade de espermatozoides; nos túbulos seminíferos apresentam quantidade significativa de espermatozoides (Fig. 26).

TABELA 14 – Ratos púberes, grupo B. Avaliação microscópica de fígado e intensidade das lesões.

Grupo / rato	Necrose	Hemorragia	Leucocitostase	Congestão	Megalocitose	Degeneração	Apoptose
BI	+++	++	+++	++	++	+	+
B II	++	+	++	++	+	+	++
B III	++	+	+	+	+	+	++
B IV	++	+	+	+	+	+	++
B V	++	+	++	++	++	+	+

Ausente (-); grau leve (+); grau moderado (++); grau intenso (+++).

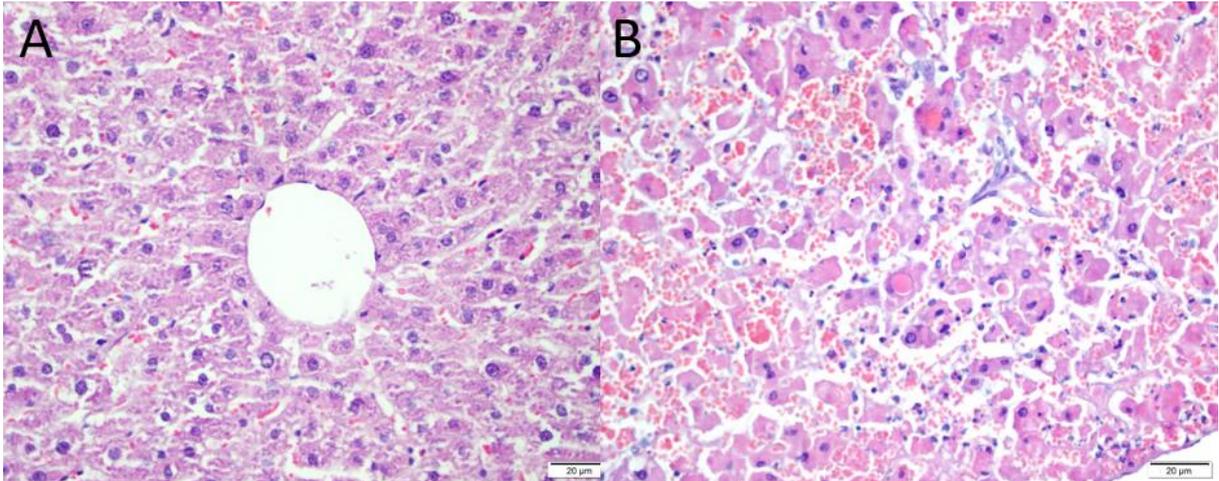


FIGURA 24 - Fígado, grupos púberes “A e B” – (A) Rato controle “A I”, espaço centrolobular sem alteração. (B) Rato intoxicado “B I”, hemorragia difusa acentuada, hepatócitos (múltiplos hepatócitos com núcleo picnótico, citoplasma vacuolizado) necrose e apoptose difuso acentuado HE. Obj. 40X.

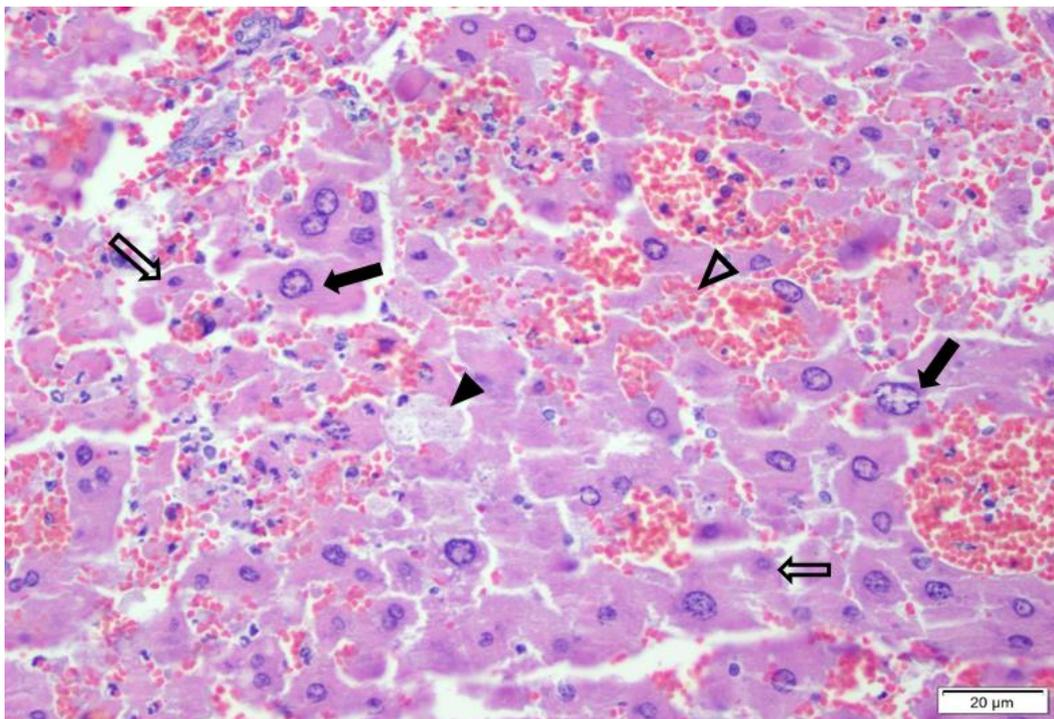


FIGURA 25 - Rato púbere intoxicado “B V”. Fígado. Espaço periportal. Apresenta núcleos picnóticos (setas vazada); hemorragia (cabeça de seta vazada); megalocitose (seta preta) e necrose (cabeça seta preta). HE. Obj. 40X.

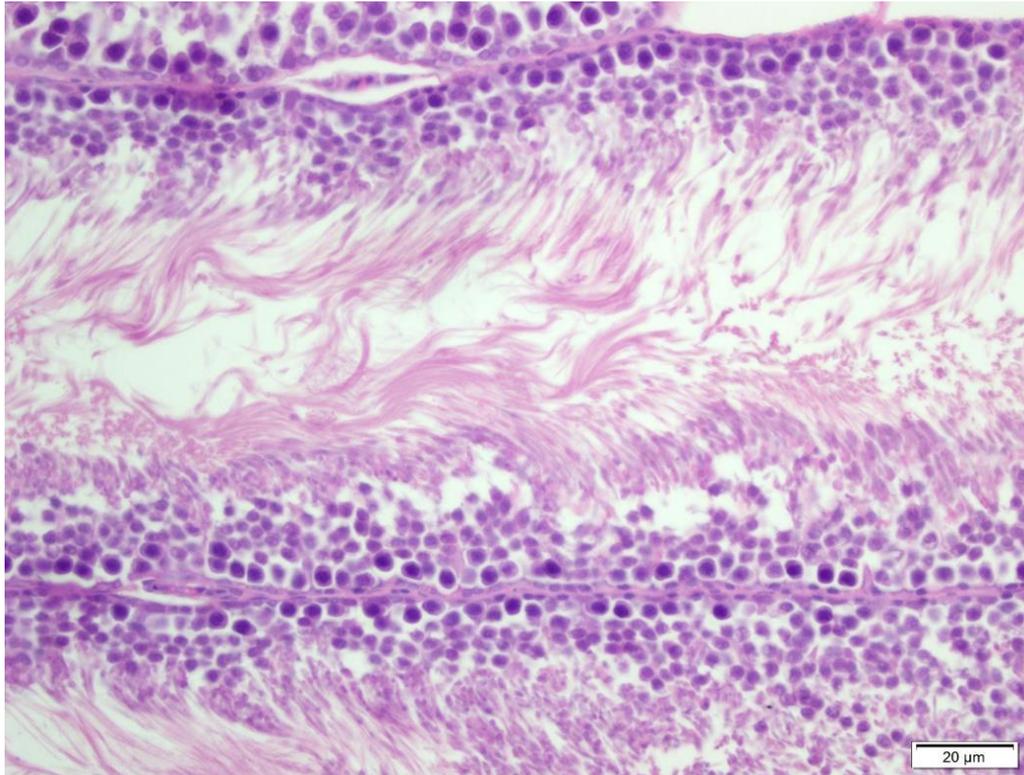


FIGURA 26 - Rato púbere, controle "A I". Corte longitudinal. Lumem diminuído onde visualiza-se as caudas dos espermatozoides, as células germinativas apresentam a cromatina normocoradas onde visualiza-se a divisão celular até espermatozoides. HE. Obj. 40X.

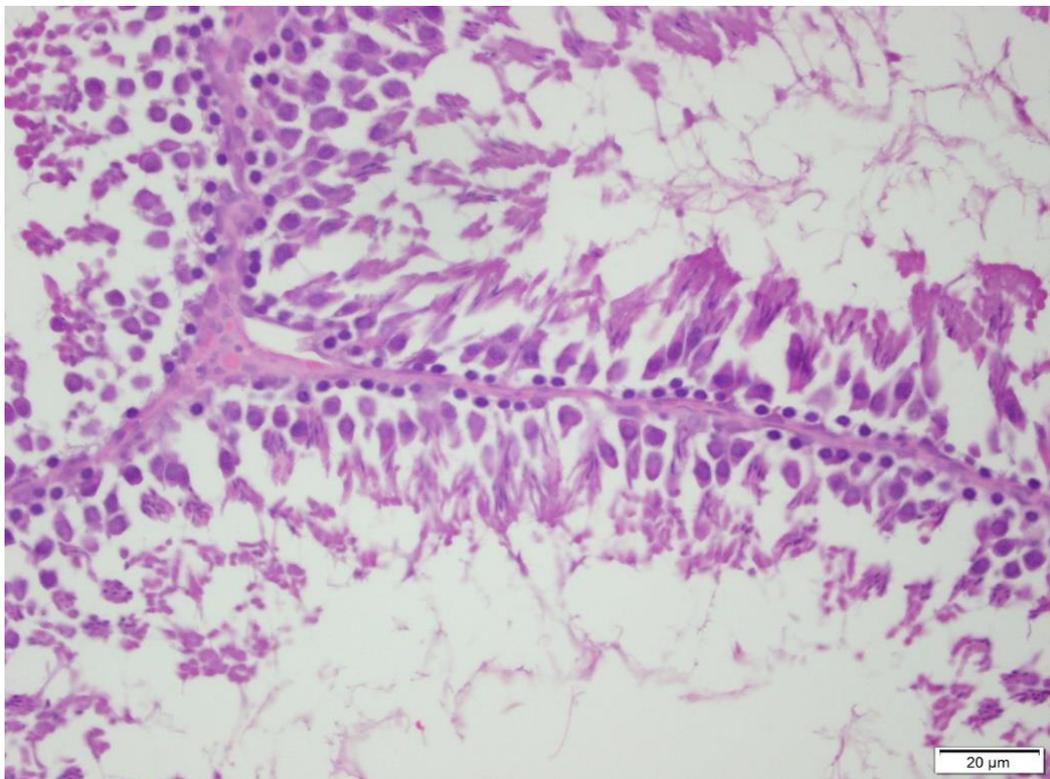


FIGURA 27 - Rato púbere, "B I". Túbulos seminíferos. Lumem aumentado, as células da camada basal apresentam o núcleo mais basofílico, visualiza-se descontinuidade das células germinativas e diminuição e perda das camadas adjacentes. HE. Obj. 40X.

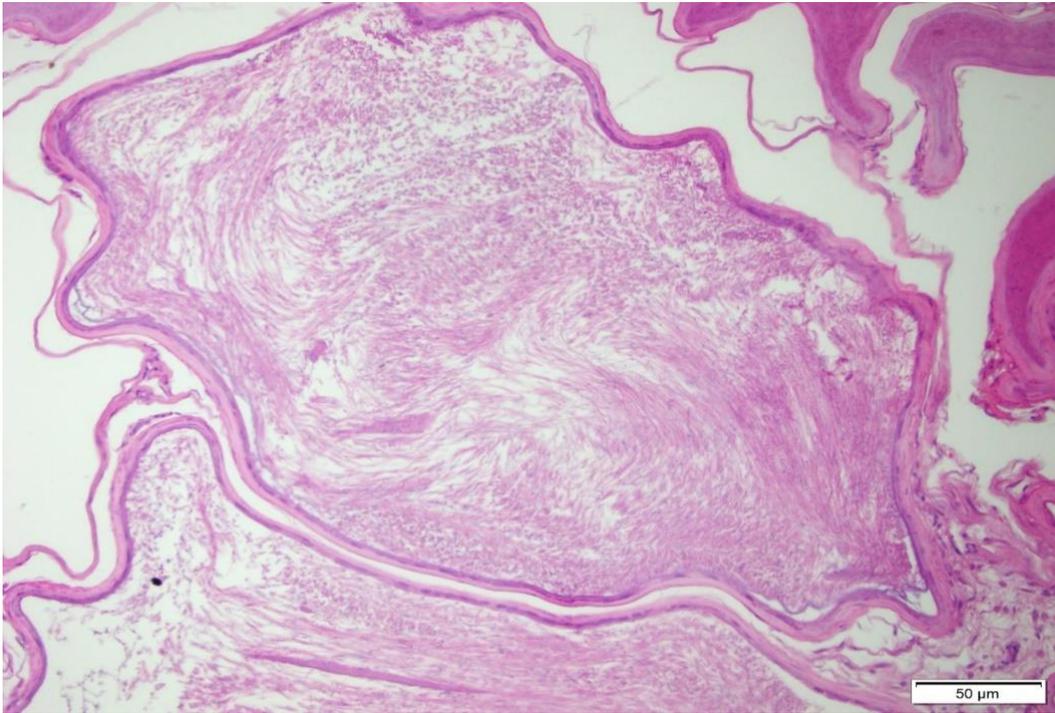


FIGURA 28 - Rato púbere, controle "A IV". Ductos cabeça do epidídimo. Presença de grande quantidade de espermatozoides, indicando a maturidade sexual do rato. HE. Obj. 20X.

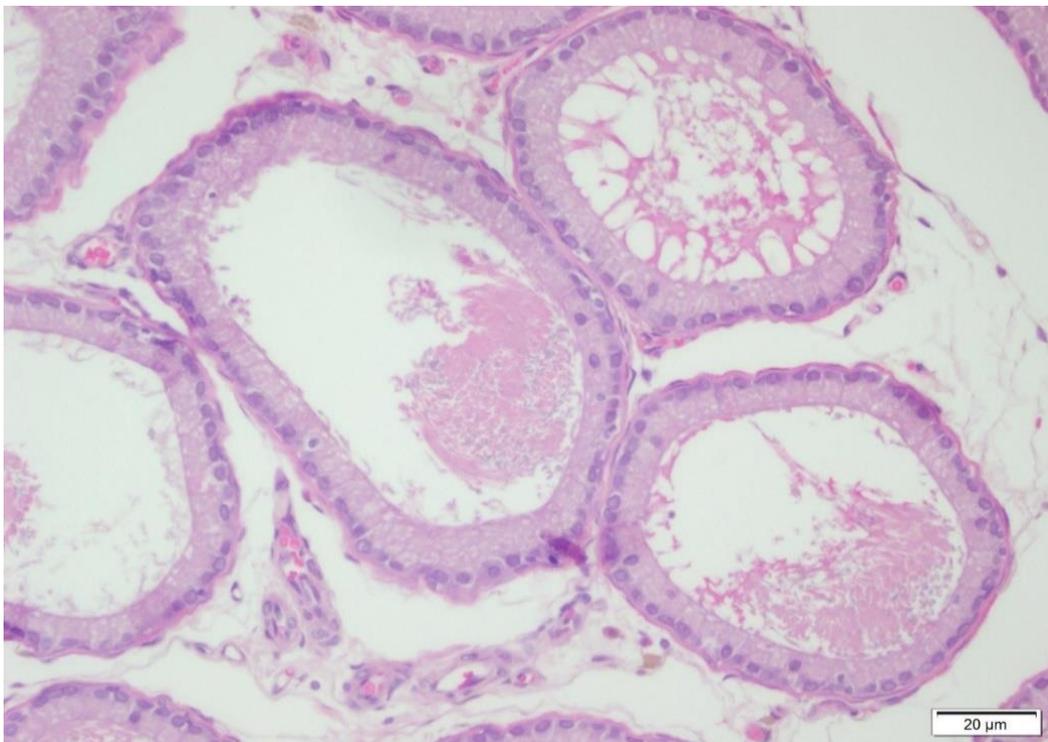


FIGURA 29 - Rato púbere, "B V". Ductos cabeça do epidídimo. Diminuição significativa de espermatozoides na luz dos ductos. HE. Obj. 40X.

6 DISCUSSÃO

A intoxicação por plantas tóxicas do gênero *Senecio* é a mais relevante causa de morte em bovinos, conseqüentemente repercutindo em grandes perdas econômicas na região sul do Brasil e principalmente no estado do Rio Grande do Sul, ao qual na região conhecida como pampa gaúcho concentra significativa porção do rebanho bovino (Pilati & Barros, 2007; Grecco et al., 2010; Panziera et al., 2018). Recentemente Krabbe et al. (2014) relatou a ocorrência de lesão direta causada pela intoxicação por plantas que contém APs, em células luteínicas. No entanto o efeito deletério causado por plantas tóxicas em animais é pouco conhecido (Anjos 2019, comunicação pessoal) bem como os estudos referentes ao impacto econômico causado pela intoxicação subclínica por APs nos rebanhos destinados à reprodução (Krabbe et al., 2014). No presente estudo foi possível desenvolver um modelo experimental adequado para estudo da intoxicação aguda por APs contido em *Senecio brasiliensis*, o que permitiu uma avaliação sistemática dos testículos de ratos púberes e pré-púberes. Alguns autores demonstram ação tóxica de APs para essa espécie, porém não foram encontrados estudos com avaliação do efeito gonadal dos APs em animais (Moraes, 1952; Gimmler-Luz & Erdtmann, 1998; Sandini et al., 2012; Osuigwe & Margret, 2017). O estudo permitiu ainda estabelecer um modelo para futuras análises de patogênese quanto a dano hepático causado por intoxicações em animais e humanos.

Os ratos macho Wistar (*Rattus norvegicus*) pré-púberes e púberes que receberam dose (6,8% pc) do extrato aquoso, desenvolveram a forma aguda da intoxicação, sendo a dose tóxica equivalente ao que foi reproduzido com a espécie bovina por Tokarnia & Dobereiner (1984), assim a dose tóxica letal que causou a morte aos ratos na forma aguda foi compatível aos níveis de intoxicação apresentado.

O quadro tóxico desenvolvido pelos ratos no experimento, foram similares em parâmetros de variação tóxica entre as espécies animais (Hooper 1978), e conforme as seguintes equivalências apresentadas, sendo ratos considerados 4 vezes mais resistentes que bovinos e equinos segundo Hooper (1978).

Os sinais clínicos observados (Tab. 4, 8 e 12), estes evoluíram progressivamente em um curto espaço de tempo antes da eutanásia ou morte. A evolução entre a apresentação dos sinais clínicos progressivos até a morte nos ratos foi em média de 2 horas. A rápida evolução entre a apresentação dos sinais clínicos até a morte na intoxicação aguda por *S. brasiliensis* também foi observada em ovinos com progressão dos sinais clínicos e morte entre 4 e 24h. (Grecco et al., 2012).

Os sinais clínicos observados nos grupos intoxicados variaram em grau e intensidade entre os ratos (evolução da biotransformação orgânica de cada indivíduo), que pode diferir entre as espécies animais por apresentarem diferentes processos enzimáticos de detoxificação dos APs (Hooper, 1978; Torres & Coelho, 2008). Também foi observado que ratos pré-púberes desenvolveram a evolução da intoxicação com intervalo latente superior aos ratos púberes, situação compreendida em relação a idade do animal, já que em animais mais jovens as enzimas do citocromo P450 são menos ativas do que nos animais adultos (Stewart & Hampton, 1987; Maclachlan e Cullen, 1998). As alterações clínicas citadas por (Riet-Correa e Méndez, 2007) em bovinos caracterizadas por quadros clínicos cursando com apatia, incoordenação, agressividade, tenesmo, diarreia, icterícia, ocasionalmente prolapso retal e incluindo emagrecimento progressivo são observadas normalmente em intoxicações crônicas, esses aspectos não devem ser confundidos com quadros agudos da intoxicação, embora apatia, sinais neurológicos, icterícia e fotossensibilização são relatados em ambas as formas clínicas (Corrêa et al., 2008; Basile et al., 2005; Grecco et al., 2012).

As alterações macroscópicas observadas nos ratos desafiados foram compatíveis aos quadros de intoxicação por plantas do gênero *Senecio* visualizadas e descritas em outras espécies como bovinos e ovinos (Basile et al., 2005; Grecco et al., 2012; Panziera et al., 2017).

Uma característica marcante nos ratos desafiados foi o transudato modificado (ascite), embora esse achado seja mais frequente em animais com a forma crônica da intoxicação por APs (Grecco et al., 2011, 2012; Krabbe et al., 2017; Panziera et al., 2017, 2018) também são aspectos relatados em experimentos com reprodução da forma aguda em bovinos e ovinos (Grecco et al., 2012; Panziera et al., 2017, 2018).

A intensa acentuação do padrão lobular do fígado foi outra característica marcante na intoxicação aguda nos ratos desse experimento. Ambos grupos apresentaram padrão moteado do fígado, característico de dano tóxico agudo centrolobular em humanos e animais causado por diferentes tipos de toxicantes (Santos et al., 2008; Sandini et al., 2013). Na avaliação macroscópica dos órgãos genitais, não foram observadas alterações significativas, embora três dos ratos (BII; BIV e BV) tenha apresentado efusão para cavidade da túnica vaginal em decorrência da acentuada ascite. Alterações macroscópicas nos testículos e epidídimos de animais são observadas com maior frequência em distúrbios crônicos, quando o agente etiológico ou o distúrbio provocam dano direto as células gonadais ou alterações circulatórias duradouras como processos agudos ou crônicos, causados principalmente por traumatismo ou agentes infecciosos (Jones et al., 1997; Megid et al., 2007).

Microscopicamente, fígados dos ratos intoxicados apresentaram alterações compatíveis com as vistas nas intoxicações por APs, observa-se que estas lesões são decorrentes da intoxicação aguda que, na maioria das espécies quando não causam morte rápida dos animais, culminam no aparecimento de fibrose em processos mais tardios como a seneciose crônica (Karam et al., 2004; Basile et al., 2005; Grecco et al., 2012; Krabbe et al., 2015).

O efeito tóxico da planta é variável entre espécies animais, isso é devido a eficácia da metabolização e bioexcreção destes metabolitos tóxicos (Hooper, 1978), também as intoxicações podem variar em relação à idade do animal, já que em recém nascidos as enzimas do citocromo P450 são menos ativas do que nos animais adultos (Stewart & Hampton, 1987; Radostitis, 2002; Maclachlan e Cullen, 1998), a diferença nos padrões da intoxicação foi observada entre os animais do grupo pré-púberes e púberes.

Histologicamente, o grupo de ratos pré-púberes apresentou dano testicular direto em células germinativas caracterizado por degeneração e necrose com desprendimento de células para o lumen do túbulo. Esses achados são compatíveis com processos degenerativo-necróticos causados por lesões traumáticas, vasculares e tóxicas no tecido gonadal (Nascimento e Santos, 2011; Montanari, 2013). Ressalta-se que a observação dessas lesões ocorreu em um grupo que experimentalmente cursou com um quadro clínico mais longo que os animais púberes, possivelmente pela diminuição da atividade do grupo de enzimas citocromo P450, em especial no fígado, mas também em células de outros tecidos (Radostitis et al., 2002; Santos et al., 2008; Karam et al., 2011; Santos, 2017). O tecido gonadal de animais pré-púberes é caracterizado por membrana basal e células da camada basal progenitora com pequeno número de espermatogônias (Junqueira & Zago, 1987; Moore & Persaud, 2004; Montanari, 2013), sendo essas últimas as mais intensamente acometidas pelo efeito dos APs. As características celulares observadas nas células mortas nos túbulos seminíferos apontam para indução de necrose, por possível ação direta dos APs e componentes pirrólicos circulantes. Esse achado difere um pouco do que foi observado no fígado desses ratos, que por sua vez apresentaram degeneração, necrose e intensa atividade apoptótica.

Quanto ao grupo dos ratos púberes, esse se diferenciou do grupo pré-púbere por apresentar diminuição do número de espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides com aumento do lumen dos túbulos seminíferos e menor dano degenerativo necrótico que o observado no grupo pré-púbere. Esse fato pode ter sido influenciado pela rápida evolução dos sinais clínicos apresentada por esse grupo, tendo em vista sua maior capacidade de biotransformação dos APs em pirróis por esses animais apresentarem idade superior aos animais pré-púberes e maior competência enzimática

necessária para biotransformação de toxicantes (Radostitis et al., 2002; Torres & Coelho, 2008), facilitado especialmente pela maior atividade de enzimas citocromo P450 no fígado, o que torna esses compostos tóxicos mais polares promovendo melhor transito dessas moléculas tóxicas pela barreira hematotesticular (Costa et al., 2004; Silva et al., 2006; Kopera et al., 2010; França et al., 2012; Santos, 2017), o que permite a chegada de pirróis nas células dos túbulos seminíferos.

O entendimento da toxicodinâmica dos APs nos diferentes tecidos ainda é limitado, e a maior parte das informações se limita a biotransformação no fígado (Silva et al., 2006; Santos et al., 2008). A diferença no grau de maturidade das enzimas citocromo P450 entre animais jovens e a adultos já é bem estabelecida (Stewart & Hampton, 1987; Radostitis et al., 2002), essa limitação da atividade enzimática pode se mostrar em diferentes tipos celulares (Silvado, 2008). Em humanos e diferentes espécies de animais, incluindo ratos, já foi comprovada a expressão de citocromo P450 em células de Sertoli que participa da barreira hematotesticular, bem como nos diferentes tipos de células germinativas (Kopera et al., 2010; França et al., 2012; Santos, 2017).

A lesão observada nos ratos pré-púberes pode estar associada a circulação sistêmica mais duradoura dos APs e passagens desses em maior quantidade pela barreira hematotesticular e conseqüentemente maior quantidade do princípio tóxico sendo convertido em pirróis diretamente nas células de Sertoli que fazem parte da barreira hematotesticular (Kopera et al., 2010; França et al., 2012; Sandini et al., 2013; Santos, 2017) e pelas próprias células causando degeneração e morte celular de forma mais intensa.

Quanto aos ratos púberes, por serem animais mais desenvolvidos, há maior atividade do citocromo P450 a nível hepático (Radostitis et al., 2002; Torres & Coelho, 2008) o que fez com que além do dano hepático grave seja estabelecido, uma maior quantidade de moléculas pirrólicas mais polares circule sistemicamente e, por endocitose, chegue mais facilmente as células gonadais, o que pode causar ação antimitótica direta nas células, com possível diminuição dos índices de mitose das espermatogônias, promovendo a redução dessa classe de células germinativas. Em se tratando de ratos adultos, o processo de meiose a espermatogênese se completa, porém, com a falha na mitose os espermátócitos não são repostos e há diminuição do número de camadas no túbulo seminífero com posterior aumento da luz dos túbulos e diminuição da quantidade de espermatozoides no interior dos túbulos seminíferos e no epidídimo. Esse mecanismo de regulação da entrada de agentes tóxicos no lumen dos túbulos seminíferos é regulado pela barreira hematotesticular e também pode sofrer pela ação direta de

agentes tóxicos como APs, como pode ser observado em outros processos tóxicos (Romano et al., 2008, 2012; Santos, 2017).

Segundo Krabbe et al. (2015), foram observados fetos de vacas com a intoxicação crônica por *Senecio* spp. também apresentando lesão hepática, o que demonstra a passagem dos pirróis por via transplacentária, conforme ocorre com diversos outros agentes tóxicos (Dalmolin et al., 2010; Sandini et al., 2012). Como é sabido, a formação das gônadas masculinas, ainda na vida fetal, ocorre por meio de mitose dos gonócitos (Junqueira & Zago, 1987; Moore & Persaud, 2004; Montanari, 2013). Os achados histopatológicos no tecido gonadal dos ratos com a forma aguda da intoxicação por *S. brasiliensis*, sugerem fortemente a passagem no princípio tóxico da planta e seus produtos da biotransformação pela barreira hematotesticular, causando danos direto nas células germinativas.

Dessa forma, embora mais estudos devam ser realizados, é importante ressaltar que animais, especialmente vacas prenhes, que ingerem *Senecio*, podem estar sob risco de produzirem terneiros machos com menor capacidade reprodutiva por apresentarem comprometimento no desenvolvimento dos gonócitos e suas posteriores linhagens. A avaliação desse efeito na vida reprodutivas dos touros em idade reprodutiva deve ser avaliada, no entanto já é possível alertar sobre o possível efeito deletério dos APs no tecido gonadal para que medidas de controle possam ser adotadas a campo. Atenção também deve ser dada aos touros que estão em contato com a planta a campo, esses podem não apresentar sinais clínicos evidentes da intoxicação porém apresentarem redução na produção de espermatozoides.

Diversas patologias gonadais podem ser observadas nas mais variadas espécies animais e inclusive na espécie humana, sendo que a degeneração testicular comumente é a mais relevante para a diminuição ou perda da fertilidade (Cunha et al., 2015). A degeneração testicular pode ser resultante de diferentes etiologias, tanto como temperatura ambiente elevada, desequilíbrio nutricional, infecções, alterações vasculares, distúrbios hormonais, células tumorais e intoxicações (Nascimento e Santos, 2011; Cunha et al., 2015).

Essas afecções gonadais na maioria das vezes quando removido e corrigido a causa ou o agente primário, é possível reestabelecer parcialmente ou totalmente a regeneração celular e o reestabelecimento da espermatogênese. Já em casos graves em que o dano gonadal pode ter resultado na formação de tecido fibroblástico e comprometendo a gônada nos níveis de fibrose parcial ou total essa situação torna normalmente o dano irreversível, nos casos de deposição de cálcio e/ou calcificação do parênquima testicular, nessas situações de lesão podemos observar perda definitiva da função reprodutiva (Nascimento e Santos, 2011; Cunha et al., 2015).

Os ratos intoxicados nesse experimento apresentaram a forma aguda da intoxicação, cabe ressaltar aqui que se faz necessária avaliações posteriores sobre a recuperação ou não do dano testicular em animais com as formas aguda e especialmente com a forma crônica da intoxicação por *Senecio*, considerando ainda fetos, produzidos por mães com sinais da seneciose crônica.

O reflexo desse dano pode se mostrar na diminuição na capacidade de fecundidade, sem aparentemente apresentar sinais clínicos da doença e neste caso os índices reprodutivos podem estar diminuídos sem que se perceba a disfunção gonadal e conheça sua real etiologia.

Com relação a planta os níveis de APs tendem a variar em função do estágio vegetativo, solo e outros fatores ambientais, e em média são encontrados os seguintes níveis em plantas secas: caule 20,5 a 45,7mg/100g, folhas 208 a 380,9 mg/100g e extremidades florais 591 a 969,7mg/100g (Hirschmann et al., 1987), o que nos leva a determinar que as extremidades florais são as que apresentam a mais alta concentração dos APs.

Naturalmente pode haver variação na toxicidade pela diferença de concentração e teores dos APs, devido a fatores ambientais como clima e solo, dando origem a plantas com mais ou menos quantidade de APs, e que pode variar de região para região ou até na mesma área, em virtude da diversidade das condições climáticas ou práticas de correção de solo empregadas (Riet-Correa et al., 2012b). Perante estas condições adversas foi necessário que na formulação do extrato aquoso fosse realizado um estudo preliminar (piloto) para avaliação da eficácia da intoxicação bem como avaliar o tempo decorrido até a morte dos animais.

No experimento realizado os níveis de toxicidade do extrato aquoso foram proporcional ao apresentado na literatura o qual não houve variação significativa entre matéria verde e matéria seca, tanto a dose tóxica quanto os parâmetros de evolução até a morte mantiveram-se nos padrões semelhantes (Pilati & Barros, 2007; Grecco et al., 2012; Riet-Correa et al., 2012b; Panziera et al., 2017).

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que o extrato aquoso de *S. brasiliensis*, no presente estudo, promoveu dano celular direto nas células germinativas dos testículos de ratos pré-púberes e púberes.

Ratos pré-púberes apresentam sinais clínicos e morte de forma mais tardia que ratos adultos e as leões testiculares em animais mais jovens caracterizam-se por necrose, enquanto ratos adultos apresentam diminuição do número de camadas e da produção de espermatozoides.

A lesão hepática na forma aguda da intoxicação por *S. brasiliensis* também se caracteriza por apoptose.

8 REFERÊNCIAS

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. **Pesq. Vet. Bras.** 4 - (7): 101 – 107, 1987.

BARROS, C. S. L.; METZDORF, L. L.; SANTOS, M. N.; BARROS, S.S.; PEIXOTO, P. V. – Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.** – V9, n. 3/4, p. 55- 67, 1989.

BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; PILATI, C.; BARROS, S. S. & CASTILHOS, L. M. L. - *Senecio* spp. Poisoning in cattle in Southern Brazil. *Vet. Hum. Toxicol.* 34(3): 241- 246, 1992.

BASILE, J. R.; DINIZ, J. M. F.; OKANO, W.; CIRIO, S. M. & LEITE, L. C. - Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae.** 33(1): 63-68, 2005.

BETTY, D. C & MARKSON, L. M. – Liver biopsy in the diagnosis of ragwort (*Senecio jacobae*) poisoning in a herdo of cattle. **Vet. Rec.** 66: 398:400. 1954.

BEZERRA, F. S. B.; GARCIA, H. Á.; ALVES, H. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; SILVA, A. E.; TEXEIRA, M. M. G.; BATISTA, J. S. - Trypanossoma vivax nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.** 28 (12) : p 575 a 582, 2008.

CARVALHO, G. S. T. & MAUGÉ, G. C. – Ação tóxica do “*SENECIO BRASILIENSIS*”, Lessing Fam. Compositae. **Departamento de Farmacologia** – Vol. 3 – Fasc. 3 Dezembro de 1946, 1946.

CÉSAR, M. L. V. S.; - Informe-net DTA – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (Centro de Vigilancia Epidemiológica – CVE) – **Manual**, Outubro, 2003.

CHEEKE, P. R. – A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. **Vet. human Toxicol.** 36:240-247, 1994.

CORRÊA, 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. **Pesq. Vet. Bras.** 28 (3) : 187-189. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, URGs – Porto Alegre/RS, 2008.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V.; PIMENTA, F. C – Citocromo P450 e biotransformação microbiana. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 33 (1) : 21-31, Jan. – jun. 2004

CRUZ, C. E. F.; KARAM, F. C.; DALTO, A. C.; PAVARINI, S. P.; BANDARRA, P. M. & DRIEMEIER, D. - Fireweed (*Senecio madagascariensis*) poisoning in cattle. **Pesq. Vet. Bras.** 30(1): 10-12, 2010.

CUNHA, M. S.; BONATO, D. V.; TAIRA, A. R.; TEIXEIRA, P. P. M. – Degeneração testicular em machos: dos animais ao homem. **Revista Investigação Medicina Veterinária – Investigação**, 14(6): 54-61, 2015.

D'ARCE, R. D.; FLECHTMANN, C. H. W.; - Introdução a anatomia e fisiologia animal. São Paulo: **Nobel** – p 186, 1980.

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. – Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HYUNTER, R. H. F. – Reproduction in animals and man. Paris: **Ellipses**, cap. 13, pg. 227- 255. 1993.

DALMOLIN, D. P.; RICCI, E. L.; TELLOLI, C. S.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. – Efeitos da exposição ao *Senecio brasiliensis* durante a gestação no desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas. **In: Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, XIX** - São Paulo. Anais... São Paulo: USP. – 2011.

DANTAS, A. F. M.; NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; JÚNIOR, G. S.; MEDEIROS, J. M.; SILVA, R. M. N.; SILVA, E. M. N.; ANJOS, B. L. & MEDEIROS, J. K. D. – Intoxicação crônica espontânea por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em ovinos na região do semi-árido paraibano, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 17: 36-40, 2004.

DICKINSON, J. O.; COOKE, M. P. & MOHAMED, P. A. – Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. **J. Am Vet. Med. Assoc.** 169 (2): 1192-1196, 1976.

DRIEMEIER, D.; BARROS, C. S. L. & PILATI, C. – Seneciose em bovinos. **Hora Vet.** 10 (59): 23 – 30. – 1991.

FRANÇA, L. R.; AUHAREK, S. A., HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HINTON, B. T. – Blood-tissue barriers: morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers. **Adv Exp. Med. Biol.** 763 : 237 – 259. 2012.

GABALDI S.H. & WOLF A. - A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias e da Saúde** 2(2): p 66-70, 2002.

GAVA, A.; BARROS, C. S. L.; *Senecio* spp. Poisoning of horses in Southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 17 (1):36-40, 1997.

GIMMLER-LUZ, M. C. & ERDTMANN, B. – Effects of a pyrrolizidine alkaloid, integerrimine, on mouse sperm morphology – **Rev. Int. Contam. Ambient.** 14 (2) 79-83, 1998.

GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; SILVA, P. E.; 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. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 5, p. 389-397, 2010.

GRECCO, F. B.; SILVA, P. E.; PEREIRA, C. M.; SOARES, M. P.; RAFFI, M. B.; SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L. – Intoxicação experimental aguda por *Senecio brasiliensis* em ovinos e indução a resistência à intoxicação. **Pesq. Vet. Bras.** 32(9):912-916, setembro, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. - Tratado de fisiologia médica. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro - p 1128, 2006.

HAFEZ, E. & HAFEZ, B.; - **Reprodução animal**. São Paulo, p 583, 2004.

HARAGUCHI, M. – Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**, V.65, n.1/2, p. 37-39, 2003.

HIRSCHMANN, G. S.; FERRO, E. A.; FRANCO, L.; RECALDE, L. & THEODULOZ – Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* Populations. **Journal of Natural Products**. 50 (4), pg 770 – 772, 1987.

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. F. Effects of poisonig plants on livestock. – **New York: Academic Press**, USA. p 161 - 176 – 1978.

ILHA, M. R. S.; LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. & BARROS, C. S. L. - Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 21(3):123-138, jul./set. 2001.

JAMES, L. F.; NILSEN, D. B & PANTER, K E. – Impact of poisonous plants on the livestock industry. **J. Range Manag** – 45:3-8, 1992.

JAMES, L. F.; PANTER, K. E.; MOLYNEUX, R. J.; STEGELMEIER, B. L. & WAGSTAFF, D. J. – In: Colegate S.M. & Dorling P.R. (ed.) Plant Associated Toxins. - Plant toxicants in milk, p. 83-88. **CAB International**, Wallingford. 1994.

JOHNSON, L. – spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. – Reproduction in domestic animals. San Diego: **Academic Press**, Inc. – Cap. 5, pg. 174 – 220. 1991.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. – Patologia Veterinária. **Ed. Manole**: São Paulo, 6ª ed., p.1230-1231, 1997.

JUNQUEIRA, L. C. & ZAGO, D. – Embriologia médica e comparada. 3ª ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 291, 1987.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. – **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARAM, F. C.; SOARES, M. P.; HARAGUCHI, M.; RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M. C. & JARENKOW, J.A. - Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, p 191-198, 2004.

KARAM, F. C.; SCHILD, A. L.; de MELO, J. R. B. – Intoxicação por Senecio spp. Em bovinos no Rio Grande do Sul: Condições ambientais favoráveis e medidas de controle. **Pesq Vet. Bras.** 31, 603 – 609, 2011.

KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A. W. & NAUDÉ, T.W. – **Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa**. Oxford University Press, Cape town. - p.243, 1988.

KELLY, W. R. - The liver and biliary system, In: Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C. & Palmer, N. (ed) Pathology of Domestic Animals. – Vol. 2. Ed. 4 p 319-404 – **Academic Press**, San Diego, 1993.

KNIGHT, A. P. & WALTER, R. G. - A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America. **New Media**, Teton – p 578, 2001.

KRABBE, A. A.; GONÇALVES, M. A.; POZZOBON, R.; PESSOA, C. R. M.; SOARES, M. P.; COSTA, R. A.; ANJOS, B. L. - Megalocitose de células luteínicas grandes de vacas prenhes com seneciose crônica. - **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 1, p. 33-38, 2015.

KRABBE, A. A.; GONÇALVES, M. A.; SILVEIRA, C. S.; MORAIS, R. M.; QUEVEDO, L. S.; RIBEIRO, P. V. R.; ANJOS, B. L. – Aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e diagnóstico precoce da seneciose bovina no Oeste do Rio Grande do Sul. - **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37 (12) : 1423-1429, dezembro, 2017.

KOPERA, I. A.; BILINSKA, B.; CHENG, C. Y.; MRU, D. D. – Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recente data. **Philos Trans r Soc Lond B Biol Sci** 27:153-1605. 2010.

LAGERLOF N.; Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**. 33: p 550 a 561, 1938.

LLOYD, J. R. – The use of a liver function test in the prognosis of ragwort poisoning in cattle. **Vet. Rec.** 69: 623 – 625. 1957.

LUCENA, R. B.; RISSI, D. R.; MAIA, L. A.; FLORES, M. M.; DANTAS, A. F. M.; NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C. L. S. - Intoxicação por Alcalóides Pirrolizidínicos em Ruminantes e Equinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 30(5), 447-452, 2010.

MACLACHLAN, N. J. e CULLEN, J. M.; Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: Carlton, W. W. e Macgavin, M. D. E. – **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. Porto Alegre, p 95 a 131, 1998.

MASUDA, E. K.; RISSI, D. R.; BARROS, R. R. & BARROS, C. S. L. – Epidemiologia, sinais clínicos e patologia da intoxicação por *Senecio* spp. Em bovinos no Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** (Supl.) 57:65. 2005.

MCLEAN, E. K. – The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Pharmacol. Ver.** 22 (4) : 429 – 483. 1970.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIK, S. L. & GUERRA, J. L. – Comparative effects of prenatal and postnatal monocrotaline effects in rats. In: Garland, T. & Barr, A. C. (ed.) *toxic Plants and Other Natural Toxicants*. **CAB International**, New York. 1998.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIK, S. L. & GUERRA, J. L. - Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 36 (2). (In press), 1999.

MEGID, J.; SALGADO, V. R.; KEID, L. B.; SIQUEIRA, A. K.; MEIRELLES, C. E.; MORETTI, D. M. – Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.6, p. 1583-1585, 2007.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. & SCHILD, A. L. – Intoxicação por *Senecio* spp. (compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 7(2): 51-56. 1987.

MÉNDEZ, M. C. - Intoxicação por *Senecio* spp., In: Riet-Correa F., Méndez M. C. & Schild A. L. (Eds), Intoxicações por Plantas e Micotoxinoses em Animais Domésticos. **Ed. Agropecuária Hemisferio Sur**, Montevideo - p. 43-57, 1993.

MÉNDEZ, M. C. & RIET-CORREA, F. - Plantas hepatotóxicas, In: Méndez, M. C. & Riet-Correa, F. (Eds), Plantas Tóxicas e Micotoxinoses. **Ed. Universitária**, Pelotas – p. 9-29, 2000.

MONTANARI, T. – Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas - [recurso eletrônico/Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodeembrio/>] / Tatiana Montanari. – **Porto Alegre : Ed. Do autor**, 2013.

MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. – Embriologia Clínica. **Elsevier**, Rio de Janeiro, 7ª ed., p. 317-358, 2004.

MORAES, E. C. F. – Contribuição ao estudo químico-toxicológico do *Senecio brasiliensis* Less. 90f. **Tese (Livre Docência)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1952.

MOTIDOME, M. & FERREIRA, P. C. – Alcalóides do *Senecio brasiliensis* Less. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP.** 4: 38 – 44. 1966.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L.; EDWARDS, J. F. - Sistema Reprodutivo Masculino. In: Santos R. L., Alessi A. C.; **Patologia Veterinária**, 1 ed. Roca : São Paulo – p 855 a 880, 2010.

NASCIMENTO, E. F. & SANTOS, R. L. – **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 3 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 133, 2011.

NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. - Intoxication by *Crotalaria retusa* in ruminants and equidae in the state of Paraíba, northeastern Brazil, In: Plant Poisoning and related Toxins. **CAB International**, Glasgow, UK. – p. 275-278, 2004.

NUNES, A. S.; Morfologia do funículo espermático e dos escrotos em caprinos nativos do Estado do Piauí, com diferentes configurações escrotais. Teresina. 57 p.; Dissertação (Mestrado em Ciencia Animal) – **Centro de Ciências Agrárias**, Universidade Federal do Piauí, 2005.

ODRIZOLA, E., CAMPERO, C., CASARO, A., LOPEZ, T., OLIVIERI, G. & MELUCCI, O. – Pyrrolizidine alkaloidosis in argentinian cattle caused by *Senecio selloi*. **Vet. Human. Toxicol.** 36 (3) : 205-208. 1994.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. – Estrogen and spermatogenesis. **Endocr Rev.**, Vol. 22, N. 3, pg. 289-318, 2001.

OLIVEIRA, C. C.; SILVA, M. J. & TELES, A. M. – *Senecio L.* (Asteraceae, Senecioneae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Hoehnea** 42 (4): 703 – 724, 9 fig., 2015.

OSUIGWE, M. J. & MARGRET, N. – Evaluation of the Toxicological Effects of *Senecio aureus* Extract on the Liver and Hematological Parameters in Wistar Rats – JJBS – **Jordan Journal of Biological Sciences**, Vol. 10, n. 1, pg. 29-32, março 2017.

PANTER, K. E. & JAMES, L.F. – Natural plant toxicants in milk: a review. **Anim. Sci.** 68: 892-904, 1990.

PANZIERA, W.; BIANCHI, R. M.; GIARETTA, P. R.; MAZARO, R.; SILVA, D. R. P.; SILVA, G. B.; FIGHERA, R. A. – Intoxicação natural por *Senecio brasiliensis* em equinos no sul do Brasil. Laboratório de Patologia Veterinária, Santa Maria-RS, **VIII Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário**, 2014.

PANZIERA, W.; GONÇALVES, M. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; LORENZETT, M. P.; REIS, M.; HAMMERSCHMITT, M. E.; PAVARINI, S. P. & DRIEMEIER, D. – Intoxicação por *Senecio brasiliensis* em bezerros: padrão e evolução de lesões hepáticas. **Pesq. Vet. Bras.** 37 (1): 8-16, janeiro 2017.

PANZIERA, W.; PAVARINI, P. S.; SONNE, L.; BARROS, C. S. L. & DRIEMEIER, D. - Poisoning of cattle by *Senecio* spp. in Brasil: a review – **Pesq. Vet. Bras.** 38 (8) : 1459 – 1470, agosto 2018.

PEARSON, E. G. - Moléstias do sistema hepatobiliar, In: Smith B. P. (Ed.), Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. Vol. 1. **Manole**, São Paulo – p 839-857, 1993.

PESSOA, C. R. M.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. – Importância econômica, epidemiológica e controle das intoxicações por plantas no Brasil – **Pesq. Vet. bras.**, 33 (6):752-758, junho – 2013.

PILATI, C.; BARROS, C. S. L. – Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em equinos. **Pesq. Vet. Bras.** - Vol.27, n.7, 2007.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; REILLY, P. E.B.; SEAWRIGHT, A. A. - Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology end Environmental Mutagenesis, Amsterdam**, v. 443, n. 1-2, p. 53-67, 1999.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. & HINCHCLIFF. K. W. – Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9º ed. **Guanabara Koogan**, 1737p, 2002.

RIET-CORREA, F. & MÉNDEZ, M. C. - Introdução ao estudo das plantas tóxicas, p. 1-19. In: Riet-Correa, F., Méndez, M. C. & Schild, A. L. (Eds), **Intoxicações por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos**. Hemisfério Sul do Brasil, Pelotas. 340p., 1993.

RIET-CORREA, F. & MEDEIROS, R. M. T. - Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras**, 21:38-42, 2001.

RIET-CORREA, F. & MÉNDEZ, M. C. – In: Doenças de Ruminantes e Equídeos, 3º Ed. – Vol.2 – Cap. 2 - **Intoxicações por Plantas e Micotoxinas**. p. 107-108, Santa Maria: Pallotti, 2007.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A. & BORGES, J. R. J. - Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol. 1, **3ª ed. Pallotti**, Santa Maria, (b) p. 722, 2007.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. & SCHILD, A. L. - A review of poison plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. **J. Appl. Toxicol.** 32:245-254, 2012.

RIET-CORREA, F.; FIORAVANTE, M. C. S.; MEDEIROS, R. M. T. – A Pecuária Brasileira e as Plantas Tóxicas. **Revista UFG / Ano XIII nº 13**, p. 83 – 91, Dezembro, 2012b.

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. **Pesq. Vet. Bras**, v. 27, n. 7, p. 261-268, 2007.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; MOURA, M. O.; OLIVEIRA, C. A. - A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 45 (6): p 481 a 487, São Paulo, 2008.

ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M.; SANTOS, L. D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D. A.; DE SOUZA, P. B.; VIAU, P.; BERNARDI, M. M.; NUNES, M. T.; DE OLIVEIRA, C. A. - Glyphosate impairs male off spring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**. 86 (4): 663 a 673, Abril, 2012.

SANDINI, T. M. – Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao *Senecio brasiliensis* na prole de ratos. – **Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANDINI, T. M.; BERTO, M. S.; SPINOSA, H. S. – *Senecio brasiliensis* e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. – **Biotemas**, 26 (2): 83-92, junho de 2013.

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 equinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 28(1):1-14, janeiro 2008.

SANTOS-MELLO, R., DEIMLING, L. I., LAURER JÚNIOR, C. M., ALMEIDA, A. – Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* ad stored for 23 years. **Mutation Research** 516 : 23 – 28. 2002.

SANTOS, R. B. - Expressão da enzima aromatase citocromo P450, e dos receptores de estrógeno α e β , e de andrógenos nas células da linhagem espermatozoária, leydig e sertoli de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) – **Dissertação Mestrado** (Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás) - 59p, Goiânia, 2017.

SCHILD, A. L.; MOTTA, A. C.; RIET-CORREA, F.; KARAM, F. C. & GRECCO, F. B. – Photosensitization in cattle in Southern Brazil; pp 162-166. In: Acamovic T., Stewart C. S. & Pennycott T. W. - (Eds) Poisonings Plants and Related Toxins. **CAB International**, Wallingford, UK, 586p., 2004.

SILVA, C. M.; BOLZAN, A. A. & HEINZMANN, B. M. – Alcalóides Pirrolizidínicos em espécies do Gênero *Senecio*. **Quim. Nova**, Vol.29, n. 5, 1047-1053, 2006.

SILVADO, C. – Farmacogenética e Antiepiléticos (Farmacologia das drogas antiepiléticas: da teoria à prática) – **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** – 14 (Suppl 2) p. 51 – 56 – 2008.

STANBENFELD, G. H., EDQVIST, L. – Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. M.; REECE, W.O. – **Dukes – fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanagara Koogan S.A., 1996. Cap. 35, pg. 603-614. 1996.

STEWART, C. F. & HAMPTON, E. M. – Effect of maturation on drug disposition in pediatric patients. **Clin Pharm.** 6(7):548-564 julho 1987.

STICKEL, F.; PATSENDER, E. - SCHUPPAN, D.; Herbal hepatotoxicity. **J. Hepatol.** Nov; 43 (5) : 901 – 910, 2005.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. - The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutr.** – Dec; 3 (4^a) : 501 – 508, 2000.

STIGGER, A. L.; ESTIMA-SILVA, P; FISS, L.; COELHO, A. C. B.; GARDNER, D. R.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A. L. – *Senecio madagascariensis* Poir. (Asteraceae): uma nova causa de seneciose em bovinos no Sul do Rio Grande do Sul. – **Pesq. Vet. Bras.** – v.34, n.9, p 851-855, 2014.

SUMMERS, B.A., CUMMINGS, J.F. & DE LAHUNTA, A. - Degenerative diseases of the central nervous system. In: (Eds) **Veterinary Neuropathology**. Mosby, St Louis. p.208-214, 525p., 1995.

TOKARNIA, C. H. & DOBEREINER, J. – Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 4: 39-65. 1984.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F. & BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DOBEREINER, J. - Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2^a Edição. **Editora Helianthus**, Rio de Janeiro – 556p., 2012.

TORRES, M. B. A. M. & COELHO, K. I. R – Experimental poisoning by *Senecio brasiliensis* in calves: quantitativa and semi-quantitative study on changes in the hepatic extracellular matrix and sinusoidal cells. **Pesq. Vet. Bras.** 28 (1) : 43-50. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade federal do Paraná, Campus Palotina, Palotina, Brasil, janeiro 2008.

TRIGO, R. J.; LEAL, I. R.; MATZENBACHER, N. I. & LEWINSOHN, T. M. - Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae:Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, V.31, n.1, p. 1011 – 1022, 2003.

WANKE MM, GOBELLO C.; Reproduccion em caninos y felinos domésticos. Intermédica, **cidade do editor** - p 309, 2006.

WINSHIP, K. A.; Toxity of comfrey. Adverse Drug React Toxicol - **Rev. Spring**; 10 (1) p 47 a 59, 1991.

VILLARES JB.; Bioclimatologia da reprodução animal. In. **Simpósio Nacional de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, Brasil – p 192, 1976.

9 ANEXO

9.1 ANEXO A – Certificado CEUA/UNIPAMPA 044/15. (Grupo Piloto)

<p style="text-align: center;"> MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA (Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008) Pró-Reitoria de Pesquisa COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA Fone: (51) 3413-4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br</p> <hr/> <p style="text-align: center;">CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA</p> <p>Número de protocolo da CEUA: 044/2015</p> <p>Título: Diagnóstico e estudo preliminar sobre distúrbios causados por plantas e outros agentes tóxicos com princípios ativos não identificados em animais de rebanho</p> <p>Data da aprovação: 16/03/2016</p> <p>Período de vigência do projeto: De: 03/2016 Até: 03/2019</p> <p>Pesquisador: Bruno Leite dos Anjos</p> <p>Campus: Uruguaiana</p> <p>Telefone: (55) 8118-3136</p> <p>E-mail: anjosbl@gmail.com</p> <p style="text-align: center;"> Marcela Dal Pozzo Médico Veterinário Coordenadora Pro Tempore da CEUA/UNIPAMPA</p>
--

9.2 ANEXO B – Certificado CEUA/UNIPAMPA 012/17. (Experimento)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



CEUA
Comissão de Ética em Uso de Animais

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 012/2017

Título: Efeito citotóxico e genotóxico provocado por alcaloide pirrolizidínicos em roedores (*Rattus norvegicus*).

Data da aprovação: 31/05/2017

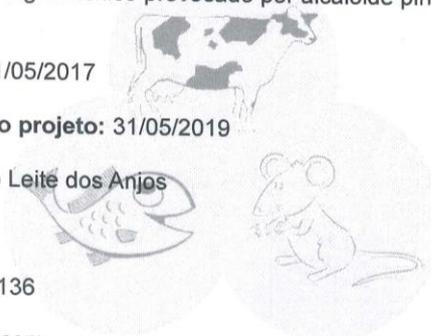
Período de vigência do projeto: 31/05/2019

Pesquisador(a): Bruno Leite dos Anjos

Campus: Uruguaiiana

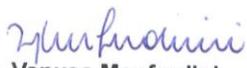
Telefone: (55) 98118-3136

E-mail: anjosbl@gmail.com



CEUA

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos wistar
Nº de animais	20
Peso/Idade	Até 500g e idade máx. 6 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Santa Maria



Prof.ª Dr.ª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA