

DANIEL GALDINO

**Efeito do extrato hidroalcóolico de *Cassia angustifolia*  
na gestação de camundongos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

Alfenas/MG  
2012

Galdino, Daniel.

Efeito do extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* na gestação de camundongos / Daniel Galdino. - 2012.

130 f. -

Orientador: Valdemar Antonio Paffaro Junior

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Senna (Planta). 2. Gravidez. 3. Desenvolvimento Embrionário e Fetal. I. Paffaro Junior, Valdemar Antonio. II. Título.

CDD: 573.67

DANIEL GALDINO

**Efeito do extrato hidroalcólico de *Cassia angustifolia* na  
gestação de camundongo**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

Aprovada em: 17/08/2012

Prof.

Instituição:      Assinatura:

Prof.

Instituição:      Assinatura:

Prof.

Instituição:      Assinatura:

Dedico esse trabalho aos meus pais, Manoel Galdino e Vera pelo apoio incondicional à minha vida profissional. Por terem ensinado o verdadeiro significado de família, crescimento e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

A toda minha família, especialmente aos meus pais; Manoel Galdino Irmão e Vera Lúcia de Almeida Oliveira, pelo constante apoio às minhas atividades acadêmicas e de pesquisa. Eles me fizeram acreditar o quanto é importante o crescimento intelectual, moral e espiritual. Sem eles não seria essa pessoa que busca a superação, o amor a todos que me cercam, e o aprendizado, virtude jamais perdida.

Agradeço à minha Irmã Débora Cristina de Almeida Galdino Alves e seu Marido Daniel Adilson Alves por me servirem de exemplo como profissionais e me dando forças para nunca desistir. A dedicação e a esperança são ferramentas essenciais para o crescimento no mundo competitivo de hoje. Agradeço a minha irmã Fátima Galdino e seu marido Marcos Musa, por me ensinar o valor dos estudos, que mais cedo ou mais a recompensa verdadeira virá.

À Clarice de Carvalho Veloso por ter me aconselhado em todos os momentos que me senti desmotivado, me dando forças e tentando sempre me mostrar o melhor caminho em todas as situações. Sua presença, as palavras confortantes e suas vitórias me serviram de motivação para prosseguir nessa nobre carreira acadêmica.

Aos meus verdadeiros amigos, Diego Diniz, Douglas Dutra e Fabio Murad, por me incentivarem a seguir essa carreira de pesquisador e professor. Compartilhando momentos de verdadeira felicidade, assim como dificuldades a serem superadas. Obrigado de coração Irmãos.

Aos colegas do LABAINT (Laboratório de Biologia Animal e Integrativa), Bruno Zavan, Kamila Leite Rodrigues, Érika Pasqua Tavares, Anna Claudia Guimarães Freire, Fernando Felicioni, Évila da Silva Lopes Salles, Camila Alvares Braga, Rodolfo Cabral Marcelino, Wesley Fernandes, Lidiane Nogueira Pires, Rafaela dos Santos, e aos demais colegas do Programa, Maria Ângela Rodrigues, Michael Brian Santiago, e Lidiane Orlandi por todo conhecimento compartilhado e pelas disciplinas realizadas.

Aos Funcionários do LABAINT, Andréa Aparecida dos Santos, Vanusa Aparecida dos Reis, Fernando Ponciano, e Isabel Passos pelo apoio técnico e incentivo profissional.

Ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de troca de experiências em outras Instituições, assim como, por

toda oportunidade cedida à formação de nível interdisciplinar.

A Prof. Dra. Andréa Molica Amarante Paffaro, pela orientação nesse projeto, mas principalmente pela dedicação em me ensinar a buscar meus sonhos com coragem e confiança, por compartilhar amizade, sinceridade, humildade, conhecimentos científicos e crescimento moral. Ensinaamentos jamais esquecidos por mim.

Agradeço ao Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior, pela oportunidade concedida em realizar um sonho. Servindo de exemplo de um homem de bom caráter e profissional ético. Contribuindo também com seu vasto conhecimento intelectual a esse projeto e para toda minha vida acadêmica.

E a todos aqueles que contribuíram indiretamente para a conclusão desse trabalho.

Eu agradeço a Deus:  
pela coragem de facear as dificuldades criadas por mim mesma,  
pelas provas que me aperfeiçoam o raciocínio e me abrandam o coração;  
pela fé na imortalidade;  
pelo privilégio de servir;  
pelo dom de saber que sou responsável pelas minhas ações;  
pelos recursos nutrientes e curativos que trago em mim;  
pelo reconforto de reconhecer que a minha felicidade tem o tamanho da  
felicidade que faço para os outros;  
pelo discernimento que me permite diferenciar aquilo que me é útil daquilo que  
não me serve;  
pelo amparo da afeição no qual a minha vida se alimenta em  
permuta constante;  
pela bênção da oração que me faculta apoio interior para a  
solução de meus problemas  
pela tranqüilidade de consciência que ninguém me pode subtrair...  
Por tudo isso, e por todos os demais tesouros de  
esperança e amor, alegria e paz  
de que me enriquecem a existência,  
sê bendito, Senhor, ao mesmo tempo que te louvo a Infinita Misericórdia,  
hoje e para sempre.  
Que assim seja !!

(Emmanuel/Francisco Cândido Xavier, 1998)

## RESUMO

A *Cassia Angustifolia* (Sene) é considerada uma planta medicinal indicada principalmente para fins purgativos e constipação intestinal, no entanto, destaca-se também pelo seu uso como abortiva e emenagoga. Plantas medicinais tradicionalmente usadas para induzir o aborto são usadas em altas doses, podendo causar efeitos tóxicos e prejudiciais ao feto e ao corpo da mulher. O principal constituinte químico da *Cassia angustifolia* é a antraquinonas, onde o metabólico secundário chamado de diantrona( senosídeos A a F e também outros compostos como glicosídeos, naftalênicos e flavonoides. Estudos recentes destacam que esses compostos antraquinônicos aumentam o influxo de sangue para o útero e seus anexos, provocam intoxicação placentária, aumentando assim o risco de perda fetal ocasionado principalmente por disfunção da fosforilação oxidativa mitocondrial. Na interface – materno fetal existem células trofoblásticas gigantes (CTGs) que são de grande relevância para a manutenção do equilíbrio existente entre o feto e a gestante. Elas se localizam entre os tecidos maternos e fetais durante todo o período gestacional, adquirindo funções de invasividade, hematotrófico e fagocitário. Existem também as células Natural Killer uterinas (uNK) cuja principal função é a liberação de citocinas como IFN- $\gamma$  que leva à dilatação das artérias espiraladas decíduais e manutenção da integridade decidual, contribuindo, portanto, para o desenvolvimento normal da decídua e da placenta. Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar os possíveis efeitos da administração do extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* (Sene) em diferentes períodos da gestação de camundongos, tanto no organismo materno como no conceito, bem como os efeitos comportamentais e os efeitos nas células uNK e CTGs desses animais por meio do estudo morfológico, citoquímico e estereológico. Realizou-se também o perfil cromatográfico a fim de averiguar os principais constituintes químicos do extrato. O tratamento com extrato provocou alterações morfológicas bastante evidentes, de tal forma que foi possível identificar a presença de focos hemorrágicos e reabsorções uterinas. Verificamos que as CTGs se localizavam em meio ao infiltrado sanguíneo, ou até mesmo ao redor de um início de necrose, exercendo assim um papel fagocitário frente à atividade inflamatória e remodelação tecidual. As células NKu apresentaram um aumento significativo na região endometrial mais distante do embrião. Esses

achados sugerem que existe uma cinética no processo de perda e reabsorção embrionária nos animais tratados durante a prenhez que se inicia com o processo hemorrágico, morte e reabsorção embrionária e que os senosídeo A e pode estar associado a estes efeitos. Portanto o uso de *Cassia angustifolia* durante os períodos de desenvolvimento embrionário apresenta um grande risco para a mãe e para o feto.

Palavras Chave: Senna (Planta). 2. Gravidez. 3. Desenvolvimento Embrionário e Fetal.

## ABSTRACT

*Cassia angustifolia* (Senne), is usually associated with its effects on the gastrointestinal tract where besides being used as purgative. The popular culture associated this plant with abortion and emmenagogue effects. Most plants used as emmenagogue are the same used as abortion, there is no clear distinction between the two intentions. Plants traditionally used to induce abortion are administered in excessively high doses, which can cause toxic effects to the woman's body. The main chemical constituents of *Cassia angustifolia* are diantrons-8-8'-called diglicosídeos senosídeos AF, with a predominance of A senosídeos. This components can inducing uterine contractions, increase blood flow to the uterus and its appendages, increasing the risk of fetal loss, disruption of the mitochondrial oxidative phosphorylation. Trophoblast giant cells (TGC) present in maternal interface - fetal, are of great relevance to the balance between the fetus and mother. There are also uterine Natural Killer cells (UNK) whose main function is the release of cytokines such as IFN- $\gamma$  which leads to dilation of the decidual spiral arteries and maintenance of decidual integrity, contributing thus to the normal development of the decidua and placental. In this context, the present study evaluated the possible effects of administration of the hydroalcoholic extract of *Cassia angustifolia* (Senna) in different periods of pregnancy in mice, both in the mother and the fetus, as well as behavioral effects and the effects on cells and TGCs and UNK by morphological, cytochemical and stereological studying. There was also the chromatographic profile in order to ascertain the chemical constituents of the extract. We found that the TGCs are located in the midst of blood infiltration, or even around an early necrosis, thereby exerting a role phagocytic activity against the inflammatory and tissue remodeling. UNK cells showed a significant increase in endometrial farthest region of the embryo. Furthermore, the treatment showed behavioral changes in females treated with the corresponding extract. The morphological and histological analysis showed a important prejudicial effect of senne extract in mouse pregnancy and after phytochemical analysis we can supposed that this effects was caused probably by the A and B healthy senosídeos (anthraquinone derivatives) the main constituents of Senne extract. The results support an important risk of the indiscriminate use of

Senne for pregnant woman.

Keywords: Senna . 2.Pregnancy. 3. Desenvolvimento Embrionário e Fetal

"Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas, mas ao  
tocar uma alma humana seja  
apenas outra alma humana."

*Carl Gustav Jung*

## LISTA DE ABREVIATURAS

aC	-Antes de Cristo
AIF	-Fator indutor de apoptose
Ang2	-Angiopoetina 2
ATP	-Adenosina TriFosfato
CTG	-Célula Trofoblástica Gigante
CD 3+	-marcador de diferenciação celular 3
cNK	-Natural Killer circulante
CD56	-marcador de diferenciação celular 56
CD56 <sup>dim</sup>	-marcador de diferenciação celular 56(subtipo)
CD16+	-marcador de diferenciação celular 16 positivo
CD56 <sup>bright</sup>	-marcador de diferenciação celular 56(subtipo)
CD16	-marcador de diferenciação celular negativo
Da	-Dalton
DBA	-lectina <i>dolichos biflorus</i>
Ddg	-Dia de Gestaçã
EROS	-Espécies reativas ao oxigênio
endoG	-Endonuclease G
FAZ	-Receptor de morte celular
HLA- G	-Antígeno leucocitário humano G
HLA- C	-Antígeno leucocitário humano - C
HLA-E	-Antígeno leucocitário humano - E
HLA	-Antígeno leucocitário humano - A
HLA- B	-Antígeno leucocitário humano - B
HLA-C	-Antígeno leucocitário humano - C
IFN- $\gamma$	-Interferon gama
IL-10	-Interleucina - 10
INAMPS	-Instituto Nacional de Assistência Médica e Previdência Social
K	-Potássio
Ly49	-Gene receptor de MHC
MLAp	-Agregado mesometrial linfóide gestacional
Na	-Sódio
NKp46	-Proteína(receptor) de Natural Killer 46
NKp44	-Proteína(receptor) de Natural Killer 44
NKp30	-Proteína(receptor) de Natural Killer 30
NKG2D	-Proteína(receptor) de Natural Killer 2D
NKu	-Natural Killer Uterina
OMS	-Organização Mundial de Saúde
SUS	-Sistema Único de Saúde
TRAIL	-Receptor de morte celular –
TNF	-related apoptosis-inducing ligand receptor
TGF- $\beta$ 1	-Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	-Fator de necrose tumoral alpha
UNIFAL	-Universidade Federal de Alfenas

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Organograma que sintetiza as hipóteses das sinalizações intracelulares envolvidos nas alterações celulares gestacionais de camundongos fêmeas.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2 - Confirmação do acasalamento. A presença da rolha vaginal (plug- vaginal), considerado o 1ºdia de gestação (ddg). B- Camundongos prenhes submetidos ao tratamento por gavagem. ....38
- Figura 3- Diagramas representando um sítio de implantação no 8ºddg e no 11º.....43
- Figura 4- Fotografias de úteros e ovário de camundongos fêmeas controles em diferentes períodos gestacionais.....511
- Figura 5- Fotografias de úteros de camundongos em diferentes períodos gestacionais tratados com extrato de Cassia angustifolia no período pré - implantacional.....544
- Figura 6- Fotografias de úteros de camundongos em diferentes períodos gestacionais tratados com extrato de Cassia angustifolia no período implantaçona ..... 566
- Figura 7- Fotografias de úteros de camundongos em diferentes períodos gestacionais tratados com extrato de Cassia angustifolia no período pós - implantacional.....58
- Figura 8- Fotomicrografia mostrando detalhes de ovário e SIE de fêmeas controles.....69
- Figura 9- Cortes histológicos de SIE das fêmeas tratadas.....71
- Figura 10- Cortes de SIE em fêmeas tratadas.....713
- Figura 11- Cortes de SIE em processo de reabsorção embrionária..... 73
- Figura 12- Fotomiografias de cortes histológicos de SIE submetidos a reação de lectina- DBA.....75
- Figura 13- Análise estereológica do número total de células Nku no 8ºddg e

	11 <sup>o</sup> ddg na região 1, 2, 3 dos períodos de tratamento.....	76
Figura 14-	Fotomicrografia de corte histológico de SIE no 11 <sup>o</sup> ddg controle em reatividade para DBA e células NKu.....	78
Gráfico 1-466	Cromatograma HPLC do extrato bruto de C. Angustifolia.....	
Gráfico 2-	Cromatograma HPLC do extrato de C. Angustifolia associado ao padrão de senossídeo A.....	47
Gráfico 3-	Cromatograma: Subtração da corrida do extrato menos o Extrato + o padrão de senossídeo.....	48
Gráfico 4-	Os gráficos demonstram as médias dos valores obtidos através da análise macroscópica dos parâmetros de alterações morfológicas.....	53
Gráfico 5-	Os gráficos demonstram as médias dos valores obtidos através da análise macroscópica dos parâmetros de alterações morfológicas.....	55
Gráfico 6-	Os gráficos demonstram as médias dos valores obtidos através da análise macroscópica dos parâmetros de alterações morfológicas.....	57
Gráfico 7-	O gráfico representa a porcentagem da taxa implantacional nos três diferentes grupos experimentais.....	59
Gráfico 8-	O gráfico demonstra, em porcentagem a viabilidade gestacional e perda embrionária dos grupos tratados com extrato de Cassia angustifolia.....	60
Gráfico 9-	O gráfico representa os parâmetros de alterações em todos os grupos de tratamento.....	63

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	Fitoterapia e fitoterápicos no Brasil.....	19
2.2	Plantas emenagogas e abortivas.....	21
2.2.3	<i>Cassia angustifolia</i> .....	24
2.4	As células trofoblásticas <i>na</i> interação materno fetal.....	28
2.5	A imunologia celular gestacional e o papel fundamental das Células Killer uterinas.....	31
3	<b>OBJETIVO</b> .....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivo Específico.....	35
4	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	Preparo do extrato hidroalcoólico.....	37
4.2	Animais.....	37
4.3	Dose e Administração do Extrato.....	38
4.4	Coleta e Processamento do Material.....	39
4.5	Análise da taxa de implantação (TI), viabilidade e perda embrionária VE e Perda embrionária (PE).....	40
4.6	Inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos.....	41
4.7	Citoquímica com lectina DBA (Dolichos Biflorus agglutinin).....	41
4.8	Estudo estereológico em microscopia Fotônica.....	42
4.9	Análise Cromatográfica.....	43
4.10	Análise estatística.....	44
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1	Análise do uso da <i>Cassia angustifolia</i> e seu perfil cromatográfico.....	44
5.2	Análise Morfológica.....	49
5.2.1	<i>Período Pré- Implantacional</i> .....	52
5.2.2	<i>Período Implantacional</i> .....	54
5.2.3	<i>Período pós-implantacional</i> .....	56
5.3	Taxa de implantação, viabilidade gestacional e perda embrionária.....	58
5.4	Análise Histológica.....	66
5.4.1	<i>Análise Histológica dos sítios de implantação embrionária</i> .....	66
5.4.2	<i>Análise estereológica e morfológica das células NKu através da Citoquímica de lectina</i> .....	75
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de fitoterápicos é uma prática bastante difundida e utilizada principalmente por populações mais carentes para a cura, prevenção e tratamento de algumas doenças. Um grande problema desta prática é que infelizmente elas são utilizadas sem o conhecimento de seu perfil tóxico. As plantas medicinais podem ser classificadas por categorias, de acordo com sua ação sobre o organismo: estimulantes, calmantes, emolientes, fortificantes, diuréticas, hipotensoras, de função reguladora intestinal, colagogas, depurativas, e abortivas.

A interrupção da gestação é uma prática ilegal, e nos países subdesenvolvidos tem favorecido a procura de práticas clandestinas, como por exemplo, o uso da *Cassia angustifolia* (sene). Planta utilizada para fins purgativos, cólicas biliares, constipação intestinal e também para fins emenagogos e abortivos. O sene foi uma das espécies mais citadas segundo um levantamento etnobotânico no sistema único de Saúde, sendo ela constituída principalmente de diantronas. Sabe-se, que o sene é o laxante atraquinóide mais utilizado pela população. Seus compostos são contra – indicados principalmente no primeiro trimestre de gestação, período que ocorre a organogênese. O sucesso da gestação em mamíferos é diretamente dependente da interação entre células de origem maternas e tecidos de origem embrionária, estabelecida principalmente pelas células trofoblásticas e as células Natural Killer Uterinas (NKu). A decídua estabelece funções importantes relacionadas à nutrição do embrião nas fases iniciais, a formação de barreira mecânica impedindo o poder de invasividade das Células trofoblásticas Gigantes (CTG) e a síntese de substâncias, tais como fatores de crescimento e fatores imunossupressores. As células NKu são bastante representativas neste ambiente, e estudos sugerem que estas células maternas interagem com células trofoblásticas (fetais) modulando a produção de citocinas e fatores angiogênicos controlando a invasão trofoblástica e o remodelamento tecidual.

Há muito tempo as pesquisas na área da saúde buscam a compreensão dos mecanismos fisiológicos que acometem uma gestação anormal, assim como substâncias prejudiciais ao sistema de nutrição e desenvolvimento embrionário. Estudos sugerem que moléculas de diantrona causam a interrupção da fosforilação oxidativa das mitocôndrias, visto que a maior parte do oxigênio consumido pela placenta é por meio da fosforilação oxidativa. A reabsorção atribui-se principalmente a intoxicação placentária, pois a diantrona é uma substância de baixo peso molecular

(450 Da) podendo então passar pela placenta, ocasionando um efeito direto fetotóxico. Outros trabalhos relatam que esses compostos podem induzir contrações uterinas, aumentar o fluxo sanguíneo para o útero e seus anexos, ampliando o risco de perda do feto, bem como podem passar para o leite materno e causar efeitos indesejáveis, como espasmos, no bebê.

A partir disso nosso trabalho buscou avaliar a influência da administração do extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* durante os períodos de pré – implantação, implantação e pós implantação embrionária da gestação de camundongos. Além disto, a análise da atuação das células trofoblásticas e células NKu de camundongos na reação inflamatória, reabsorção embrionária e remodelação uterina de camundongos, buscando assim contribuir para um melhor entendimento dos males causados pelo uso indiscriminado de plantas medicinais na gestação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A Fitoterapia e fitoterápicos no Brasil

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante da população. Essa informação é facilmente comprovada pelos inúmeros registros históricos encontrados nas primeiras civilizações que habitaram a terra, por volta de 5000 a.C., onde já se utilizavam plantas medicinais para curar, aliviar, ou tratar inúmeras doenças (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Com certeza, a principal contribuição para o desenvolvimento da terapêutica moderna foi a utilização das plantas medicinais, inicialmente pelos Egípcios e que depois foi alastrando para outras regiões do mundo. Há registros do uso de muitas plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*), dentre outras. Contudo, foi somente no século XIX que a fitoterapia teve maior avanço, devido ao progresso científico na área da química, o que permitiu analisar, identificar e separar os princípios ativos das plantas (CALIXTO, SIQUEIRA JR., 2008).

É de extrema importância salientar algumas distinções de ordem conceitual no que diz respeito a fitoterápicos e a plantas medicinais. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que se utilizam como recursos para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, ou como fonte de fármacos e de seus precursores. Enquanto que fitoterápicos se caracterizam por ser um produto medicinal acabado e etiquetado, cujos ingredientes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais (RATES, 2001).

A utilização de produtos naturais, pelo seu paralelo com o desenvolvimento da cultura humana, ainda é acompanhada de significados mágicos- religiosos e visões peculiares de saúde e doença, dentro de cada cultura. Obviamente, esse tipo de abordagem confronta-se com o novo “*modus vivendi*” das sociedades ocidentais industrializadas, quando estes recursos terapêuticos de origem natural, passaram a ter importância como uma alternativa associada a populações de baixo nível educacional e/ou poder aquisitivo, ou fundamentada em superstições religiosas e práticas culturais.

Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VIEGAS JR; PINTO, 2005). Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos (COELHO, 1998; CORDEIRO et al., 2005). Outro importante fator que corrobora com esse uso descontrolado de fitoterápicos está associado à crença de “naturalidade inócua” dos fitoterápicos e plantas medicinais (SILVA, 2002).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VIEGAS JR; PINTO, 2005). Calixto e colaboradores em (2000) destacou a importância do Brasil e de alguns países desenvolvidos como os Estados Unidos um aumento significativo no consumo de plantas medicinais “*in natura*” ou sob a forma de produtos derivados. Pesquisa realizada nos EUA no ano de 1997 mostrou que 42% da população haviam feito uso de plantas medicinais, pelo menos uma vez no ano de 1996, em tratamentos médicos alternativos.

No Brasil, a histórica utilização de plantas, no tratamento de doenças apresenta influências da cultura africana, indígena e europeia (MARTINS et al., 2000). Com o passar dos anos estes conhecimentos foram transmitidos aos europeus que por sua vez ampliaram o contato com a flora brasileira e a utilizaram para satisfazer suas necessidades alimentares e medicamentosas (NOGUEIRA, 1983). A partir desse conhecimento, no Brasil, até o século XX, se fazia grande uso das plantas medicinais para a cura de inúmeras doenças, sendo essa prática uma tradição que foi sendo transmitida ao longo dos tempos (TOMAZONNI; NEGRELLE, 2006). Outros importantes fatores relacionados ao uso de fitoterápicos no Brasil destaca-se a cultura, a origem e o fator socioeconômico da população induzindo diretamente o aumento desse uso (CORTEZ et al., 1999; ARNOUS et al., 2005).

É importante também salientar que o Brasil é um país que apresenta uma das maiores diversidades etnobotânicas, além de possuir aproximadamente um terço da flora mundial. Desta forma, poderia ser um país privilegiado no que diz respeito à industrialização e comércio destes medicamentos. No entanto, a maioria dos fitoterápicos fabricados hoje pela indústria brasileira se fundamenta apenas no uso popular destas plantas (YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001) existindo ainda uma

grande carência em trabalhos científicos nesta área.

As plantas medicinais podem ser classificadas por categorias, de acordo com sua ação sobre o organismo: estimulantes, calmantes, emolientes, fortificantes, de ação coagulante, diuréticas, sudoríferas, hipotensoras, de função reguladora intestinal, colagogas, depurativas, remineralizantes e reconstituintes (RUDDER, 2002). Sabe-se também que elas produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, antraquinonas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características climáticas, além do seu potencial genético (CALIXTO et al., 2008). Os diferentes métodos existentes para a padronização físico-química de fitoterápicos incluem, entre outros, técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada, que permitem a quantificação de componentes de interesse diretamente ou indiretamente, após separação e extração do cromatograma, seguida de determinação química ou físico-química (SUN; SU, 2002). No entanto, esta metodologia é considerada fora do estado da arte atual, principalmente pelo advento das técnicas mais sensíveis como cromatografias líquida e gasosa acopladas a espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear, empregando placas de alta eficiência (HPLC). Essas técnicas têm sido utilizadas em análise de ativos de drogas vegetais e seus extrativos, tanto qualitativamente como quantitativamente (GOBBO – NETO; LOPES, 2007).

Devido à importância dos conhecimentos científicos e além da crença sobre o poder de cura desta ou daquela planta, a fitoterapia evoluiu e sofisticou-se, substituindo assim a crença e tradição passada por gerações, pela ciência que vem sendo estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas ao longo do tempo. Diante desse contexto muitos trabalhos de pesquisa baseados no conhecimento popular demonstram que algumas plantas são utilizadas para ao controle da fertilidade, ainda nos dias atuais, devido aos seus efeitos como contraceptivos, emenagogos e/ou abortivos (TOLEDO et al., 2000).

## **2.2 Plantas emenagogas e abortivas**

No Brasil, a interrupção da gravidez é uma prática ilegal, e isto tem favorecido um aumento na procura de práticas abortivas clandestinas, onde os usos de alguns

vegetais correspondem à prática mais utilizada, principalmente pela população economicamente menos favorecida (BELEW, 1999).

Estimativas feitas com dados Instituto Nacional de Assistência Médica e Previdência Social (INAMPS) sobre abortos incompletos e com estatísticas de clínicas particulares no Sul e Nordeste brasileiro mostram que a prática do aborto apresentou um extraordinário aumento, de menos de um milhão em 1890 para quase 3 milhões em 1985. Estima-se que no Brasil ocorra cerca de um milhão de abortos clandestinos por ano. Cerca de 250.000 mulheres são internadas na rede pública em virtude de abortos provocados. Nas capitais brasileiras, a mortalidade materna nesse caso atinge 74 entre 100 mil valores, e é a terceira causa de morte materna e a quinta causa de internação na rede pública de saúde (Ministério da Saúde/DATASUS, 2003).

A maioria das plantas utilizadas como emenagogas, são as mesmas utilizadas como abortivas, não havendo distinção clara entre as duas intenções (FOSTER, 1999). Plantas tradicionalmente utilizada para induzir o aborto são administradas em doses exageradamente elevadas, o que pode causar efeitos tóxicos ao organismo da mulher (BELEW, 1999; SCHENKEL et al., 2000). Geralmente os métodos mais utilizados por essas mulheres são a utilização de extratos e infusões vegetais (CIGANDA; LABORDE, 2003). Dentro deste contexto, podemos observar que muitas mulheres fazem uso de plantas como emenagogas e/ou abortivas conforme Barros; Albuquerque(2005); Neto (2005); Campsesato (2005) sem ter o conhecimento dos males que podem ser causados à gestante e ao concepto, principalmente em casos de abortos não concluídos.

Diante da relevância existente, Mengue et al. (2007), realizou o levantamento das dez plantas mais utilizadas como emenagogas ou abortivas por pacientes do Serviço pré-natal do Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS), onde destacam-se: arruda, sene, boldo, Buxinha-do-norte, cabacinha, marcela, canela, quina-quina, cravo, aroeira e agoniada. Os vegetais utilizados para este fim liberam substâncias geralmente tóxicas que afetam a homeostase do organismo materno e fetal, podendo causar entre outros males problemas implantacionais, morte embrionária e fetal, seguida ou não da liberação o concepto, além de grandes hemorragias e outros males de aspectos generalizados (BARROS; ALBUQUERQUE et al., 2005).

De acordo com a bibliografia científica são encontrados apenas poucos e esporádicos trabalhos a respeito dos efeitos de espécies vegetais na gestação. A *Ruta graveolens* (arruda), dentre as ervas consideradas emenagogas e/ou abortivas parece ser a mais reconhecida e estudada. A utilização da arruda como abortiva é bastante

conhecida, tanto no Brasil como em outros países (FREITAS et al., 2004; MELITO et al, 2003). Em estudos com animais em laboratório, no entanto, existem controvérsias quanto ao efeito abortivo e teratogênico desta planta. De acordo com Guitiérrez-Pijares e colaboradores (2003) a administração do extrato aquoso desta planta na concentração de 10 a 20% durante os estágios iniciais da gestação de camundongos pode aumentar significativamente o número de embriões anormais e causar um atraso no desenvolvimento e transporte embrionário podendo diminuir a implantação. Em nosso laboratório, temos observado que a aplicação do extrato alcoólico da arruda, contrariando o que foi dito por Freitas e colaboradores (2004), tem sido efetivo para uma redução do número de sítios de implantação evidentes assim como tem aumentado o número de reabsorções embrionárias no decorrer do período gestacional de camundongos (LONGATO, 2007; LONGATO et al., 2010).

Com relação á outras espécies vegetais os dados bibliográficos são ainda mais escassos e correspondem a trabalhos isolados. O extrato de boldo – verdadeiro (*Peumus boldus Molina*) é descrito como responsável por causar alterações anatômicas em blastocistos de camundongos quando administrado durante a gestação, bem como alguma atividade abortiva (ALMEIDA; LEMONNICA, 2000), enquanto que o decocto de cabacinha ou buchinha do norte (*Luffa operculata*), administrado a esta mesma espécie durante o período da implantação embrionária demonstra uma redução na taxa de natalidade (BARILLI; SANTOS; MONTANARI, 2005). Estes dados demonstram que na verdade o efeito emenagogo, contraceptivo e/ou abortivo de algumas plantas se confunde, não apenas junto a diferentes comunidades como também, junto a comunidade científica (MOREIRA et al., 2001; BARROS ; ALBUQUERQUE, 2005; NETO et al., 2005) e só este fato já justificaria a necessidade de maior empenho nesta área de pesquisa.

Nosso grupo de pesquisa, junto ao projeto de extensão universitária “Análise da utilização de fitoterápicos pela população de baixa renda do município de Alfenas – MG” realizado no período de 2006-2009 (dados ainda não publicados) observou que na comunidade onde está inserida a UNIFAL-MG mais de 70% da população utiliza algum tipo de fitoterápico com relativa frequência. Dentre desse quadro, chamou-nos a atenção a grande quantidade de espécies descritas e reconhecidas pela população regional como agentes emenagogos e/ou abortivos e principalmente quem faz o uso desta prática e a acreditava que a prática não acarretaria risco para a gestante por ser um método considerado “natural”.

A *Cassia angustifolia* além de ter aparecido ente as 10 ervas mais utilizadas

para práticas abortivas pelo SUS foi uma das espécies mais citadas no levantamento etnobotânico realizado junto à população do município de Alfenas. No entanto analisando a literatura científica disponível ainda faltam muitos dados a respeito do mecanismo de atuação desta planta que acaba por acometer a gestação.

### **2.3 *Cassia angustifolia***

Recentemente, revisões na classificação botânica dos gêneros *Cassia* e *Senna* levaram à transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Com a separação das leguminosas em três grupos distintos (Subfamílias Caesalpiniaceae, Mimosaceae e Papilionaceae), o gênero *Cassia*, agora incluído em Fabaceae (Leguminosae), diminuiu em tamanho. Outras espécies de *Cassia* também são utilizadas na medicina popular, por exemplo, *C. auriculata*, *C. occidentalis*, *C. obtusifolia*, *C. tora*, *C. alata*, *C. angustifolia*, *C. autifolia* e *C. nodo* (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008), sendo principalmente utilizada para fins purgativos.

Algumas pesquisas comprovaram que algumas dessas espécies apresentavam propriedades antibacteriana, antifúngica, hepatoprotetora e antimalárica (VIEGAS JR. et al., 2006). Já recentemente, Silva e colaboradores, (2008) e Kowar e Yadav., (2010) descreveram ações anti- inflamatórias, antioxidante, hipoglicemiante , antiplasmodial, antimutagênico e atividades anti- câncer dos compostos químicos do gênero. Possibilitando desse modo uma grande variedade farmacológica e que demonstra o grande potencial farmacológico deste gênero vegetal.

Dentre as diversas espécies de *Cassia*, destacamos a *Cassia angustifolia*, popularmente conhecida como Sene, para o enfoque do presente estudo. Esta planta é originária do Egito e seu uso vem sendo destacado junto a história da humanidade desde o século IX, pelos árabes. A *Cassia angustifolia* é uma planta medicamentosa amplamente comercializada para fins purgativos, cólicas biliares, congestões encefálicas e constipação por inércia intestinal. O uso indiscriminado desse medicamento pode causar vômitos, cólicas, diarreias, congestão dos órgãos abdominais e aumento do fluxo menstrual, sendo, portanto contra indicado para gestantes (VAN GORKOM et al., 1999).

O uso dessa planta medicinal, principalmente por gestante apresenta altos índices, pois problemas de constipação são muito comuns, podendo afetar até 38%

das pacientes nesta condição. Estes problemas estão relacionados principalmente com alterações fisiológicas decorrentes da gestação (CLARKE; RATES; BRIDI, 2007; MORALES; DÍAZ; BARRIENTOS, 2004). Como sabemos que o sene é o laxante antranóide mais utilizado mundialmente (ROBBERS; TYLER, 1999) acreditamos que possa ocorrer à utilização desta planta ocasionalmente por gestantes que não intencionalmente possam vir a comprometer sua gestação. Porém segundo a organização mundial de saúde os produtos que possuem antraquinonas na sua composição devem ser evitados durante a gravidez (SHULZ. HANSEL; TYLER, 2002), principalmente, no primeiro trimestre, período em que ocorre a organogênese e durante o qual podem acontecer malformações em períodos curtos de exposição.

Recentemente podemos observar um maior interesse científico relacionado aos princípios ativos desta planta (SHULZ; HANSEL; TYLER, 2002). Os principais constituintes químicos da *Cassia angustifolia* são antraquinonas e seus derivados chamados diantronas -8-8'-diglicosídeos também conhecidos como, senossídeos (SIMÕES *et al.*, 2003). As diantronas-8-8'-diglicosídeos chamado senossídeos A-F, com predomínio dos senossídeos A e B apresentam dominância quanto à concentração química da planta (SUN; SU, 2002). Os senossídeos primários E e F correspondem a glicosídeos conjugados com grupos sulfato e oxalato. Como as diantronas possuem dois centros assimétricos (em C-10 e C-10'), tem-se a possibilidade de uma série de estereoisômeros, bem como de alguns compostos opticamente ativos. Conforme a combinação de antronas têm-se diferentes agliconas e glicosídeos de diantronas.

As antraquinonas são considerados um pró-fármaco e não são absorvidos no intestino delgado, mas são divididos e hidrolisados por bactérias intestinais como a *Clostridium sphenoides*, *Clostridium perfringen*, *Lactobacillus xylosu* e *Peptostreptococcus intermedius*, dando origem as Rhein – antronas ou antraquinonas considerado como o principal metabolito ativo. Toda essa reação de redução por ação das bactérias demanda um tempo de 8- 10 h após a ingestão oral desse fármaco, por isso o uso do fármaco durante a noite para o efeito esperado pela manhã (MORALES; DÍAZ; BARRIENTOS, 2004).

Em estudos recentes, por exemplo, Chiou e colaboradores (2012), demonstraram outros efeitos associados aos compostos antraquinônicos como um efeito anticancerígenos ou anti-tumoral em células gliomais C6 de ratos, demonstrando que essas células tiveram um aumento da indução da apoptose principalmente pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial estimulando a liberação do

citocromo C para o citosol e assim induzindo níveis elevados de caspase 9 e caspase 3 nessas células. Além disso, outros grupos de pesquisas verificaram também que os compostos dos derivados antracênicos podem induzir a apoptose através da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) ocasionando um colapso mitocondrial e também produção do citocromo C (ZHANG et al., 2011; CHIANG et al., 2011; YAO et al., 2012;)

Ainda de acordo com Chiang e colaboradores, (2011) as diantronas induzem a morte celular programada através duas vias diferentes levando, por exemplo, às células tumorais gastrointestinais à morte. A primeira via ocorre através da caspase 8 e a outra através da geração de (EROs).

O componente químico antraquinona possui propriedade estrutural química que permite atravessar a membrana plasmática das células animais por apresentarem anéis aromáticos, o que confere a molécula uma característica hidrofóbica e facilidade de interagir com a bicamada lipídica da membrana celular (ARIMA, 2006). Após penetrar na membrana as diantronas se ligam, aos receptores FAS ou Trail ativando a cascata da caspase 8, que pode agir estimulando diretamente a caspase 3-7 ou estimular a liberação de citocromo c mitocondrial. Com o citocromo c ativo a caspase 9, também é ativada e por sua vez é responsável por ativar a caspase-3-7 induzindo assim o processo de apoptose. A mitocôndria estimulada pela caspase 8 pode responder ainda liberando fatores indutores de apoptose (AIF) e endoluclease G (endoG), sendo essa determinante na quebra do DNA celular, desencadeando da mesma maneira a apoptose através de uma via paralela (CHIANG, et al., 2011) (Fig. 1). Outra via de sinalização intracelular que acarreta apoptose estimulada pelas antraquinonas ocorre a partir da geração de EROs. As EROS geradas agem diretamente de maneira nociva no DNA ou causam estresse reticular estimulando a via mitocondrial de geração das proteínas AIF e endoG, induzindo por ambos os caminhos a apoptose (CHIANG, et al., 2011) (Fig. 1).

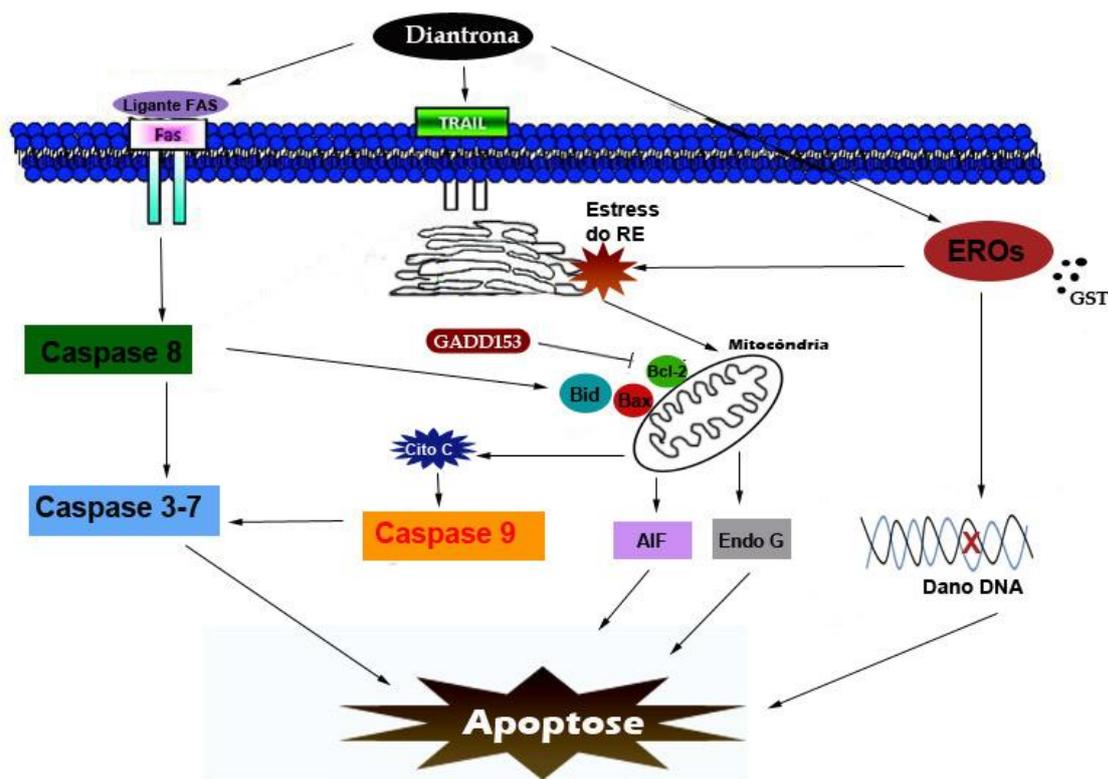


Figura 1- Organograma que sintetiza as hipóteses das sinalizações intracelulares envolvidos nas alterações celulares gestacionais de camundongos fêmeas. Moléculas de diantrona, presentes no extrato hidralcóico de *Cassia angustifolia*, podem entrar diretamente através da bicamada lipídica, liberando EROS, que por sua vez pode causar dano ao DNA e levar a apoptose ou ocasionar estresse do retículo endoplasmático rugoso, levando a ativação de proteínas específicas mitocondriais, que também ativam a apoptose. As diantrona também podem se ligar a receptores de morte celulares específicos como TRAIL e Ligante FAS, desencadeando uma cascata intracelular de ativação da Caspase 8, que por sua vez ativa a proteína inibitória de apoptose, Bid, a Bid se liga a outra proteína mitocondrial inibitória Bax, liberando proteínas mitocondriais AIF e Endo G, responsáveis pela apoptose. A caspase 8 pode também ativar a caspase 3-7 ocasionando a apoptose.

Fonte: Modificado a partir de CHIANG et al., 2011.

Segundo MORALES et al., (2004) existem três principais mecanismos conhecidos para a atividade laxante dos antranóides no intestino. Primeiro refere-se à interação entre rehin antrona ou antraquinona com o epitélio intestinal, onde pode causar um desequilíbrio entre a absorção e a secreção de água intestinal induzindo, portanto um acúmulo de fluido aumentando o trânsito intestinal. Este mecanismo está possivelmente relacionado com a liberação ou com o aumento da síntese de histamina ou outros mediadores (SIMÕES et al., 2003). Segundo mecanismo de ação das antraquinonas no intestino, ocorre através da diminuição da produção de ATP por desacoplamento mitocondrial (fosforilação oxidativa). Por último, Nilsson et al. (2004)

descreve que a baixa concentração de ATP e a inibição da bomba Na / K + ATPase levam a uma queda no gradiente de íons através da membrana celular epitelial com isso impede a absorção de sódio e água do lúmen para o sangue, e pode afetar as junções entre as células do epitélio intestinal induzindo o aumento da secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal.

Os mecanismos de ação dos derivados atracênicos na gestação ou em órgãos como útero e placenta são escassos e merecem maiores investigações a respeito. Porém, Barbosa-Ferreira et al. (2011) observou que o aborto, ou a reabsorção fetal é um dos primeiros efeitos observados em relação a toxicidade pré-natal de animais ruminantes que ingerem sementes de *Cassia occidentalis* (compostas principalmente de Antraquinonas) acidentalmente em pastagens. Ademais observou-se ainda alterações histopatológicas em diferentes órgãos como fígado, baço e placenta, onde indica que a falência desses órgãos pode ocasionar a morte da mãe e do concepto. Atribui-se a molécula de diantrona a interrupção da fosforilação oxidativa das mitocôndrias, visto que a maior parte do oxigênio consumido pela placenta é por meio da fosforilação oxidativa (CARTER, A. M. 2000). À esta reabsorção segundo Tasaka et al. (2004) atribui-se principalmente a intoxicação placentária, pois a diantrona é uma substância de baixo peso molecular (450 Da) podendo então passar pela placenta, ocasionando um efeito direto fetotóxico.

Desse modo, o composto antraquinona, merece um estudo mais detalhado a respeito das alterações induzidas como, por exemplo, contrações uterinas irregulares (CONOVER, 2003; BELEW, 1999), aumento de fluxo sanguíneo para o útero e seus anexos, ampliando o risco de perda do feto, bem como podem passar para o leite materno e causar efeitos indesejáveis, como espasmos, no bebê (SHULZ et al., 2002).

## **2.4 As células trofoblásticas na interação materno fetal**

O Primeiro contato do tecido de origem embriológica com o tecido materno ocorre no momento da implantação do blastocisto no endométrio uterino (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004). Em roedores, a implantação embrionária se inicia com o íntimo e harmônico contato entre a membrana plasmática do blastocisto e do epitélio luminal, garantindo assim a sobrevivência do embrião ao estabelecer uma

superfície estável para trocas metabólicas e aquisição de nutrientes (LIPPE, E. M. O 2007). Esta íntima relação entre o organismo materno e embrionário torna-se gradativamente mais complexa até a completa maturação da placenta que compartilha o suprimento sanguíneo materno, necessário para o desenvolvimento e crescimento fetal (WATSON, D. E.; CROSS, J. C, 2005).

No decorrer da implantação embrionária o endométrio sofre profundas modificações quanto à sua celularidade e vascularização (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1989). Principalmente os fibroblastos do estroma endometrial sofrem um fenômeno de transformação celular chamado de decidualização, que é resultante da modificação da forma, ultraestrutura e metabolismo destas células (NATALE, 2010). Em roedores a reação decidual, se inicia por volta do 5º dia de gestação, no endométrio que circunscreve a área da implantação embrionária junto à cripta da luz uterina, na região antimesometrial. À medida que a implantação se concretiza e ocorre o crescimento embrionário, a reação decidual propaga-se para a região mesometrial. Durante todo esse processo, a matriz extracelular do estroma endometrial também sofre modificações estruturais com mudanças no colágeno e proteoglicanas (ROMAM, 2001). Desse modo atribuem-se à decídua algumas funções de conter a invasividade do trofoblasto, manter a ancoragem segura do blastocisto, além de promover a nutrição do embrião e produzir hormônios pra a manutenção da gestação (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1991). Existem também alguns tipos específicos de células residentes na interface- materno fetal que são de grande relevância para uma perfeita gestação e manutenção do equilíbrio existente entre o feto e a gestante (ALBIERI et al., 2005).

Apesar da origem embrionária, as células trofoblásticas que revestem o blastocisto de primatas e roedores não participam da formação do corpo do embrião propriamente dito, mas, desempenham papéis de extrema importância relacionados ao estabelecimento de interações funcionais com o organismo materno. Estas se localizam entre os tecidos maternos e fetais durante todo o período gestacional, adquirindo um comportamento invasivo, hematotrófico e fagocitário (MÜNTENER ; HSU, 1977; ZUKEMANN; HEADEN et al., 1986; BEVILACQUA ; ABRAHAMSOHN, 1989; GEORGIADES et al., 2002; BEVILACQUA et al., 2010).

A invasividade e a fagocitose de elementos maternos destas células está relacionada à aquisição de nutrientes para o desenvolvimento do embrião até que a placenta esteja plenamente estabelecida (BILLINGTON, 1971), à aquisição de espaço físico para o crescimento embrionário (KATZ; ABRAHAMSOHN, 1987; BEVILACQUA;

ABRAHAMSOHN, 1989) e defesa embrionária na medida em que forma uma barreira física e funcional à entrada de patógenos presentes no organismo materno (SIMMONS; RUSSEL, 1962; PAVIA, 1983; GUILBERT; 1993; GAGIOTI et al., 1996; GULERIA ; POLLARD, 2000; AMARANTE-PAFFARO, 2002; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2010). Sabe-se também que além dessa fagocitose de restos celulares, existe a eritrofagocitose, fundamental para nutrir o embrião com ferro proveniente das hemoglobinas, onde por sua vez, acontece principalmente por volta do 7,5 ou 8º dia de gestação (BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, 1988).

Com o amadurecimento da placenta, entretanto, as células trofoblásticas gigantes gradativamente deixam de expressar atividade invasiva e fagocitária, assumindo outras funções como a síntese de hormônio placentário lactogênico e outras glicoproteínas relacionadas (KANAI-AZUMA; 1994; SOARES et al., 1996). No entanto, esta atividade pode ser restabelecida, como dito anteriormente, quando devidamente estimulada (AMARANTE-PAFFARO 2002; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2010). Estudos realizados in vitro e in vivo por Amarante-Paffaro e colaboradores (2004), onde foi avaliada a atividade fagocítica das células trofoblásticas gigantes perante patógenos como *S. cerevisiae* e *E. Coli*. Observou-se que essas células, quando devidamente estimuladas por diversas vias, são capazes de aumentar sua capacidade fagocítica, corroborando assim a função protetora ao trofoblasto.

Devido a sua atividade fagocitária e invasiva, a presença de uma série de receptores específicos (GUILBERT et al., 1993; ALBIERI, 2001; BEVILACQUA et al., 2010), pode conter uma grande quantidade de enzimas proteolíticas (AMARANTE-PAFFARO et al., 2010). Pelo fato de responder a citocinas inflamatórias como IFN - $\gamma$  (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; ALBIERI et al., 2005; HOSHIDA et al., 2007) e IL -10 (PAULESU et al., 1991), as células trofoblásticas têm sido diretamente comparadas a macrófagos (GUILBERT et al., 1993; GULERIA; POLLARD, 2000; SASMONO et al., 2003; AMARANTE-PAFFARO et al. 2004, ALBIERI et al., 2005; BEVILACQUA et al., 2009). Uma vez que essas células fagocitam, elas produzem e liberam oxigênio e espécies reativas de nitrogênio como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (GAGIOTI et al., 2000). Alguns autores até mesmo têm sugerido a inclusão das células trofoblásticas no sistema imune inato do organismo (GULERIA; POLLARD, 2000; SASMONO et al., 2003; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2010).

É conhecido de longa data que os macrófagos estão diretamente envolvidos com

a atividade inflamatória e remodelação tecidual. (BABIOR et al.,1973). Por outro lado, durante a gestação de camundongos sabemos que toda a interação entre o tecido materno e fetal parece ocorrer através das células trofoblásticas que mantêm o embrião isolado dos tecidos maternos. Dentro deste contexto, acreditamos que as células trofoblásticas gigantes por serem invasivas e fagocitárias e tão semelhantes a macrófagos possam estar diretamente envolvida neste processo inflamatório, de reabsorção embrionária e remodelação do tecido uterino. No entanto, não existem estudos que confirmem histologicamente este fato.

Atualmente, tem sido demonstrado a importância das células trofoblásticas gigantes, macrófagos e neutrófilos na inter-relação de citocinas produzidas sendo pré ou pró inflamatórias, assim como fatores reativos a oxigênio (ROS) em uma gestação normal e também em diversos modelos de desequilíbrio gestacional, podendo levar a morte do embrião, ou reabsorção embrionária em roedores. Alguns trabalhos, por exemplo, Plaks e colaboradores (2010) averigou que na ausência de células decíduais e células trofoblásticas gigantes, ocorre falhas na implantação embrionária, deficiência na produção de fatores angiogênicos como TGF-  $\beta$ 1e remodelação tecidual, culminando, portanto no processo de reabsorção uterina.

## **2.5 A imunologia celular gestacional e o papel fundamental das Células Natural Killer Uterinas.**

Sabe-se também que existem outras populações celulares na decídua, como células do estroma endometrial e populações transitórias de leucócitos (BULMER, 1995). Essas células atravessam a parede dos vasos sanguíneos e linfáticos, podendo atuar contra infecções e microorganismos existentes.

Portanto, o sucesso da implantação e desenvolvimento do feto envolve um conjunto de mecanismos complexos, quanto à diversidade genética do concepto que não induz uma rejeição imunológica. Contribuem para essa tolerância imunológica o fato das células trofoblásticas expressarem apenas antígenos de superfície da classe HLA- G, HLA- C e HLA-E, tidas como moléculas do tipo não clássicas (TRUNDLEY A.; MOFFETT A, 2004). A ausência de HLA- A, HLA- B e HLA – C nas células trofoblásticas, por sua vez, não induziria à resposta imunológica clássica envolvendo linfócito T. Isso, por sua vez explica apenas a presença de 10 % de linfócitos T (CD

3+) na decídua. Por outro lado, é constantemente encontrado, nesse ambiente, uma população de linfócitos NK (Natural Killers) (80%) tanto em roedores (HUNT et al., 2000) quanto em humanos (RUSSEL et al., 2011). Porém, como as células NK se apresentam em maior número na gestação, é de extrema importância o entendimento da sua função, seu surgimento e sua relação com outras populações celulares.

As células Natural Killer circulantes (cNK) pertencem às células do sistema imune inato, exercendo atividade de defesa imunológica contra células tumorais, parasitas e células infectadas por vírus ou bactérias. A linhagem destas células se origina das células progenitoras da medula óssea, onde representam uma pequena fração dos linfócitos do sangue periférico que possuem capacidade citotóxica por apresentarem grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzimas (SMYTH, 2005), e são capazes de lisar a célula alvo sem prévia sensibilização (ZAVAN, 2011). De acordo com Perusia et al., (2005) em humanos existem dois tipos de células Natural Killer no sangue periférico que se diferem pela expressão da molécula CD56. As células CD56<sup>dim</sup>, que representam 90% das células NK periféricas, possuem alta densidade de CD16+ e têm como função a defesa do organismo pela citotoxicidade. É importante salientar que essas células apresentam importantes funções em tecidos mucosos, como por exemplo, o útero, sendo um tecido mucoso que libera grandes quantidades de hormônios e propicia o recrutamento de células imunológicas, apoiando assim o desenvolvimento do embrião (ZHANG et al., 2011). As células CD56<sup>bright</sup>, por sua vez, são CD16- e são menos citotóxicas quando comparadas com as CD56<sup>dim</sup> CD16+, mas apresentam a grande capacidade de produção de citocinas quando ativadas (COOPER et al., 2001).

De acordo com Croy e colaboradores (1997), ultra estruturalmente os grânulos citoplasmáticos das células que constituem o agregado linfóide mesometrial da gestação (MLAp), são heterogêneos e eletrodensos, com morfologia semelhante ao grânulos das células NK circulantes, portanto sendo essas células denominadas na literatura como células Naturais killers uterinas (NKu).

No momento da implantação embrionária as células NKu estão presentes principalmente na região mesometrial do útero, estabelecendo um íntimo contato com as células trofoblásticas, sendo assim alvos das células NKu. Devido à proximidade com as células do trofoblasto, na interface materno fetal, as células NKu reconhecem tais células como sendo de origem fetal e apenas regulam sua invasão (KING, et al., 2000). Portanto, a influência sobre a invasividade das NKu não ocorre por meio da citotoxicidade, apesar da presença de receptores de ativação como NKp46, NKp44,

NKp30, NKG2D, e 2B4 (KOPCOW et al., 2005). O processo de invasão do trofoblasto na decídua e artérias espiraladas é de extrema importância para o estabelecimento de suporte sanguíneo necessário ao feto. Este mecanismo deve ser controlado minuciosamente, uma vez que a invasão exacerbada pode causar danos à gestação, levando a pré-eclampsia, abortos e partos imaturos (HANNA et al., 2006).

A função das células NKu segundo, Trundley; Moffet (2004) pode ser modificada após a ligação de seus receptores com moléculas de MHC não clássicas (HLA-G, HLA-E e HLA-C) expressas pelas células trofoblásticas, e essa modificação pode influenciar na invasividade trofoblástica. Desse modo, um dos mecanismos mais aceitos na regulação da invasão trofoblástica pelas células NKu é a sua produção de citocinas (YU et al., 2006). As principais citocinas e fatores de crescimento secretados incluem: Ang-2, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e Fator de Crescimento Tumoral -  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) que exercem influência inibitória na capacidade de invasão do trofoblasto; além dessas, a IL-8 e proteína induzida por interferon 10 também secretadas pelas células NKu se ligam à receptores das células trofoblásticas induzindo sua migração (HANNA et al., 2006). Portanto, a função geral das células NKu é participar da regulação da homeostasia gestacional e o controle do remodelamento vascular (GUIMOND et al., 1998). Outros estudos, demonstraram por métodos imunocitoquímicos que algumas células trofoblásticas, quando se encontram em apoptose, são circundadas por células NKu, sugerindo assim que as próprias NKu desencadearam esse processo de apoptose das células trofoblásticas, ou elas podem, ter sido recrutadas após o início da apoptose (ZAVAN, 2011).

Em humanos, principalmente na fase lútea secretora tardia do ciclo menstrual, encontramos o maior número de células- NKu e estas são mantidas pela gestação, principalmente na região mesometrial do útero, onde nesse local se proliferam (SHARMA, 1998).

As células NKu em camundongos estão presentes em porções variadas no útero durante a gestação, ou em úteros virgens (MANDELBOIM, O.; STANIESTSKY, 2010). Croy e colaboradores (1997), onde utilizou marcadores específicos como Ly49 e Asialo- GM-1, sugeriu que as células precursoras de NKu poderiam ser residentes permanentes do útero, surgindo a partir da segunda semana após o nascimento. Durante a puberdade, não há mudanças na localização ou no número relativo de NKu, e as células pequenas e agranulares são consideradas como precursoras das NKu (pré- NKu) (ZHANG et al., 2011). Há controversas sobre sua incidência no útero virgem ou não prenhe em decorrência da ambiguidade dos marcadores utilizados

para identificação dessas células, uma vez que não existe marcador específico que identifique as formas precursoras ou indiferenciadas. Porém por outro lado, Paffaro JR e colaboradores, (2003) utilizando lectina *Dolichos biflorus*, que apresenta alta seletividade e afinidade pelas células NKu de camundongos (CORRÊA DA SILVA, 1997), em estudos estereológicos e quantitativos, encontraram formas precursoras de NKu apenas a partir do 5º dia de gestação.

Muitos estudos demonstraram que a atividade citotóxica das NKu é reduzida quando comparada com células NK do sangue periférico, embora as NKu expressem vários receptores de ativação, bem como níveis elevados de perforina, granzinas A e B (BURKE et al., 2010). A atividade citotóxica das NKu pode ser ativada apenas em situações na qual a homeostase gestacional seja rompida com, por exemplo, em situações de infecção por vírus, bactérias, ou compostos químicos que alteram a permeabilidade do leito vascular. Na ausência destas situações, as interações da NKu com células imunológicas e não imunológicas na sua redondeza inibem radicalmente sua citotoxicidade (MURPHY et al., 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo principal avaliar os possíveis efeitos da administração do extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* (Sene) em diferentes períodos da gestação de camundongos, tanto no organismo materno como no concepto, numa tentativa de elucidar os poucos dados existentes na literatura científica a respeito da utilização desta planta na gestação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, o principal componente químico constituinte no extrato de *Cassia angustifolia*.
- Averiguar um possível efeito emenagogo, contraceptivo e/ou abortivo do extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* na prenhes de camundongos.
- Averiguar o número de possíveis sítios de reabsorção, hemorragias e/ou quaisquer outras alterações morfológicas que possam ocorrer devido à influência deste extrato.
- Avaliar as possíveis alterações encontradas comparativamente entre os grupos experimentais de acordo com o período de administração do extrato em cada grupo de maneira a determinar os períodos mais críticos para o tratamento.
- Analisar histologicamente cada uma das possíveis alterações morfológicas encontradas nas fêmeas prenhes e/ou nos conceptos em desenvolvimento.
- Calcular a taxa de implantação embrionária (TI), a viabilidade embrionária (VE) e a perda embrionária (PE) em cada um dos períodos de tratamento.
- Estudar o comportamento das células trofoblásticas e NKu de camundongos nos sítios de implantação que possivelmente venham a apresentar alterações, hemorrágicas e/ou reabsorções embrio/fetais.
- Quantificar a incidência e distribuição das células NKu DBA reativos em

cortes histológicos de útero de camundongos submetidos ao tratamento com Sene.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo do extrato hidroalcoólico

As amostras de *Cassia angustifolia* (sene) foram adquiridas no mercado central de Belo Horizonte (MG) todas de um único lote de maneira a evitar diferenças de compostos orgânicos entre os exemplares de acordo com a sazonalidade e regionalização do plantio impedindo assim variações nos grupos experimentais devido a variabilidade na composição do extrato. As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG antes da utilização. As partes aéreas das plantas foram então secas em estufa ventilada a 40°C, trituradas e armazenadas em pacotes contendo 100g cada. Para preparo do extrato, cada 100g da erva triturada foi transferida para um percolador onde permaneceu por 72 h em álcool etílico 70 % para extração dos princípios ativos. Após este período, o extrato foi gotejando na velocidade de 10-12 gotas por minuto até perder a coloração e o cheiro característico da erva e concentrados em um rota-evaporador à vácuo a 50°C até total eliminação do álcool. O extrato foi então liofilizado e armazenado em um dissecador mantido em geladeira até o momento de preparo da solução estoque para tratamento das fêmeas.

### 4.2 Animais

Neste trabalho foram utilizados 120 camundongos Swiss fêmeas entre 8 e 16 semanas de idade mantidos sob regime ad-libidum de água e ração granulada no biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Estas mesmas fêmeas virgens foram acasaladas com machos adultos da mesma linhagem na proporção 1:3 ao final de cada tarde. Na manhã em que for constatada a presença de tampão vaginal foi considerada como 1º dia de gestação (ddg) (Fig. 2. A).

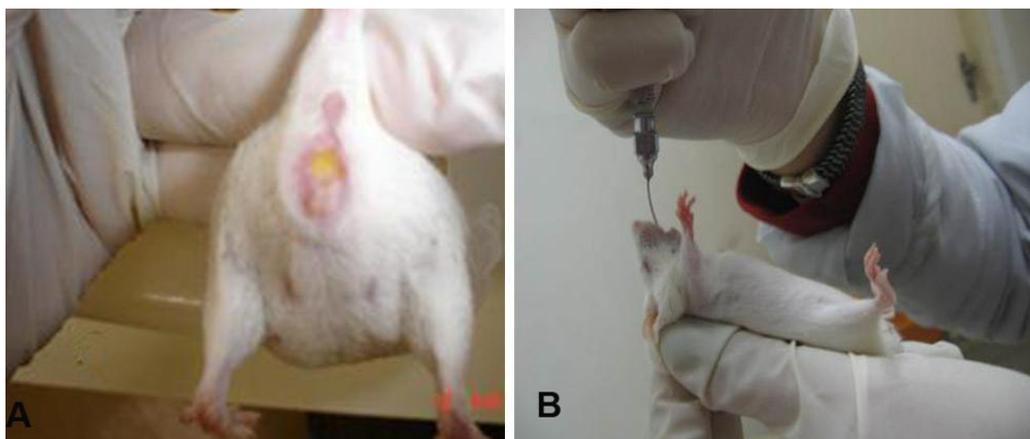


Figura 2- A- Confirmação do acasalamento. A presença da rolha vaginal (plug-vaginal), considerado como o 1º dia de gestação (ddg). B- Camundongos prenhes submetidos ao tratamento por gavagem.

Fonte: Do Autor

### 4.3 Dose e Administração do Extrato

O extrato foi previamente suspensos em água destilada na proporção de 250 mg/mL para preparo de uma solução de estoque a qual foi mantida por 4 dias em geladeira e administrada por meio de uma agulha de gavagem (fig. 2 B) na proporção de 1000 mg/kg do animal, diariamente, no mesmo horário, durante um período de 4 dias de acordo com cada um dos grupos experimentais (TABELA I), após os cálculos o volume de tratamento foi de 120µl do extrato de *Cassia angustifolia*. A essa concentração utilizada, segundo Longato; Amarante- Paffaro, 2007, foi realizada uma curva dose- resposta das concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 mg/kg do animal de *Cassia angustifolia*. Observaram que as concentrações de 750, 1000, 1500 e 2000mg/kg apresentaram maiores alterações nas fêmeas prenhes. Portanto partimos desses resultados para estabelecer uma concentração intermediária no respectivo estudo. Ainda segundo o uso da *Cassia angustifolia* pela população carente, onde ela também é utilizada por meio de chá ou decocção, a dosagem calculada leva em consideração a média de um “punhado” pesado pela população para preparo de 1 litro de chá ministrado a uma pessoa de porte médio. Portanto o peso de um “punhado” equivale ao peso de 100g de folhas trituradas e submetida ao procedimento de extração dos componentes. O extrato bruto apresentou um rendimento de 4,97%, ou seja, a massa total das 100 gramas de folha extraídas e liofilizadas foi de 4,978mg.

Foram utilizadas pelo menos três fêmeas prenhes para cada dia gestacional

coletado após o tratamento de cada um dos grupos experimentais mais três fêmeas controle, totalizando 90 animais. Os animais utilizados como controle receberam água destilada na mesma proporção e condições experimentais dos grupos tratados.

#### 4.4 Coleta e Processamento do Material

As fêmeas foram laparatomizadas no 8°, 11°, 15° e 18° ddg (dia de gestação) sempre no período da manhã, após o sacrifício por deslocamento cervical para a coleta dos sítios de implantação e ovários. Posteriormente foi realizada a morfologia macroscópica dos órgãos internos foi observada em busca de alterações morfológicas macroscópicas evidentes. Toda alteração observada foi devidamente contada e documentadas através de uma câmera digital (Sony Cybershot DSC-W120, 7.2 Megapixels, Zoom Ótico 4x/Digital 8x). Os dados coletados foram estudados e organizados para montagem de tabelas e gráficos.

Tabela 1 - Grupos Experimentais com seus respectivos períodos de tratamento e coleta.

Grupos Experimentais	Dias de Tratamento	Coleta do Material
GRUPO I Período de pré-implantação	1° ao 4°ddg	8°, 11°,15°,18° ddg e 1° dia pós-parto
GRUPO II Período de implantação embrionária	4° ao 7°ddg	8°, 11°,15°,18° ddg e 1° dia pós-parto
GRUPO III Período pós implantacional	7°ao 11°ddg	15°,18° ddg e 1° dia pós-parto

Os ovários foram coletados inteiros, observados imediatamente em microscópio estereoscópico para contagem dos corpos lúteos e observação de possíveis alterações morfológicas.

Os úteros foram removidos e esticados em placa cirúrgica para documentação fotográfica e análise macroscópica quando então foi contado o número de sítios

embrionários implantados e se presentes, também, foi contabilizado o número de sítios embrionários de tamanho reduzido, de hemorragias presentes entre os sítios de desenvolvimento embrionários e entre os mesmos assim como o número de prováveis sítios em reabsorção.

Nas fêmeas sacrificadas no 8º ddg, os cornos uterinos foram cuidadosamente removidos, e os sítios de implantação embrionários foram individualizados para processamento. No 11º ddg, os sítios de implantação além de individualizados foram seccionados transversalmente para possibilitar melhor penetração das soluções durante o processamento das amostras. Logo após, os embriões foram cortados minuciosamente ao meio para melhor processamento. No 15º e 18º ddg os fetos foram separados do botão placentário e ambos seccionados longitudinalmente.

#### **4.5 Análise da taxa de implantação (TI), viabilidade e perda embrionária (VE e PE).**

Para o cálculo da taxa de implantação embrionária o número de corpos Lúteos encontrados em microscópio esteroscópico dos dois ovários deve ser comparado diretamente ao número de sítios de implantações ou fetos encontrados em desenvolvimento ao longo dos cornos uterinos. Quando este número for equivalente consideramos uma taxa de implantação de 100%. No entanto quando o número não for equivalente devemos calcular a Taxa de implantação embrionária da seguinte forma:

$$TI = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação ou fetos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de corpos Lúteos}}$$

A porcentagem de embriões viáveis (ou viabilidade embrionária) deve ser calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$VE = \frac{\text{total do n}^\circ \text{ de embriões} - \text{embriões alterados} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de embriões}}$$

A porcentagem de perda embrionária deve ser calculada da seguinte maneira:

PE = VE - 100

#### 4.6 Inclusões em parafina e obtenção de cortes histológicos

Todo o material biológico, foi fixado por imersão em solução aquosa de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M pH 7,4 por 3h em geladeira e processado rotineiramente para inclusão em parafina histológica contendo DMSO (Histosec - Merck Chemical Co., SP, BR).

Cortes de 5-7  $\mu$ m de espessura foram obtidos em um micrótomo rotativo (Leica RM 2135) e coletados em lâminas histológicas revestidas com poli-L-lisina a 1% (Sigma-St.Louis/EUA, cod. P8920).

As lamínas histológicas obtidas, foram coradas com hematoxilina e Eosina (HE) para análise em microscopia de luz ou reservadas para reações citoquímicas para lectina DBA.

#### 4.7 Citoquímica com lectina DBA (Dolichos Biflorus agglutinin)

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados com xilol por duas vezes de 20 minutos, seguido da hidratação em gradiente decrescente de etanol absoluto, 95°C, 85°C, 80°C e 70°C e água destilada, por cinco minutos em cada solução. Após hidratação os cortes foram submetidos à reação de citoquímica para lectina DBA da seguinte maneira:

A - Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;

B - Incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;

C - Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;

D - Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;

E - Incubação com lectina DBA (Dolichos biflorus) biotinada (Sigma Chemical Co. USA) diluída na proporção de 1:300 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4°C;

F - Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;

G - Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.–

USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:300 por 1 hora;

H - Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;

I - Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250 $\mu$ L) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250  $\mu$ L) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vols. (20  $\mu$ L).

J - Lavagem com água destilada;

L - Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos;

Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

#### **4.8 Estudo estereológico em microscopia Fotônica**

Para o estudo estereológico das células NKu foram analisados aleatoriamente 3 cortes histológicos de 3 sítios de implantação embrionária distintos de 3 animais por grupo. Foram utilizados 3 animais controles, 3 animais para o tratamento I (tratados do 1º ao 4ºddg), 3 animais para o tratamento II (tratados do 4º ao 7ºddg) sacrificados no 8ºddg. Para a análise no 11ºddg foram realizados os mesmos grupos de controle e tratamento. Ambos foram submetidos à citoquímica de lectina DBA. Foi realizado a análise quantitativa pela densidade dos perfils (QA) em uma área teste de (AT) de 200 $\mu$ m<sup>2</sup> do total geral de células uNK em três regiões do útero prenhe, modificado a partir dos experimentos de Paffaro Jr *et al.*, 2003 e representado nas figura 4 e 5.

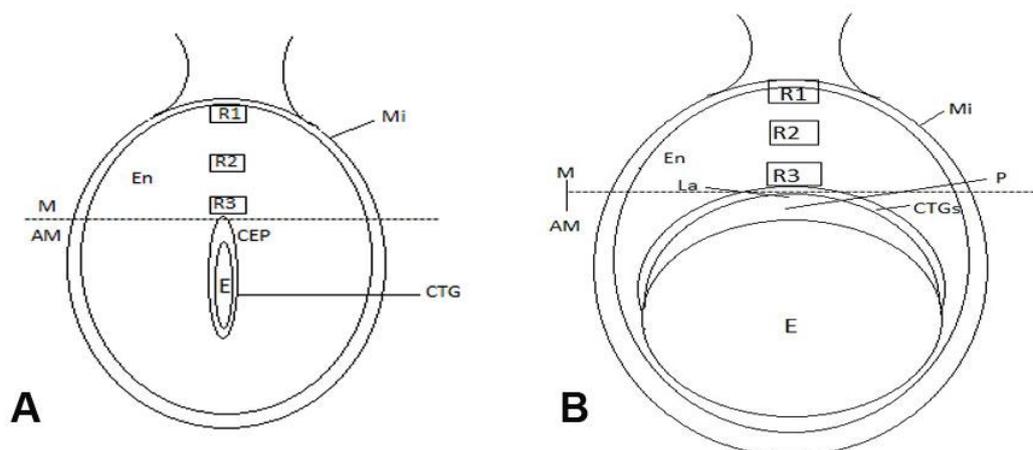


Figura 3- A- Diagramas representando um sítio de implantação no 8ºddg (A) e no 11º ddg(B). B- Regiões 1 (R1), 2 (R2), 3 (R3) utilizadas para a quantificação total de células NKu. M, Região Mesometrial; AM, região Antimesometrial; Mi, miométrio; CEP, Cone Ecoplacentário; CTG, Células trofoblásticas gigantes; E, embrião e En, endométrio. P, Placenta.

Fonte: modificado, segundo PAFFARO *et al*, 2003

#### 4.9 Análise Cromatográfica

O perfil cromatográfico foi determinado utilizando cromatógrafo Shimadzu Prominence equipado com detector de arranjo de fotodiodos (modelo SPD-M20A) e coluna simétrica C<sub>18</sub>. Foi utilizada, como fase móvel, solução aquosa de: metanol; água; ácido acético (20:80: 01 v/v/v) (eluente A) e solução de: metano; água; ácido acético (80; 20; 0.1) (eluente B). Ambos em pH 4.0. O extrato foi eluído segundo o sistema A/B: 80% de A por 5 minutos; seguido de eluição em gradiente até 100% de B por 15 minutos; e foi mantido 100% de B durante mais 20 minutos. O fluxo foi de 0.8 mL/minuto, a absorbância em UV visível foi monitorada a 285 nm e o tempo total de análise foi de 40 minutos. O extrato hidro-etanólico foi solubilizado na fase móvel B na concentração de 1mg/mL e volume de injeção foi de 25 µL. O limite mínimo de detecção do método foi 0.2µg/ml de senosídeo A e 0.1µg/ml de senosídeo B. Os padrões analíticos utilizados foram de acordo com Xu e colaboradores, 2010.

#### 4.10 Análise estatística

Os dados quanto a morfologia macroscópica foram expressos com a média  $\pm$  S. D. (Desvio padrão) para 3 animais. As diferenças entre os grupos controles e os tratados com o extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* foram analisados usando ANOVA two-way, seguido por pós-teste de Scott- Knott, onde  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ , foi considerado significativo.

Para a análise estatística da taxa de implantação, viabilidade gestacional, perda embrionária e análise estereológica das NKu, os dados foram expressos com a média  $\pm$  S.E.M (Erro padrão da média) para 3 animais. Onde os símbolos representam níveis de significância, onde foi utilizado one-way ANOVA com pós-teste Bonferroni's  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  quando comparados com o grupo controle.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Análise do uso da *Cassia angustifolia* e seu perfil cromatográfico

Em nosso trabalho, a espécie *Cassia angustifolia* (sene) foi escolhida para ser utilizada na gestação de camundongos para que pudéssemos averiguar se esta planta pode ser considerada como um agente efector de alterações na gestação capaz ou não de ocasionar um efeito abortivo. Inicialmente partimos dos relatos presentes junto à cultura popular de diversas regiões onde o sene esta associado a efeitos abortivos e emenagogos (BELEW, 1999; CIGANDA, A.; LABORDE, B., 2003; TOLEDO et al., 2000; BARBOSA- FERREIRA et al., 2011). No entanto, nossa abordagem tomou rumos muito mais abrangentes. Foi realizada uma análise morfológica do efeito do extrato hidroalcoólico desta planta ao longo de toda a gestação, podendo desse modo observar sua influência direta no embrião e nos tecidos maternos. Um enfoque mais detalhado foi direcionado ao processo de “turn over” tecidual, ou seja, remodelamento do tecido pelas CTGs após a morte embrionária e na influência das Nk uterinas (NKu) como indutores deste processo de

forma semelhante a inflamação.

O extrato obtido a partir das partes aéreas de *Cassia angustifolia* utilizado em nossos estudos apresentou uma coloração acastanhada e cheiro característico semelhante ao descrito por Barbosa- Ferreira (2008). Após a obtenção do extrato, para conseguirmos identificar seus constituintes presentes em maior quantidade, optamos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). De acordo com Xu e colaboradores (2010) este método analítico fornece uma ótima resolução para a maioria dos compostos podendo ser efetivamente usado para a análise de extratos vegetais.

Desta maneira, após a verificação de padrões analíticos como: o comprimento de onda, o tempo total gasto da corrida cromatográfica e a coluna cromatográfica utilizada, foi possível a padronização das fases móveis. A fase móvel A, foi constituída de metanol, água e ácido acético (20:80: 0,1v/v/v) e a fase B por água, ácido acético e metanol de (80: 20: 0,1v/v/v) (BALA et al., 2001). Nossos resultados referentes à análise do extrato de sene produzido mostraram dois picos majoritários de retenção. O primeiro aos 33.215 mim e o segundo aos 36.637 mim (Graf. 1). Foi possível observar também a presença de outros picos não majoritários como, por exemplo, no tempo de retenção 28,336, 30,869, 31,579, 34,274, e 41,447 mim (Gráf. 1). A esses picos podem estar relacionados a composto químico também existente no extrato de *Cassia angustifolia*, porém não foi o foco principal da análise fitoquímica desse estudo. Sugerimos que para uma análise mais delicada é necessário a corrida cromatográfica de um extrato de *Cassia angustifolia* purificado, assim podemos dizer quais os outros picos encontrados e eliminar a contaminação existente no extrato bruto da planta.

### Cromatograma: Extrato bruto de *Cassia angustifolia*

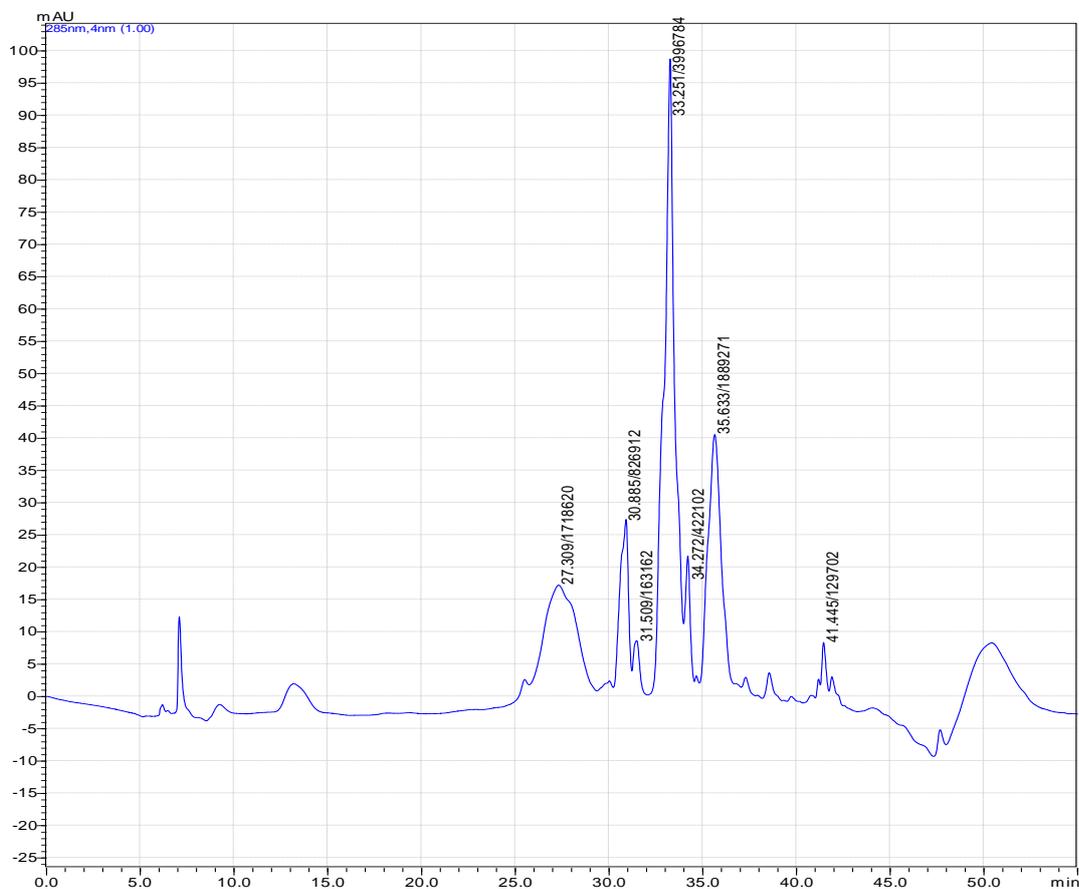


Gráfico 1 - Cromatograma HPLC do extrato bruto de *C. Angustifolia* sem a presença do padrão de senossídeo A. Picos majoritários, nos tempos de retenção 33.215 e 36.637, onde possivelmente representam senossídeos B e A respectivamente.

Fonte: Do Autor.

Posteriormente foi realizado a corrida do padrão de senossídeo A, comprado comercialmente, juntamente com uma amostra do extrato hidroalcolico de *Cassia angustifolia* (Gráf. 2). Através dessa análise cromatográfica foi possível identificar também alguns picos majoritários, porém no tempo de retenção 33,215 e 36,633 min foi semelhante aos picos encontrado na análise cromatográfica do extrato bruto ou puro. Desta maneira através das condições analíticas e o sistema de solventes desenvolvidos nesses cromatogramas estabelece uma boa resolução para o composto químico senossídeo A, do extrato bruto de *Cassia angustifolia* e também para outros componentes existentes.

Cromatograma: Extrato bruto + padrão de senossídeo A

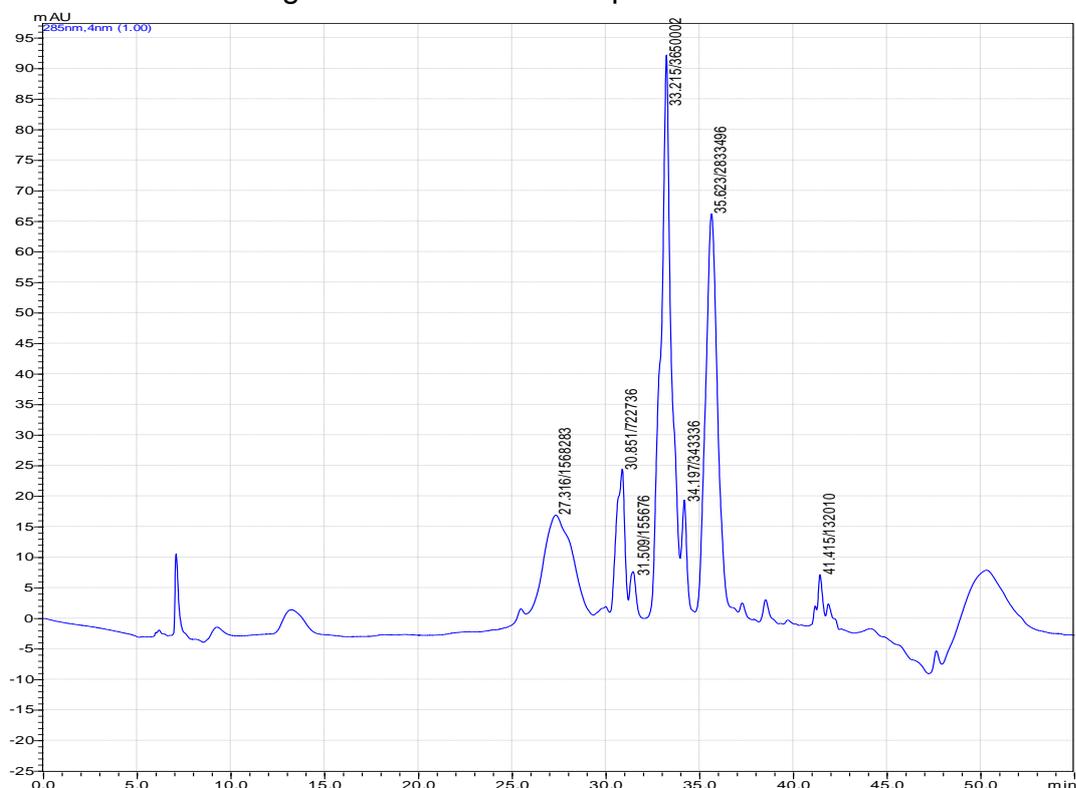


Gráfico 2 - Cromatograma HPLC do extrato bruto de *C. Angustifolia* com a presença do padrão de senossídeo A. Picos majoritários, nos tempos de retenção 33.215 e 36.637, onde possivelmente representam senossídeos B e A respectivamente.

Fonte: Do Autor.

Posteriormente foi realizada uma corrida cromatográfica da subtração da corrida do extrato menos (-) o Extrato (+) o padrão de senossídeo A (Gráf. 3). Nesse tipo de análise cromatográfica é adicionado quantidades conhecidas do extrato bruto de *Cassia angustifolia* (25 $\mu$ L) conhecido também como Spike. As amostras podem ser adicionadas em pelo menos quatro diferentes concentrações, como por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível, e em uma concentração máxima permissível em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Em nosso estudo utilizamos uma concentração próxima ao limite de detecção. Portanto foi possível observar que o pico presente em nossa amostra do extrato bruto no tempo de retenção 36.127 mim, observado no perfil cromatográfico era representativo do senossídeo A. O outro pico que apresentava em nossa mostra um pico de retenção aos 33.215 mim, acreditamos que seja equivalente

ao senossídeo B, pois apesar de não ter sido realizada uma corrida com o padrão específico para esta molécula à curva do HPLC representativa do extrato de sene bruto conte um padrão semelhante ao observado por Bala e colaboradores (2001) onde é descrita a presença de um pico similar para o senossídeo B. Foi realizado a corrida separadamente do padrão de senossídeo A (dados não mostrados), onde foi possível observar um pico majoritário no tempo de retenção de 36,127mim, oque está de acordo com observado por Sun e colaboradores (2002),onde descrevem como os principais constituintes da *Cassia angustifolia* as diantronas-8-8'-diglicosídeos chamados senosídeos A-F, com predomínio dos senosídeos A e B o que confere com os dados apresentados em nosso gráfico.

Cromatograma: Subtração da corrida do extrato menos o Extrato + o padrão de senossídeo A

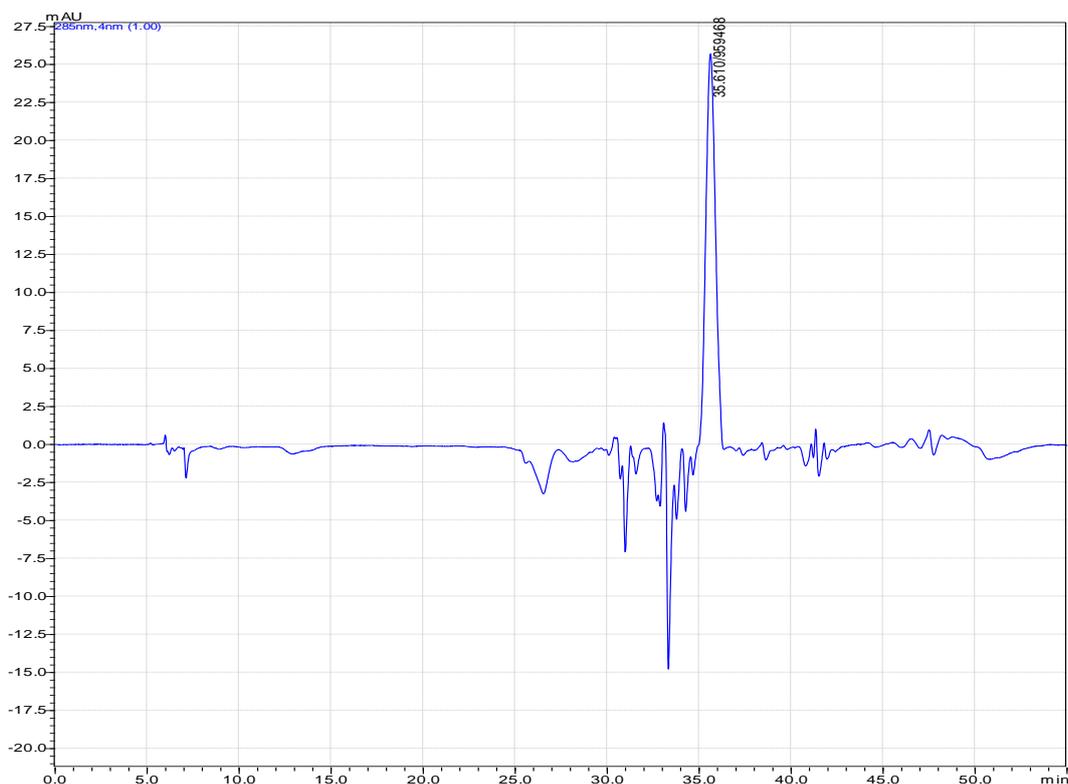


Gráfico 3- Cromatograma: Subtração da corrida do extrato menos o Extrato + o padrão de senossídeo A (Spike). Pico majoritário, no tempo de retenção de 36,147 mim , onde representa o senosídeos A.

Fonte: Do Autor.

As moléculas tanto senossídeo A como o senossídeo B, segundo Barbosa-Ferreira e colaboradores (2005) podem estar associados a efeitos deletérios nos estágios iniciais da gestação de camundongos, podendo aumentar significativamente

o número de embriões anormais e causar um atraso no desenvolvimento e transporte embrionário podendo também diminuir a implantação. Ainda segundos outros trabalhos, por exemplo, Morales e colaboradores (2004), estes compostos, apresentam características de baixo peso molecular (450 Da), passando assim para a circulação placentária e posteriormente atingindo o desenvolvimento e nutrição do embrião. Na gestação acreditamos que possa interferir em uma série de processos prejudiciais, por exemplo, hemorragias, reabsorções embrionárias, danos na integridade decidual, assim como na interação das CTGs com as NKu. Portanto o presente trabalho avaliou o efeito em diferentes períodos gestacionais, a fim de elucidar qual sua influência na interação materno fetal e no desenvolvimento embrionário.

## **5.2 Análise morfológica**

Após a laparotomia todas as fêmeas tiveram seus úteros e ovários coletados e a observação destes órgãos isolados, nos animais controle, nos permitiu caracterizar as alterações anatômicas normais que podem ser observadas durante a progressão da gestação de camundongos. Nos animais analisados no 8<sup>o</sup> ddg observamos em média 12-14 estruturas esféricas de tamanho uniforme distribuídas de forma mais ou menos semelhante entre ambos os cornos uterinos. Estas estruturas, denominadas sítios de implantação embrionária (SIE), variavam em torno de 5 a 7 por corno uterino e apresentavam uma coloração róseo sendo o espaço delimitado entre as mesmas formado por um tecido límpido e de coloração mais opaca. Esta organização deixava o útero gravídico com a aparência de um pequeno colar de contas (Fig. 4 A). Os ovários destas mesmas fêmeas quando observados ao estereomicroscópio, apresentaram corpos Lúteos avermelhados e bastante evidentes em meio a um estroma ovariano de cor pálida (Fig. 4 B). O número de corpos Lúteos presentes nos ovários de um animal, quando somados, costumava coincidir com o número total de SIEs em desenvolvimento observados em ambos os cornos uterinos. Estes dados comprovaram que todos os ovócitos liberados, pelas fêmeas controles, haviam sido fecundados e implantados no endométrio materno. No 11<sup>o</sup> ddg observamos os SIEs distribuídos de forma semelhante ao descrito para o 8<sup>o</sup> ddg, mas agora estes

apresentavam uma coloração rósea mais intensa e praticamente o dobro do tamanho. As regiões inter-sítios continuavam límpidas, com uma coloração opaca, porém, apresentavam sua área reduzida devido ao crescimento do SIEs (Fig. 4 C). Os ovários destes animais nada continham de diferente em relação aos do 8ºddg e o número de Corpos Lúteos presentes também era coincidente com os SIEs observados. Os cornos uterinos das fêmeas prenhes observados no 15º ddg apresentaram uma distribuição uniforme de fetos evidentes (Fig.4 D). Destaca visivelmente o aumento de tamanho dos sítios de desenvolvimento e estes ainda cresceram mais um pouco quando observados no 18º ddg (Fig. 4 E). Devido a este grande crescimento a parede uterina fica com sua espessura bastante fina e nos possibilita visualizar por transparência os fetos voltados para a região antimesométrial e as placentas todas voltadas para o mesométrio (Fig. 4 F).

Toda a descrição morfológica da gestação de camundongos observada durante a coleta dos grupos controles esta de acordo com os trabalhos de; LIPPE, 2007, CARMO et al., 2004; BOARETO, 2007, onde observaram as mesmas características morfológicas do respectivo trabalho. Em alguns poucos animais foi possível observar um evento isolado de reabsorção. Normalmente estes episódios coincidiam com gestações em períodos mais avançados com maior número de fetos em desenvolvimento o que parece estar de acordo com uma seleção natural por falta de espaço físico no ventre materno (FABIAN et al., 2004).

A análise morfológica macroscópica das fêmeas de camundongos tratadas com o extrato hidroalcolico de sene nos permitiu averiguar alterações morfológicas que sinalizaram uma interferência significativa na integridade da gestação durante o desenvolvimento embrionário e/ou fetal de acordo com o efeito do extrato ministrado nos períodos de pré-implantação, implantação e pós implantação embrionário como descrito abaixo.

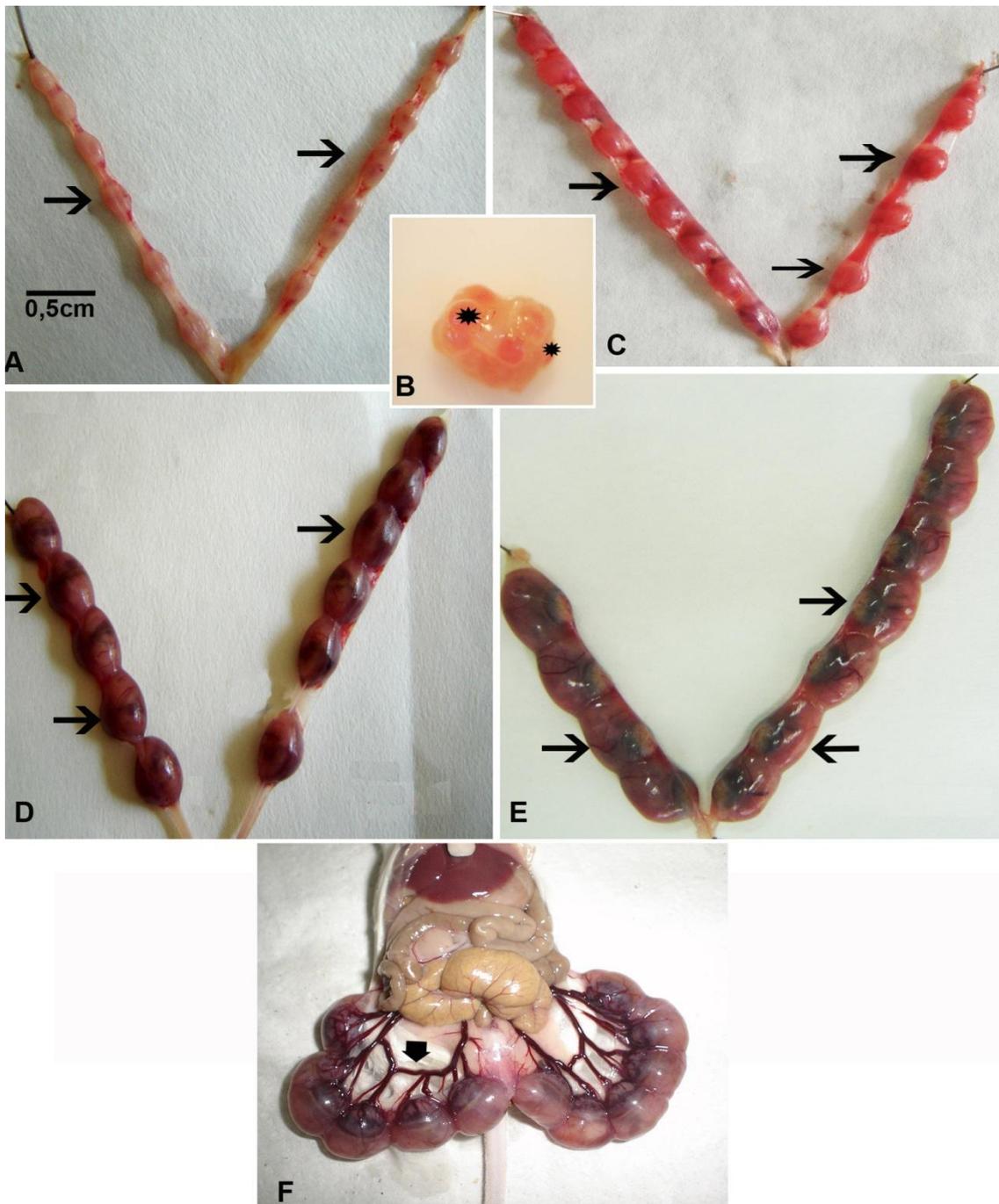


Figura 4- Fotografias de úteros e ovário de camundongos fêmeas controles em diferentes períodos gestacionais. A- Útero grávido no 8<sup>o</sup> ddg, setas indicam sítios embrionários normais. B- Ovário de um animal controle no 8<sup>o</sup> ddg corpos lúteos bem evidentes e avermelhados (asteriscos). C- Útero grávido no 11<sup>o</sup> ddg, setas representam sítios normais, e tamanhos característicos para esse dia de gestação. D- Útero grávido de animal controle no 15<sup>o</sup> ddg, o embrião já desenvolvido (setas). E- Útero grávido no 18<sup>o</sup> ddg, setas indicam o embrião e a placenta. F- Fêmea laparotomizada no 18<sup>o</sup>ddg, seta indica vasos sanguíneos da região mesometrial (seta) e o embrião voltado para a região oposta, anti- mesometrial. A barra representa 0,5 cm.

Fonte: Do Autor.

### 5.2.1 Período pré-implantacional.

Nos animais tratados com extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* durante o período pré-implantacional, do 1º ao 4º ddg, não observamos diferenças morfológicas comparadas aos ovários coletados das fêmeas prenhes do grupo controle em nenhum dia de gestação (ddg).

Quando o útero foi exposto e avaliado macroscopicamente no 8º ddg foi possível observar que a quantidade de SIEs presentes nos cornos uterinos se manteve semelhante ao controle (Gráf. 4 A) e estes SIEs eram aparentemente normais, com tamanho e coloração semelhante ao controle, sem indícios de alterações hemorrágicas evidentes (Fig. 5 A).

As fêmeas submetidas ao mesmo tratamento observadas no 11º ddg apresentaram o número de SIEs constante (Gráf. 4 B) No entanto, a região entre os SIEs apresentou uma quantidade de focos hemorrágicos em média sete vezes maior do que o controle referente ao mesmo ddg analisado (Gráf. 4 B). Estas áreas hemorrágicas contabilizadas, morfológicamente apresentam uma coloração escura e um aspecto semelhante a um coágulo sanguíneo (Fig. 5 B).

Nas fêmeas analisadas no 15º ddg observamos hemorragias entre os SIEs em maior quantidade que nos animais controles, no entanto, o número destes focos hemorrágicos parecia estar mais reduzido em comparação aos animais tratados no 11º ddg (Gráf. 4 C). Nestas fêmeas foram observados também focos hemorrágicos no interior dos SIEs e SIEs em reabsorção (Gráf. 4 C). Morfológicamente estas hemorragias que se estendem para o interior dos SIEs podem ser evidenciadas por regiões enegrecidas ocupando parte dos SIE ou toda a sua área. As reabsorções são facilmente identificadas, pois são caracterizadas como um SIE de tamanho bastante reduzido com aspecto necrótico (Fig. 5 D).

No 18º ddg observamos que as fêmeas tratadas apresentavam um aumento bastante significativo do número de reabsorções observadas e as demais alterações eram demasiadamente reduzidas (Gráf. 4 D e Fig. 5 D).

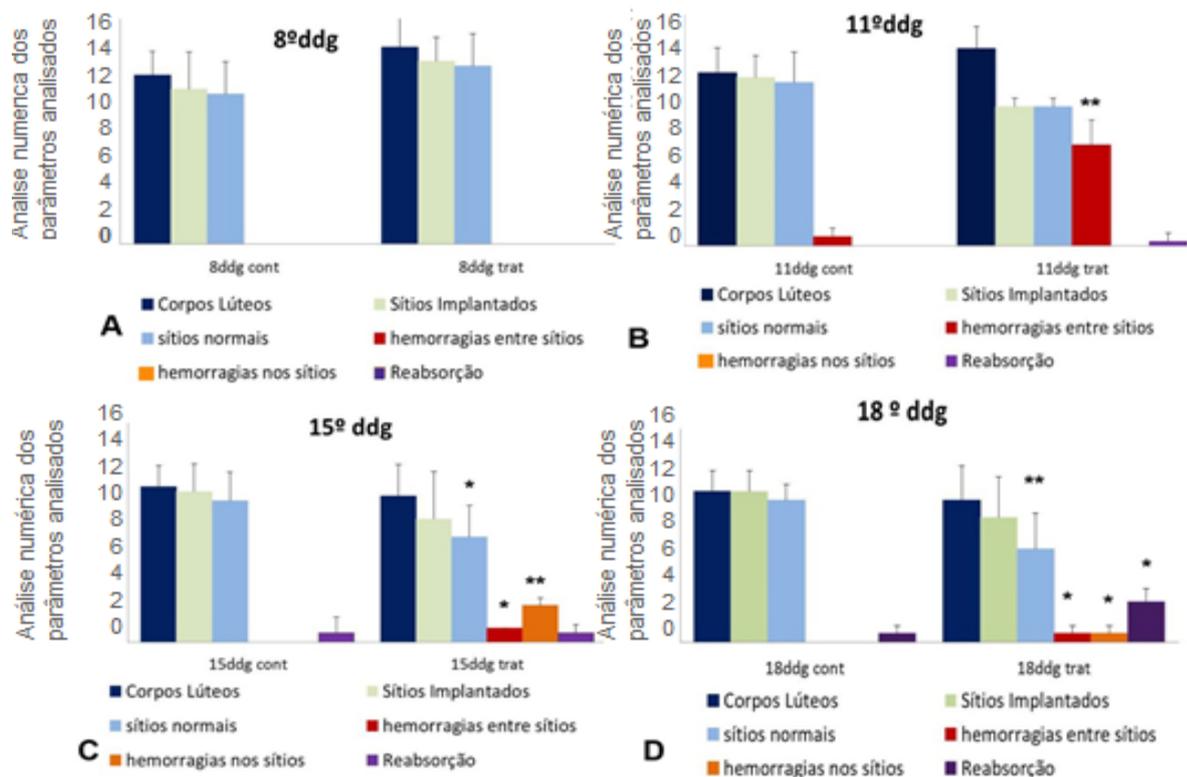


Gráfico 4 - Os gráficos demonstram as médias da quantidade numérica dos parâmetros analisados através da macroscópica morfológica. Animais controle e tratados com *Cassia angustifolia* no período pré – implantacional (1º ao 4º ddg). A- Animais sacrificados no 8º ddg. B- Animais sacrificados no 11º ddg. C- Animais sacrificados no 15º ddg. D- Animais sacrificados no 18º ddg. Os valores foram expressos com a média  $\pm$  SD (Desvio padrão). Diferenças entre animais controle e tratados foi utilizado two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Scott- Knott,  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  quando comparados com o respectivo controle de cada parâmetro.

Fonte: Do Autor.

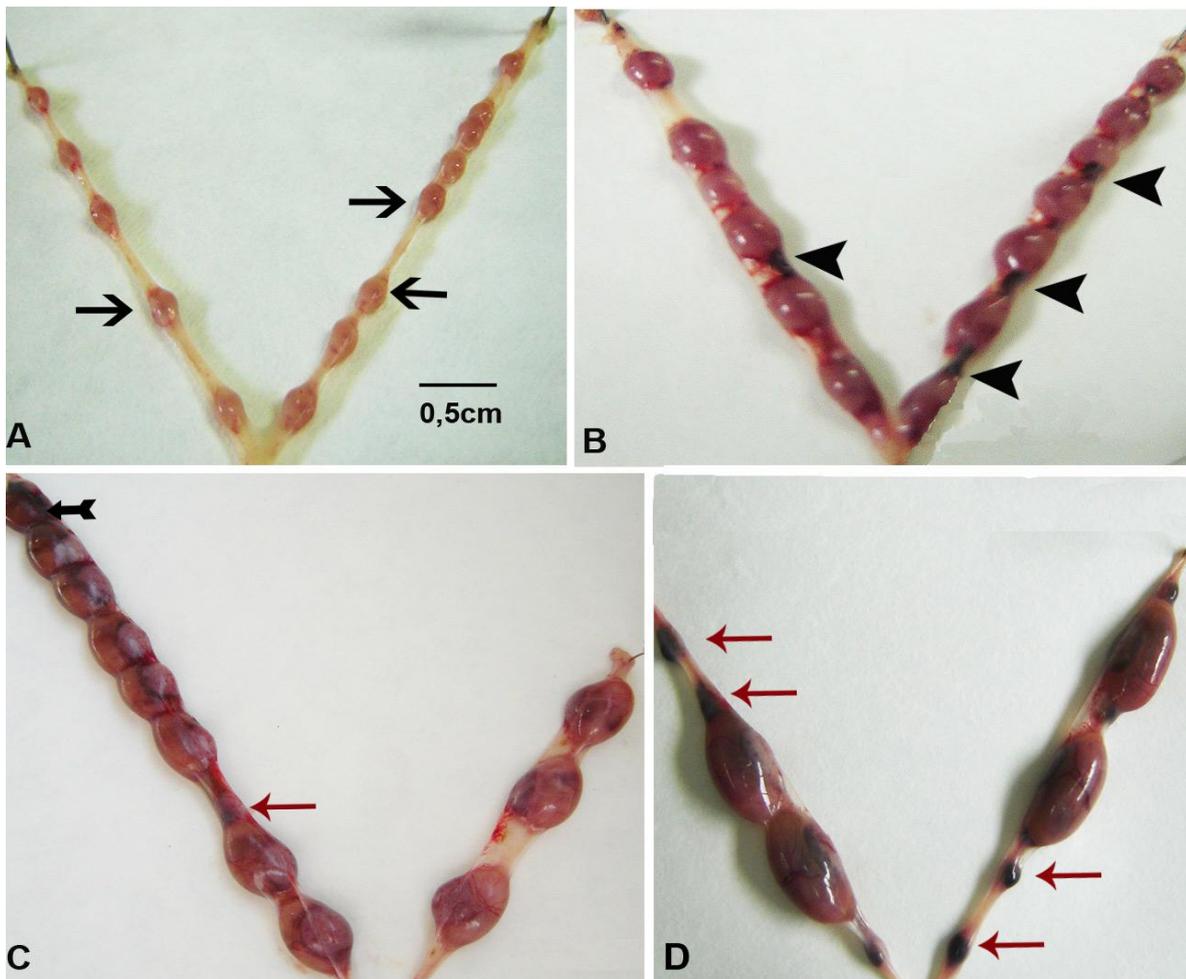


Figura 5- Fotografias de úteros de camundongos em diferentes períodos gestacionais tratados com extrato de *Cassia angustifolia* no período pré - implantacional. A- Útero gravídico de uma fêmea no 8º ddg, setas indicam sítios embrionários aparentemente sem alterações evidentes. B- Útero gravídico de uma fêmea no 11º ddg, onde observamos hemorragias entre os sítios (cabeças de setas). C- Útero gravídico de fêmea no 15ºddg, observamos hemorragias no interior dos sítios (flechas com cauda) e também reabsorções embrionárias (flechas vermelhas). D- Útero gravídico de animal sacrificado no 18º ddg, podemos visualizar reabsorções uterinas (flechas vermelhas). A barra representa 0,5 cm.

Fonte: Do Autor

### 5.2.2 Período implantacional

Nos animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *Cassia angustifolia* no período implantacional, do 4º ao 7º ddg, também observamos ovários sem alterações. No entanto, logo no 8º ddg já foi possível a visualização de focos hemorrágicos entre os SIEs (Fig. 6 A), o que não foi observado nos animais controles, e também nas fêmeas do grupo pré-implantacional (Gráf. 5 A) e estes focos aumentaram no 11ºddg (Fig. 6 B, Gráf. 5 B). Neste grupo foi as absorções começaram a ser evidentes logo no 11º ddg e, por conseguinte, o número de sítios aparentemente normais já parece

mais reduzido neste ddg (Fig. 6 B).

No 15º ddg foi possível identificar o surgimento de focos hemorrágicos no interior dos sítios concomitante a uma queda relevante do número de hemorragias entre os SIEs (Gráf. 5 C) apesar de não ser observado um aumento no número de reabsorções em relação ao 11º ddg com o mesmo tratamento ou em relação aos animais controles do 15º ddg (Fig. 6 C) e (Gráf. 5 C).

No 18º ddg as fêmeas tratadas no período implantacional apresentaram uma quantidade quatro vezes maior de ocorrências de reabsorções em relação ao controle, 11º ddg e 15º ddg. As hemorragias praticamente não foram visualizadas neste período, no entanto, ocorreu um decréscimo significativo quanto ao número de fetos aparentemente normais (Gráf. 5 D).

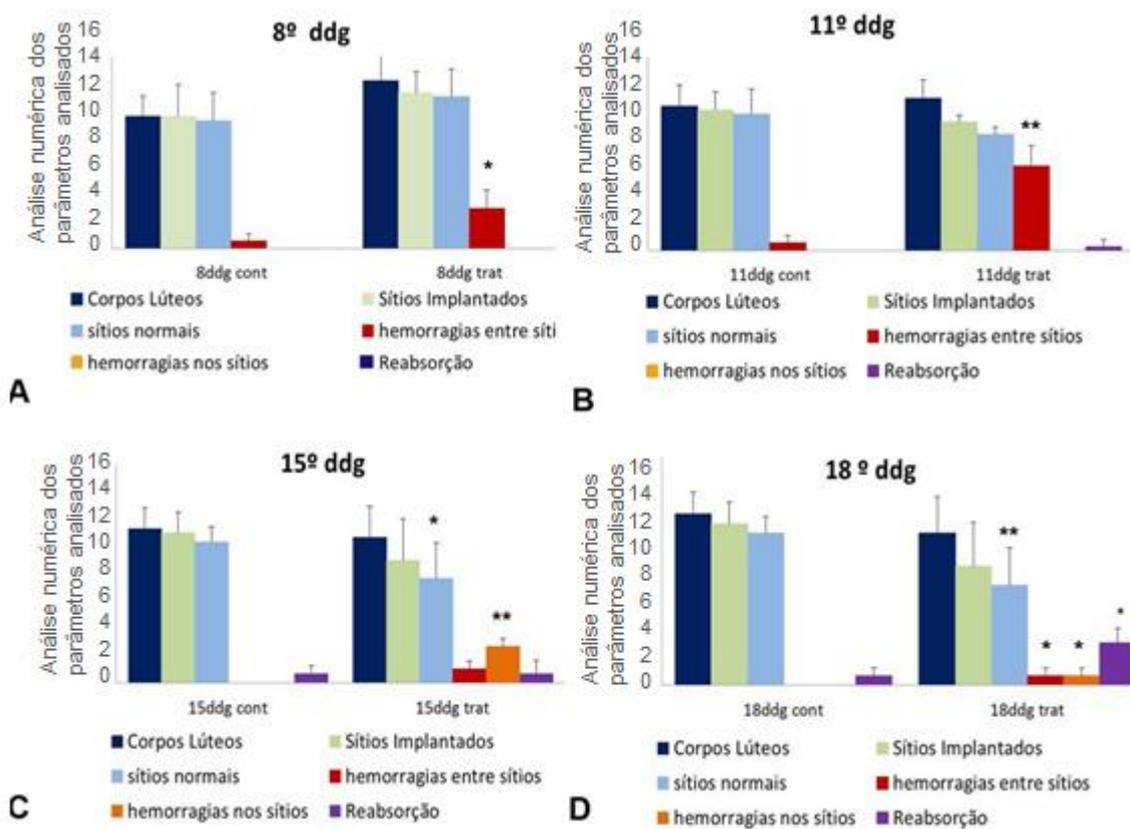


Gráfico 5 - Os gráficos demonstram as médias da quantidade numérica dos parâmetros analisados através da macroscópica morfológica. Animais controle e tratados com *Cassia angustifolia* no período implantacional (4º ao 7ºddg). A- Animais sacrificados no 8º ddg. B- Animais sacrificados no 11º ddg. C- Animais sacrificados no 15ºddg. D- Animais sacrificados no 18ºddg. Os valores foram expressos com a média  $\pm$  S.D (Desvio padrão). Diferenças entre animais controle e tratados foi utilizado two- way ANOVA, seguido do pós-teste de Scott- Knott, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados com o respectivo controle de cada parâmetro.

Fonte: Do Autor.

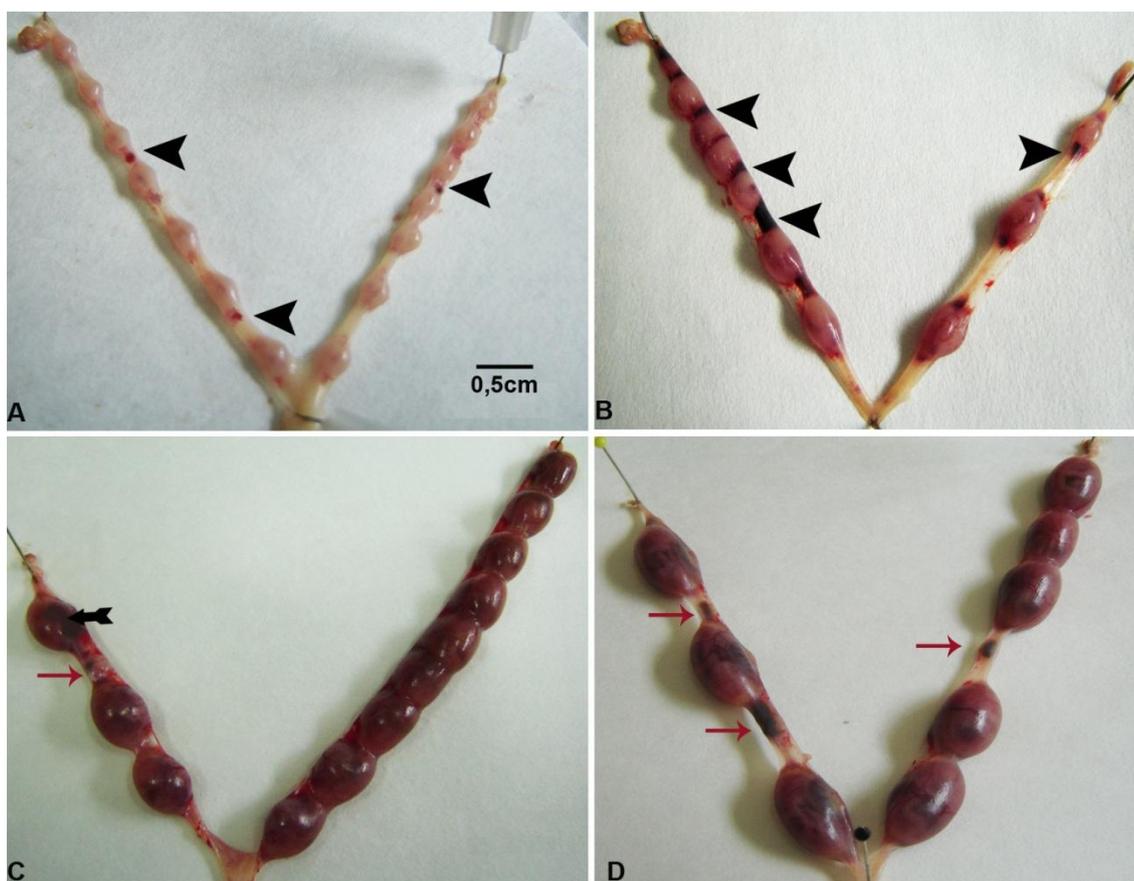


Figura 6 - Fotografias de úteros de camundongos em diferentes períodos gestacionais tratados com extrato de *Cassia angustifolia* no período implantacional. A- Útero gravídico de um animal sacrificado no 8ºddg, podemos observar focos hemorrágicos entre os sítios (cabeças de setas). B- Útero gravídico de animal sacrificado no 11º ddg, onde observamos hemorragias entre os sítios C- Útero gravídico de animal sacrificado no 15º ddg, onde observamos hemorragias no interior dos sítios(flechas pretas) e reabsorções embrionárias (setas vermelhas). D- Útero gravídico de animal sacrificado no 18º ddg, podemos visualizar reabsorções uterinas (setas vermelhas). A barra representa 0,5 cm.

Fonte: Do Autor

### 5.2.3 Período pós-implantacional

Neste período, como o tratamento das fêmeas foi realizado até o 10º ddg, os primeiros resultados que observamos foi relativo a fêmeas laparotomizadas no 11º ddg. Nestes animais, estavam presentes hemorragias entre os SIEs e no interior dos mesmos em quantidade bastante significativa se comparada com o mesmo dia experimental dos outros tratamentos e dos animais controle (Gráf. 6 A) e (Fig. 7 A).

Neste período de tratamento, os úteros prenhes observados no 15ºddg possuíam escassas áreas hemorrágicas, mas as reabsorções eram evidentes (Fig. 7 B). No 18º ddg, estas reabsorções chegam a ser evidentes em 35% dos fetos em desenvolvimento (Fig. 7 C) e eram menores na mesma proporção de sítios

embrionários normais.

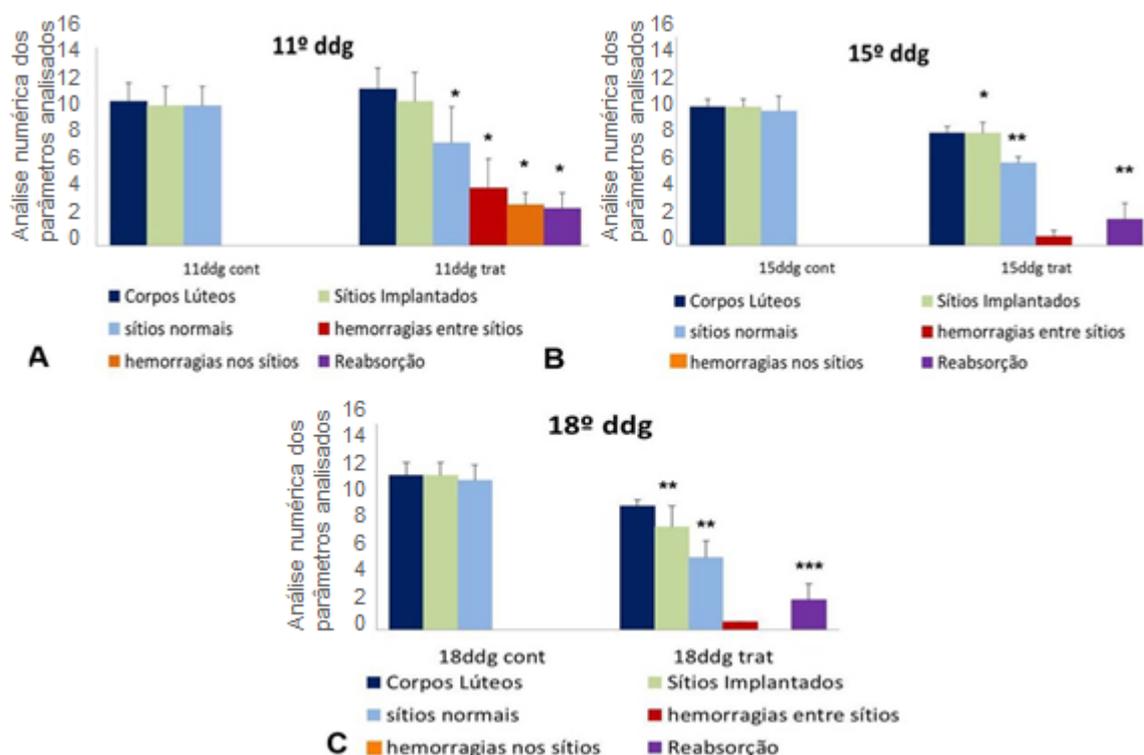


Gráfico 7 - Os gráficos demonstram as médias da quantidade numérica dos parâmetros analisados através da macroscópica morfológica. Animais controle e tratados com *Cassia angustifolia* no período pós implantacional (7º ao 10ºddg). A- Animais sacrificados no 11º ddi. B- Animais sacrificados no 15º ddi. C- Animais sacrificados no 18ºddi. Os valores foram expressos com a média  $\pm$  S.D (Desvio padrão). Diferenças entre animais controle e tratados foi utilizado two- way ANOVA, seguido do pós-teste de Scott- Knott, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados com o respectivo controle de cada parâmetro.

Fonte: Do Autor.

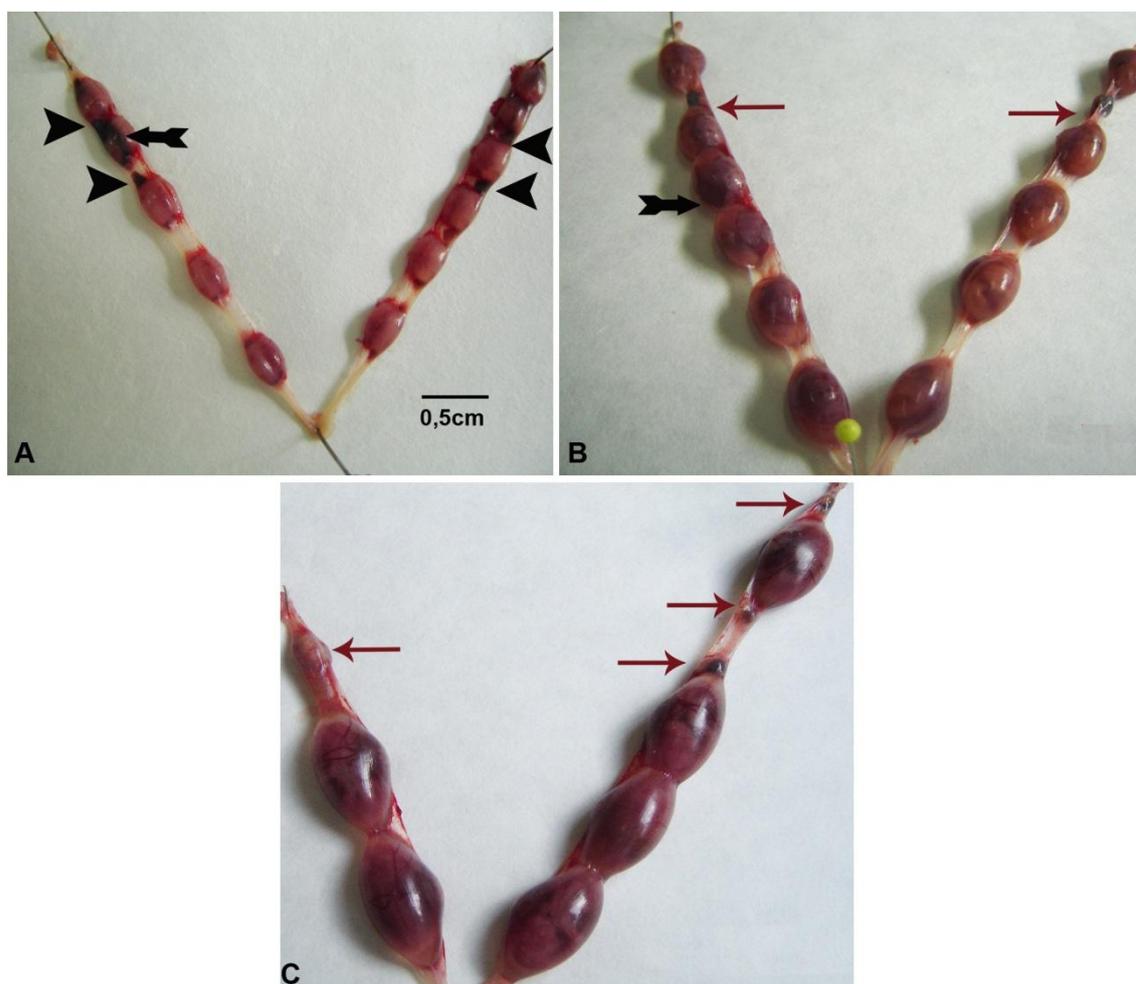


Figura 7 - Fotografias de úteros de camundongos em diferentes períodos gestacionais tratados com extrato de *Cassia angustifolia* no período pós - implantacional. A- Útero gravídico de um animal no 11ºddg, podemos observar focos hemorrágicos entre os sítios(cabeças de setas) e hemorragias no sítio(flecha preta). B- Útero gravídico de animal no 15º ddg, onde observamos reabsorção embrionária (Flechas vermelhas) e hemorragias no sítio (flecha preta). C- Útero gravídico de animal no 18º ddg, onde observamos um maior número de reabsorções embrionárias (Flechas vermelhas). A barra representa 0,5 cm.

Fonte: Do Autor

### 5.3 Taxa de implantação, viabilidade gestacional e perda embrionária

A taxa implantação (TI), a viabilidade gestacional (VG) e a perda embrionária (PE) dos animais foram calculadas, de acordo com o item 4.5 deste mesmo trabalho. Uma pequena perda embrionária pode ser normal nas fases iniciais da gestação de camundongos (DAMASSENIO et al., 2002) e esta perda pôde ser observada em nosso trabalho nos grupos tratados no período de pré e pós-implantação mas não a consideramos importante. No entanto, podemos observar que houve um efeito importante na taxa de implantação no período de tratamento do 4º ao 7º ddg, onde

observamos uma TI de 83,68% justamente no período de implantação no qual as células trofoblásticas estão em franca atividade sendo responsáveis pela adesão e invasão do endométrio materno pra implantação do concepto (Gráf. 7).

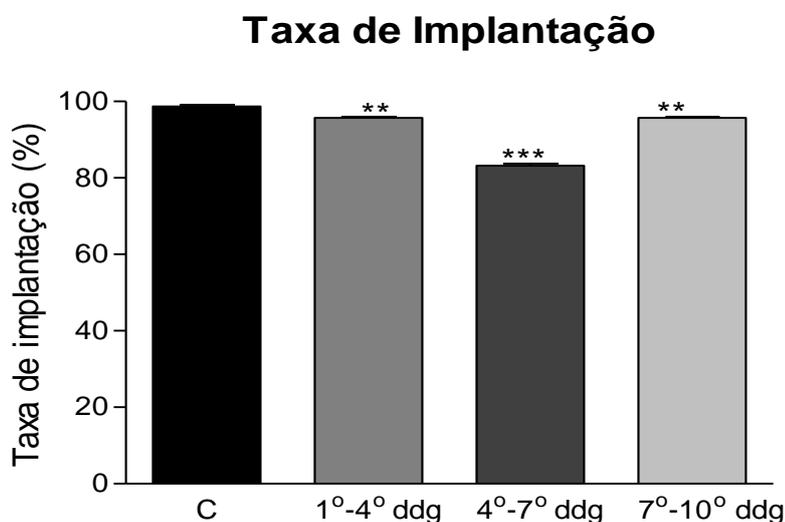


Gráfico 7 – Análise da porcentagem da taxa de implantação. Os valores foram expressos com a média  $\pm$  S.E.M. para 3 animais. Os símbolos representam níveis de significância, onde foi utilizado one-way ANOVA com pós-teste Bonferroni's \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados com o grupo controle. (C) Controles e (1º-4º) período pré implantacional; (4º-7º) período implnatacional e (7º-10º) pós implantacional.

Fonte: Do Autor.

O tratamento com o extrato realizado durante o período de pré-implantação embrionária (1º - 4ºddg) causou uma diminuição significativa na viabilidade gestacional em relação ao controle do 8º ao 18ºddg, concomitantemente houve um aumento crescente da perda embrionária nesses animais já analisados no 8ºddg e sendo mais significativo no 18ºddg (Gráf. 8 A). Quando analisados a Viabilidade gestacional e perda embrionária dos animais tratados no período de implantação embrionária observamos que houve pequena diferença significativa em relação à viabilidade gestacional nas fêmeas sacrificadas no 8ºddg, porém nas fêmeas sacrificadas no 11º, 15º e 18º ddg encontramos maiores diferenças significativas quanto à viabilidade (Gráf. 8 B). Já em relação às perdas embrionárias encontramos um aumento significativo nos animais sacrificados no 11ºddg até o 18ºddg. Nas fêmeas submetidas ao tratamento com extrato de sene, durante o período pós-implantacional ocorreu uma queda significativa da viabilidade gestacional, assim como uma grande perda embrionária. No 15º e 18ºddg encontramos também uma diminuição decrescente da viabilidade gestacional, e um aumento significativo da

perda embrionária. (Gráf. 8 C).

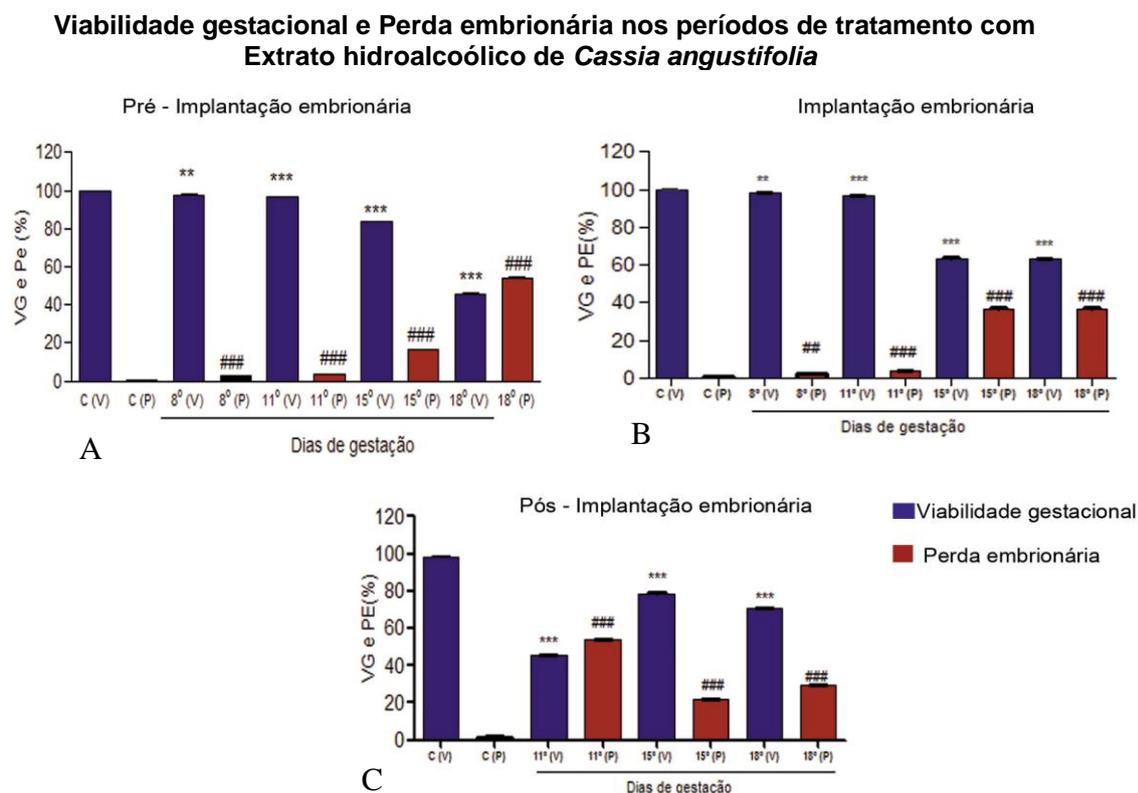


Gráfico 8 - O gráfico demonstra, em porcentagem a viabilidade gestacional e perda embrionária dos grupos tratados com extrato de *Cassia angustifolia*. A- Período de pré - implantação embrionária (1<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup>ddg). B- Período de Implantação embrionária (4<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup>ddg) e C- Período de pós - implantação embrionária (7<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup>ddg). Os valores foram expressos com a média  $\pm$  S.E.M. Os símbolos representam níveis de significância, onde foi utilizado one-way ANOVA com pós teste Bonferroni's \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , para viabilidade gestacional e #  $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  quando comparados com o grupo controle.

Fonte: Do Autor.

Segundo Souza e Lima (2009), em mamíferos, o período considerado de pré-implantação deve compreender o intervalo entre a fecundação do oócito e a implantação do conceito. Este período é caracterizado por clivagens sucessivas do zigoto até os estádios embrionários iniciais, pela ativação da transcrição embrionária e eventos morfogenéticos de compactação e cavitação que culminam com a formação do blastocisto (MORIS et al., 2012).

Dentro deste contexto, de acordo com os resultados observados no grupo tratado durante as fases iniciais da prenhez, podemos afirmar que o extrato de sene aparentemente não interfere nos períodos iniciais de desenvolvimento de camundongo. Nestes animais não foram observados efeitos no índice de implantação embrionária (Gráf. 8) que se manteve. O extrato de *Ruta graveolens* interfere diretamente na implantação embrionária quando a fêmea é tratada no mesmo período

de gestação (Longato et al., 2012 – submitted). Segundo, Guitierrez-Pajamares e colaboradores (2003), os blastocistos tratados com extrato hidroalcolico de arruda apresentam alterações morfológicas importantes e atraso de desenvolvimento e estas alterações são atribuídas ao efeito da grande concentração de alcaloides neste extrato. O extrato de sene por sua vez não contem alcaloides (CAVALIERI et al., 2010) dentre os seus constituintes o que vem a ser condizente também com este trabalho.

Os achados morfológicos das fêmeas em diferentes dias gestacionais e tratados no período de implantação embrionária ressaltam a importância dessa fase de desenvolvimento no decorrer dos eventos embriológicos. Nesta etapa as CTGs que envolvem o blastocisto de camundongo estão adentrando ao tecido materno, abrindo vasos sanguíneos e espaço físico para o desenvolvimento embrionário viabilizando o processo de implantação. No entanto, para que esta implantação tenha sucesso, é necessário que ocorra um sincronismo perfeito de desenvolvimento entre a as células trofoblásticas do blastocisto e o endométrio materno visando o reconhecimento específico entre os dois organismos (CHÁVEZ; ANDERSON, 1985). Este período de complexas interações entre mãe e concepto que possibilita a implantação embrionária é denominado de janela de implantação (YAMADA, 1993). Logo que o blastocisto implanta no endométrio as células trofoblásticas da região mesometrial formam uma e crescem denominada cone ectoplacentários (CEP) (COOP, 1979). O CEP é precursor de todas as populações celulares de origem trofoblastica que se organizam para formar a placenta (MUNTENER; HSU, 1976; BULMER, 1995).

Interferências produzidas por um medicamento, ou compostos químicos que possam vir alterar minimamente estas interações iniciais entre a mãe e o concepto podem acarretar um insucesso gestacional por embriofetalidade ou alterações provocadas no endométrio materno (FRÍAS, 2008). Analisado os dados apresentados no grupo tratado com extrato de sene durante o período de implantação embrionária, observamos um efeito importante deste extrato na taxa de implantação ocasionando uma queda de 16, 32% (Gráf. 7). Desta maneira podemos sugerir que algum composto presente no sene esteja interferindo diretamente no endométrio materno, pois como já observamos se o tratamento ocorrer antes do período de implantação não altera este processo.

O período de tratamento de 7<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> ddg coincide com o período de organogênese, onde os embriões estão mais suscetíveis à teratogênese (GILBERT;

2003; COSTA et al., 2005). Apesar de muitas vezes o efeito teratogênico ser atribuído a fatores genéticos, atualmente temos conhecimento que a maior causa destas alterações morfofisiológicas é acarretada pela utilização de drogas medicamentosas e demais fatores químicos ou ambientais (JOHNS et al., 2006). Os efeitos desencadeados podem ser pontuais, de acordo com a diferenciação ou determinismo funcional de cada população celular ou mais generalizado (CHERNOFF et al., 1989). Desta maneira, muitas vezes observamos que a resposta teratogênica pode ser determinada pelo período de desenvolvimento no qual ocorre a exposição, bem como a toxicidade inerente ao agente (ROMAM, 2011). Por exemplo, ácido acetil salicílico em ratas prenhes só é capaz de produzir fenda palatina se o conceito for exposto a este medicamento entre o 10<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> ddg, período este em que se forma o palato (DAMASCENO et al., 2002). Portanto, quanto maior for o período crítico de um determinado sistema, mais suscetível este, será aos efeitos de um determinado agente químico.

Aparentemente o extrato de *Cassia angustifolia*, na concentração de 200mg/kg do animal, não manifestou efeito teratogênico importante, pois os fetos analisados no 15<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> ddg não apresentaram alterações morfológicas evidentes. No entanto, não foi realizada nenhuma análise específica para nenhum sistema.

Os gráficos 9 A, B e C, nos mostram comparativamente o conjunto de alterações dos grupos tratados onde podemos observar que existe uma ordem cronológica nas alterações morfológicas no útero gravídico de camundongos. Primeiro observamos hemorragia entre os sítios de implantação, estas aparentemente invadem o sítio e acabam acarretando por consequência um processo reabsortivo. Estes dados conferem com a cinética de eventos descrita por Longato e colaboradores (2012-submitted) em fêmeas de camundongos tratadas com extrato hidroalcolólico de arruda.

As hemorragias presentes nos animais tratados presentes tanto nas regiões entre os SIEs como no interior destes, decorrentes do tratamento com o extrato hidroalcolólico de *Cassia angustifolia*, acreditamos que possam ter ocorrido principalmente pela ação da substância antraquinona. As antraquinonas, família a qual pertence o grupo dos senossídeos, estão presentes em grande quantidade no extrato de sene (SHIA et al., 2011). Trabalho recente tem atribuído a esta família a capacidade de induzir contrações uterinas, aumentar o fluxo sanguíneo para a região do útero ampliando o risco de perda do feto, bem como podem também passar para o leite materno e causar efeitos indesejáveis, como espasmos, no bebê (SHULTZ et al.,

2002).

Além disso, os compostos antraquinóides podem causar diminuição da produção de ATP por desacoplamento mitocondrial (interrupção da fosforilação oxidativa) como relatado por Barbosa–Ferreira (2005). Os senossídeos (A-F) são diantronas que segundo Cavalleri (1997), pode agir prejudicialmente na fosfolirilação oxidativa interferindo no consumo de oxigênio placentario, uma vez que a maior parte do oxigenio consumido pela placenta é formada por esta via (CARTER, 2000). Desta maneira, segundo Barbosa – Fereira (2011), a reabsorção embrionária pode ser causada inicialmente devido à toxicidade molecular das diantronas que atravessam a placenta devido ao seu baixo peso molecular. Estas moléculas não apenas causam alterações no metabolismo oxidativo placentario como também podem atingir diretamente as células fetais levando a morte (HARAGUCHI et al., 1998).

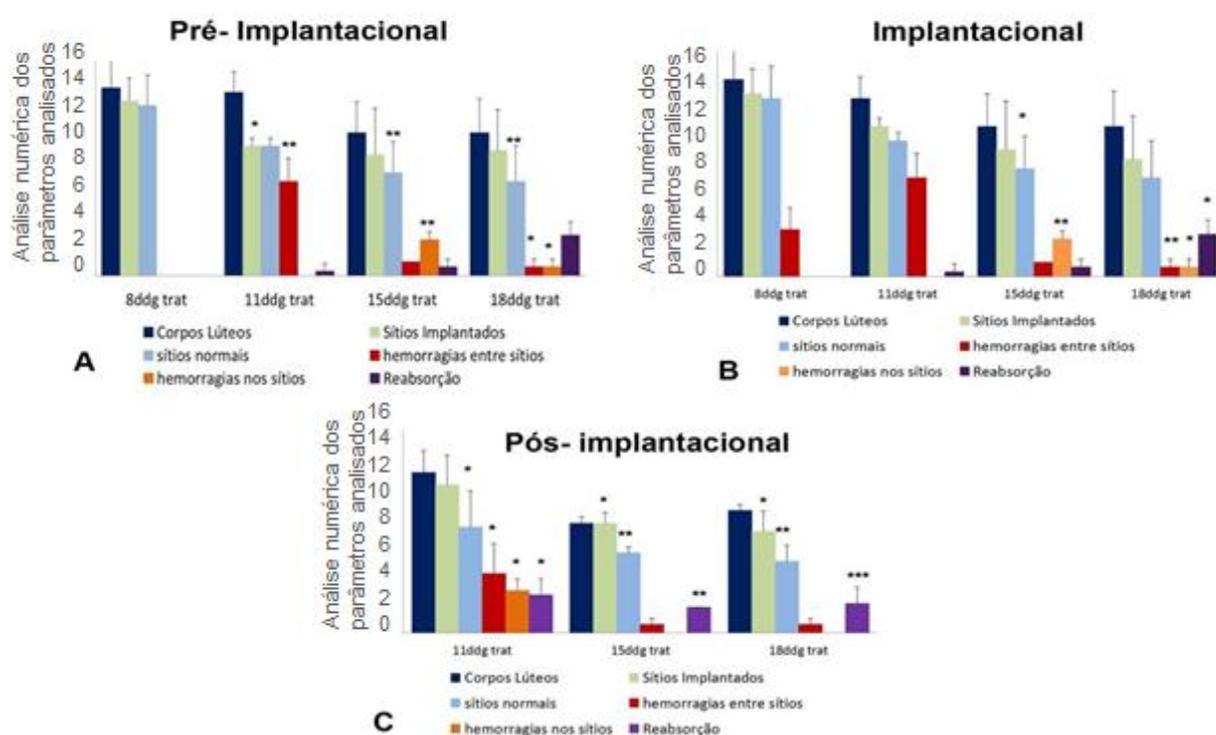


Gráfico 9- O gráfico representa os parâmetros de alterações em todos os grupos de tratamento. A- Período de Pré- implantação embrionária. B- Período de implantação embrionária. C- Período de Pós- implantação embrionária. Os valores foram expressos com a média  $\pm$  S.D (Desvio padrão). Foi realizado o teste two- way ANOVA, seguido do pós-teste de Scott-Knott, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados com o respectivo controle de cada parâmetro.

Fonte: Do Autor.

Os estudos farmacocinéticos recentes, por exemplo, Chiang e colaboradores

(2011), verificaram que a molécula de diantrona podem inuzir a apoptose através duas vias diferentes levando, por exemplo, às células tumorais gastrointestinais a morte. A primeira via ocorre através da caspase 8 e a outra através da geração de (EROs). Esses efeitos da sinalização intracelular da molécula de diantrona, esta detalhado na revisão da literatura do respectivo trabalho. Acreditamos desse modo que um mecanismo semelhante possa estar sendo ocasionado nas células placentárias e/ou do embrião de camundongos tratados com extrato hidoralcóico de *Cassia angustifolia*.

Diante da relevância da viabilidade gestacional dos embriões para o alcance de uma elevada fertilidade ao parto, o presente trabalho buscou abordar alguns possíveis fatores que regulam o desenvolvimento embrionário no período de pré-implantação, incluindo as mudanças morfofisiológicas do embrião, os efeitos da nutrição histotrófica e o metabolismo embrionário. Dessa maneira são considerados de extrema importância esses parâmetros para analisar os possíveis efeitos do extrato hidroalcóico de *Cassia angustifolia* na gestação. Segundo alguns trabalhos, por exemplo, Boareto (2007) a PE e a VG foi determinada em ratas submetidas ao tratamento com extrato de *Artemisia annua L.*, onde verificou uma relação com o uso do extrato e a prole. Portanto, nossos resultados salientam que esse aumento da perda embrionária, principalmente nos animais sacrificados no 15º ddg e 18º ddg, está possivelmente relacionado uma ação dos compostos existentes no extrato de *Cassia angustifolia*.

Através dessa análise de viabilidade e perda embrionária no período pós – implantacional, assim como nos períodos anteriores, o embrião pode continuar seu desenvolvimento normal, desenvolver-se anormalmente ou morrer. Segundo nossos achados, os valores mais significativos foram no período pós – implantacional, corroborando com os achados morfológicos onde o número de reabsorções também foi elevado nessas fêmeas. A proporção de reabsorções correlaciona o número de reabsorções observadas e o número de implantes viáveis (os que contêm um feto vivo) - quanto maior a proporção de reabsorções maior, evidentemente, o número de fetos cujo desenvolvimento foi interrompido (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2002).

Os resultados desse período aqui descritos corroboram as análises macroscópicas desse mesmo período. Visto que, uma vez já se iniciado o processo de hemorragia no interior dos sítios e posteriormente evoluindo pra reabsorções embrionárias, esse mesmo sítio é calculado como um sítio anormal ou inviável. Outro fator importante segundo Almeida e colaboradores (2000), uma falha no período de

implantação pode estar relacionada à exposição materna a agentes químicos, interferindo por diversos mecanismos. Estes incluem alterações morfológicas no embrião que interferem com a implantação ou promovendo a embriofetividade, modificações a níveis hormonais, interferindo assim com a implantação do embrião e por final alteração das condições uterinas necessárias para a nidificação (CUMMINGS, 1990).

Existem também, outras variáveis podem ser indicativas de efeitos adversos mais sutis, como por exemplo, perda de massa corporal da fêmea durante o tratamento, massa dos órgãos e sinais clínicos de toxicidade da prenhez (diarreia, piloereção, sangramento, variações no comportamento, etc.) (VIGNATI et al., 2004). Portanto é sabido que um agente químico pode interferir no desenvolvimento dos embriões diretamente, ou indiretamente, ao comprometer a capacidade da progenitora em sustentar a prole (EPA, 1996).

## **5.4 Análise Histológica**

### **5.4.1 Análise Histológica dos sítios de implantação embrionária**

Tanto os ovários como o útero de animais gestantes prenhes do grupo controle e do grupo tratado foram analisados histologicamente. Nos ovários não encontramos nenhuma alteração histológica evidente. Todos os ovários possuíam uma camada cortical constituída por um estroma ovariano contendo células intersticiais e tecido conjuntivo frouxo. Entre estas células foram evidenciados muitos folículos ovarianos em diferentes períodos de desenvolvimento sem nenhuma alteração em sua normalidade (Fig. 8 A). Além dos folículos ovarianos eram facilmente visualizados alguns conjuntos celulares de limite relativamente regular composto por células globosas mais basófilas com citoplasma proeminente. Estas estruturas aos corpos Lúteos (Fig. 8 A e B) e as mesmas não apresentavam diferença ente os animais tratados e controle o que nos leva a supor que aparentemente não houve alteração no desenvolvimento dos folículos.

A análise histológica dos SIEs de 8<sup>o</sup>ddg em desenvolvimento nos permitiu observar na região mesometrial vasos sanguíneos dilatados delineando por

trabéculas decíduais e o embrião de camundongo era facilmente visualizado na região antimesometrial com o seu CEP voltado para a região do mesometrio (Fig. 8 C). Quando observados em maior detalhe podemos constatar a presença das CTG em íntimo contato com o tecido materno delineando uma área contendo lacunas de sangue em torno do embrião.

Os SIEs de 11<sup>o</sup> dpg apresentavam um tamanho maior e nos seus cortes histológicos encontrávamos com facilidade o embrião circundado pela vesícula amniótica (Fig 8D). A placenta pode ser visualizada e apresenta suas camadas em formação. O labirintotrofoblasto já ocupa quase metade da área placentária e as células do espongiotrofoblasto estão distribuídas ao seu redor. Entre os tecidos maternos e fetais observamos as CTGs que são encontradas delimitando a porção fetal da placenta e em torno de todo o perímetro embrionário (Fig. 8D). Estas CTGs tem um acúmulo significativo na borda placentária onde podemos observar seus prolongamentos irregulares formando uma trama contendo sangue materno (Fig. 8 D e E). Este aspecto é apresentado nesta região e em toda a região abembrionária onde podemos observar intensa atividade fagocitária por estas células, pois o seu citoplasma apresenta uma grande quantidade de vacúolos contendo restos celulares e hemácias (Fig. 8 E). Esta descrição é perfeitamente condizente com os trabalhos (PELL; BULMER, 1976; KANAI AZUMA, et al., 1994; AMARANTE 1997 BEVILACQUA, et al., 2010; AMARANTE-PAFFARO et al. 2011). No 15<sup>o</sup>dpg analisamos separadamente a placenta e os embriões de camundongos. A placenta possuía uma aparência discoidal e apresentava todas as camadas já formadas, sendo que o labirinto trofoblasto ocupava a maior extensão placentária. As CTGs eram encontradas perfazendo o perímetro placentário, mas agora um tanto mais alongadas devido ao grande crescimento placentário (Fig 8E). A descrição morfológica da placenta de camundongo pode ser encontrada nos trabalhos e AMARANTE, 1997 E KANAI AZUMA, et al., 1994.

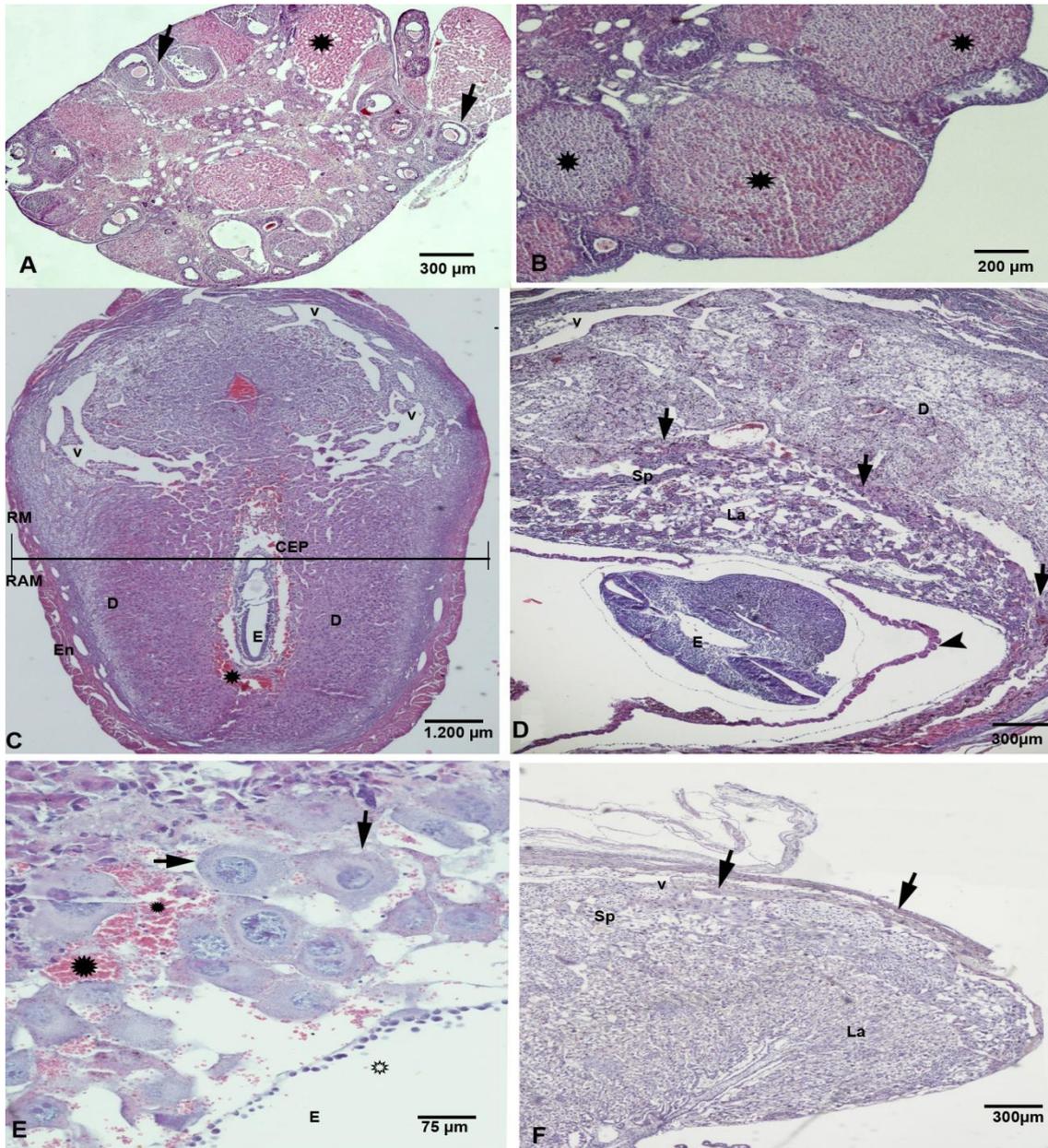


Figura 8 - A-B - Fotomicrografia mostrando detalhes de ovário de fêmeas controles contendo Corpos Lúteos (asteriscos), foliculos ovarianos em desenvolvimento (setas) C- Sítios de implantação 8<sup>o</sup> ddg, aumento de 10x. C- Sítio de implantação de um animal controle no 8<sup>o</sup> ddg, podemos observar o embrião (E) implantado na região anti- mesometrial(RAM), circundado por células sanguíneas (asterisco), o cone Ectoplacentário (CEP) já na região Mesometrial(RM), comum acúmulo de vasos sanguíneos delimitando a trabéculas(V) e a presença da decídua(D), aumento de 4x. D- SIE no 11<sup>o</sup> ddg visualizamos o embrião (E), envolto a uma membrana amniótica(cabeça de seta) e a presença da placenta constituída de Espongiotrofoblasto(Sp) e labirintotrofoblasto (La) e Células trofoblásticas gigantes(CTGs) envolta da placenta(setas), aumento 10x. E- Perímetro embrionário de um animal controle, onde observamos células sanguíneas maternas (asteriscos) não entram em contato com eritrócitos fetais (asteriscos sem preenchimento), CTGs contendo restos de hemácias (setas), aumento de 40x. F- Placenta no 18<sup>o</sup>ddg, onde observamos CTGs (setas), (Sp) e (La), aumento de 4x. Ambos os cortes corados com H.E

Fonte: do Autor.

Os animais submetidos ao tratamento com o extrato de *Cassia angustifolia*, nos

períodos gestacionais de pré-implantacional e de implantação, mesmo não tendo demonstrado alteração aparente na análise macroscópica, em alguns casos, na micróscopia de luz, podemos observar hiperemia e um acúmulo de sangue maior nas regiões em torno do embrião se comparada aos animais controle (Fig. 9 A). As CTGs nesta área costumam abrir vasos sanguíneos e com seus prolongamentos delimitar uma micro circulação em torno do embrião (MUNTENER; HSU, 1997; BEVILACQUA et al., 1991; KANAI-AZUMA et al., 1994; GEORGIADES et al., 2002), mas este processo precisa ser muito bem controlado (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1989; BEVILACQUA et al., 2010). Em nossas lâminas os SIEs de 8<sup>o</sup>ddg após tratamento com sene aparentemente fogem um pouco da normalidade o que pode ser acarretado, talvez, por um efeito do sene nos vasos sanguíneos que podem acabar acarretam quadros hemorrágicos uma vez que a invasividade das CTGs nesta região não parece aumentada. De acordo com Morales e colaboradores (2009) a antraquinona, presente no extrato hidroalcolico de *Cassia agustifolia*, pode induzir mudanças nas células epiteliais e aumentar a contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, podendo ocasionar hemorragias e/ou sangramentos. Corroborando com este trabalho podemos acrescentar o fato de que em algumas lâminas de reabsorção embrionária podemos observar flagrantes de edemas do tipo exudato refletindo provavelmente algum problema na angiogênese (Fig.9 B).

As hemorragias encontradas entre os SIEs de implantação normalmente mostravam hemácias livres na luz uterina que aparentemente extravasavam para o interior do SIE formando grandes lacunas contendo hemorragia recente e/ou tardia (Fig 9 C). Estas hemorragias inicialmente eram encontradas em regiões laterais a placenta ou ao embrião em desenvolvimento, no entanto, fora do saco amniótico (Fig 9 C).

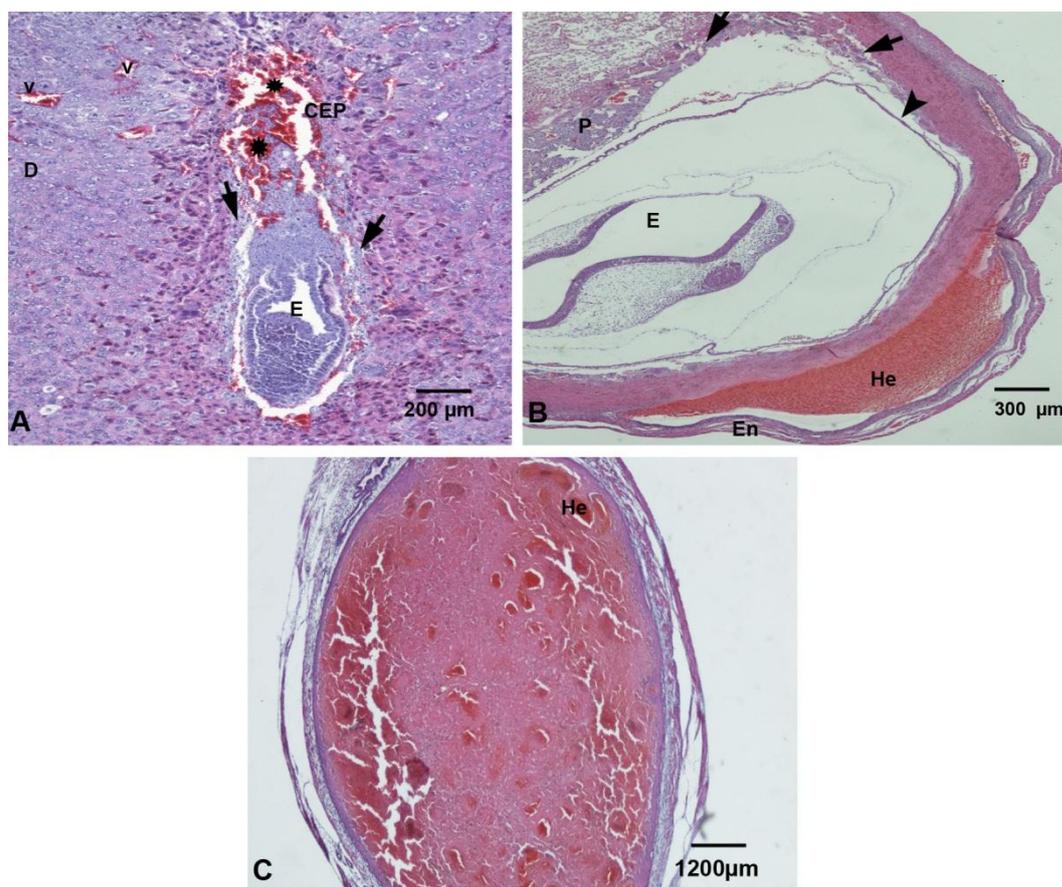


Figura 9- A- corte histológico de SIE no 8ºddg, em destaque embrião (E), cone ectoplacentário (CEP), células sanguíneas em locais inapropriados (asteriscos), circundado por células trofoblásticas gigantes (CTGs)(setas), aumento 40x. B- Corte histológico de SIE no 11ºddg, em destaque grande área de hemorragia recente (He) na região lateral ao embrião (E), circundado por locais inapropriados (asteriscos), também circundado por CTGs (setas) e a presença de membrana amniótica (cabeça de seta), aumento 20x. C- Corte histológico de animal tratado no período implantacional, em destaque extensa área hemorrágica recente (He), ocupando todo o local do embrião.

Fonte: Do Autor.

Alguns sítios de implantação apresentavam grandes áreas hemorrágicas isoladas. Nestas áreas nos chamou a atenção a grande quantidade de prolongamentos citoplasmáticos de CTGs entremeados ao tecido sanguíneo (Fig 10 A-B). O extenso prolongamento citoplasmático emitido pelas CTGs parece envolver toda a área hemorrágica o que por sua vez acarretar em alguns sítios uma compressão do embrião (Fig. 10 A). As áreas hemorrágicas extensas como demonstradas na imagem fotográfica podem promover transtornos vasculares locais que tendem a hipóxia, desencadeando um processo de morte celular por déficit nutricional (YOSHINORI et al., 2003; ELMORE, 2007).

As CTGs observadas demonstram intensa atividade eritrofagocitária, o que é uma característica intrínseca destas células (ALBIERI et al., 1995; GULERIA ; POLLARD, 2000; SASMONO et al., 2003; AMARANTE-PAFFARO et al. 2004,

ALBIERI et al., 2005; BEVILACQUA, et al., 2009 (Fig 10 C). As CTGs se dispunham em regiões de extravasamento sanguíneo, tanto na área placentária como nas regiões dos SIEs onde deveriam estar o embrião em desenvolvimento (Fig 10 C). Estudos recentes demonstraram resultados semelhantes a este em suas descrições histológicas de reabsorções embrionárias de roedores em diversos tipos de tratamentos, por exemplo, Passey e colaboradores (2012) verificaram reabsorções uterinas em animais deficientes na proteína  $A_2\alpha$ , uma enzima importante na síntese de prostaglandinas, aumentando as reabsorções. Já Shima e colaboradores (2010) verificaram o papel fagocitário das células trofoblásticas gigantes e também o papel das células T regulatórias no desenvolvimento anormal da gestação de roedores, deficientes geneticamente para células T regulatórias.

Muitos SIEs tratados em processo de reabsorção mostravam em seu interior uma completa desorganização tecidual onde as estruturas presentes muitas vezes não eram reconhecidas. Desta maneira não conseguíamos identificar o que provinha de restos celulares fetais (Fig. 10 D). Nestes sítios esta massa em completa desorganização estrutural aparecia estremada a processos hemorrágicos intensos, áreas de edema contendo deposição de proteínas plasmática e infiltrada linfocitária (Fig. 10 D-E). Nestas áreas a invasão de CTGs era evidente e provavelmente pode estar associada a remodelação e o “turn over” tecidual. Descrições semelhantes já foram realizadas em SIEs de camundongos atribuindo as CTGs importante função de invasividade de fagocitose (PLAKS, et al., 2008).

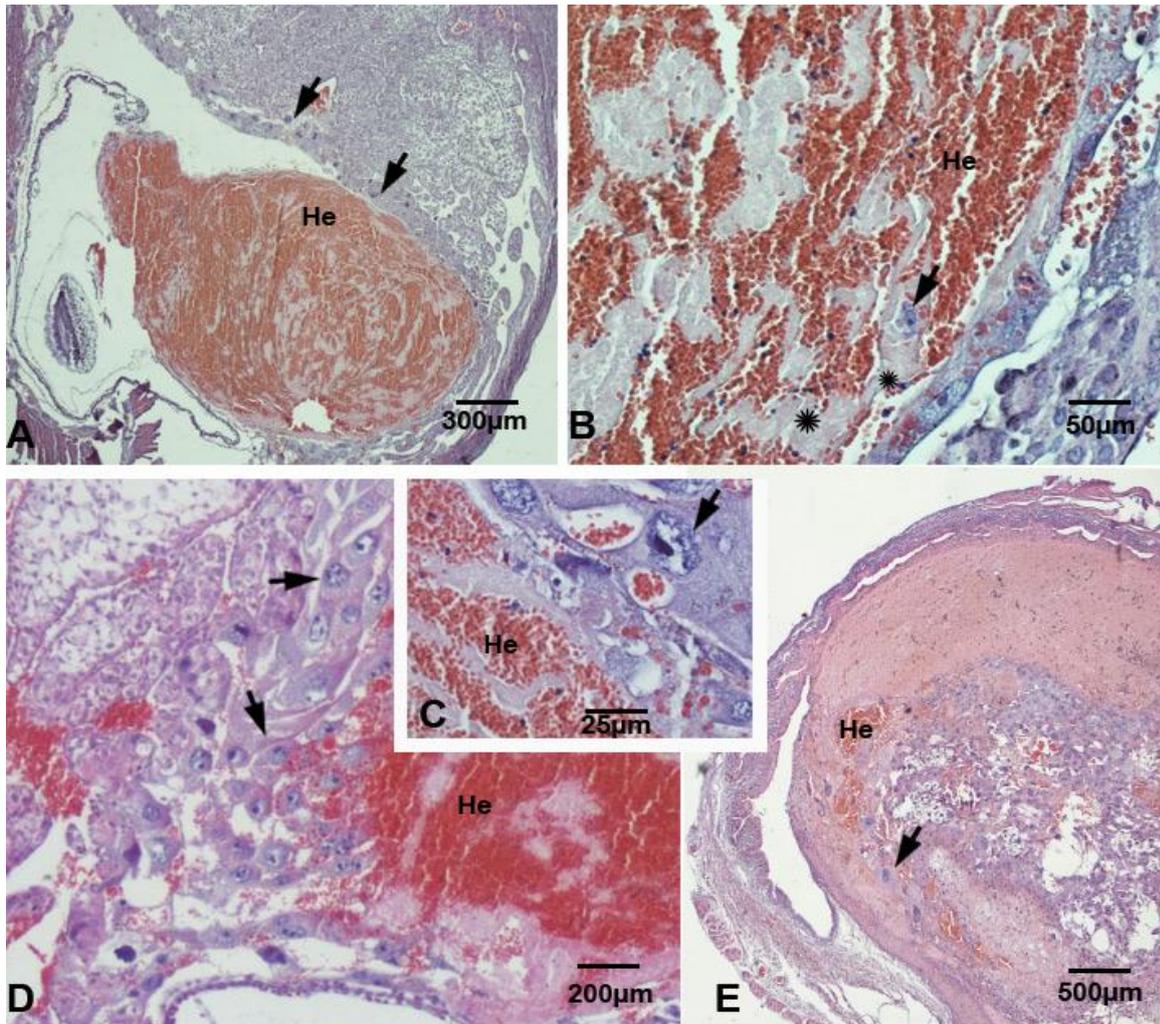


Figura 10- A- Corte de SIE no 11ºddg, onde em destaque região de hemorragia recente(He), CTGs(setas) emitindo prolongamentos citoplasmáticos, aumento de 40x. B- Corte de SIE no 11ºddg, em destaque células trofoblásticas gigantes (CTGs) emitindo prolongamento citoplasmático (asterisco), envolto a uma extensa área hemorrágica (He), aumento 20x. C- Corte de SIE no 15ºddg, em destaque atividade fagocitária das CTGs, aumento 40x. D- Corte de SIE no 15ºddg, em destaque desorganização decidual e a presença de CTG em meio ao processo hemorrágico, aumento 20x. E- Corte de SIE no 15ºddg, em destaque reabsorção uterina e a atividade das CTGs, aumento 20x. Ambos os cortes corados por H. E.

Fonte: Do autor.

Segundo, Barbosa - Ferreira (2008) animais tratados com compostos antracênicos, apresentaram alterações histopatológicas características de um edema intersticial, tumefação, acúmulo de células inflamatórias e tecidas em necrose. Esse aspecto necrótico foi também evidenciado em nossos cortes de SIES e de reabsorção embrionária, assumindo características de perda da arquitetura geral da decídua, acúmulo de material fibrinóide amorfo, células que apresentaram núcleo picnótico sendo alguns desses núcleos picnóticos fragmentados, denominados carriorréxis e a presença de áreas de calcificação (Fig 11 A e C), o que confere com as descrições de um processo necrótico característico (CASTRO et al., 2000; PEREIRA et al., 2005).

Muitos sítios demonstram áreas com grande quantidade de infiltrado linfocitário, células em degeneração com núcleos picnóticos e edema (Fig. 11 B). Este conjunto de alterações evidenciadas pode ser considerado como sinais de uma resposta inflamatória aguda, (MALE et al., 2006). Em outros SIE em intensa atividade de reabsorção embrionária foi possível observar grandes áreas hemorrágicas, recentes e tardias tomando toda a área interna sendo, muitas vezes, permeadas a restos celulares contendo núcleos picnóticos característico de um processo de morte celular semelhante a necrose e/ou apoptose (Fig 11 C).

Desta maneira, se considerarmos o processo de reabsorção embrionária semelhante a um processo inflamatório agudo, podemos supor que citocinas inflamatórias estejam presentes em alta concentração nesta região. Citocinas, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , LIF (*leukemia inhibitory factor*) e IFN- $\gamma$  que são produzidas no local de inflamação e desempenham papel crucial na resposta de fase aguda podem estar envolvidas com o processo de reabsorção (SHIMA et al., 2010; MALIK et al., 2009; PLEVYAK et al., 2002) observado neste trabalho. No entanto, experimentos complementares visando medir o índice sérico destas citocinas ou a expressão das mesmas neste sistema ainda não foram realizados.

O mecanismo de ação dos derivados antraquinônicos, sobre células decíduais, CTGs e demais células da interface materno fetal não está completamente esclarecido, porém alguns trabalhos descrevem uma possível ação tóxica de *Sena occidentalis*, constituída também por derivados antracênicos, na alimentação de ruminantes, verificou atrofia de fibras musculares, com alargamento da mitocôndria, armazenamento de lipídeos e moderada quantidade de fibras oxidase negativas, sugerindo uma ação tóxica baseada no desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocontrial, atingindo assim o metabolismo dessa organela, desencadeando uma cascata de apoptose (descrito anteriormente), levando a morte celular e tecidual (BARBOSA -FERREIRA et al., 2011).

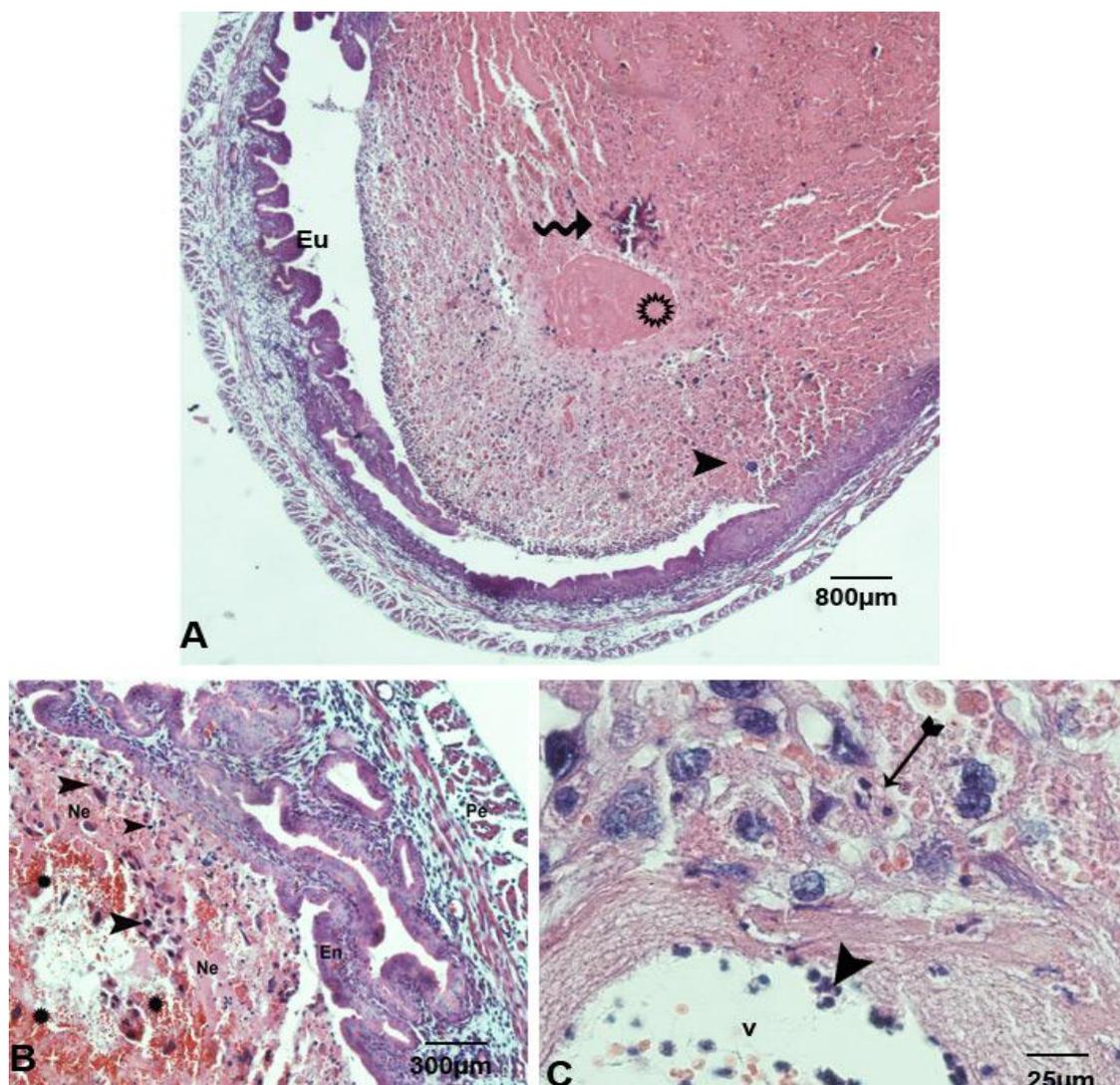


Figura 11- A- Corte de SIE em processo de reabsorção embrionária tardia, em destaque região com acúmulo de material fibrinóide amorfo (seta curva), evidencia também células com núcleo picnótico (cabeça de seta), aumento de 10x. B- Corte de reabsorção embrionária no 15ºddg, em destaque células, sanguíneas (asterisco) recentes e infiltrados inflamatórios (cabeça de seta) aumento 20x. C- Corte histológico de reabsorção embrionária no 15ºddg, em destaque núcleos picnóticos característico de um processo de morte celular semelhante a necrose e/ou apoptose (Flecha) aumento 40x.

Fonte: Do autor.

Desta maneira, acreditamos que as alterações histopatológicas evidenciadas em nossos resultados são desencadeadas principalmente pelo composto químico antraquinona, predominantemente encontrado e identificado no extrato hidroalcolico de *Cassia angustifolia*. Este composto aparentemente possui uma atividade bastante intensa nos SIEs e as alterações encontradas nos permitiram observar características diversas que podem ser associados a processos inflamatórios e morte células por necrose e/ou apoptose. Muito pouco é descrito sobre o processo de reabsorção de roedores é descrito na literatura e normalmente estes relatos compreendem uma

descrição superficial devido a grande quantidade de fatores envolvidos. Estudos mais aprofundados para compreensão deste processo precisam ser realizados.

#### **5.4.2 Análise estereológica e morfológica das células NKu através da citoquímica de lectinas**

As reações citoquímicas para lectina DBA realizadas em nosso trabalho demonstraram uma reatividade acastanhada forte que nos permitiu identificar as células NKu nos sítios de desenvolvimento embrionário com bastante facilidade. A seletividade da lectina DBA para as NKu se mostrou evidente de acordo com o descrito por Paffaro-Jr e colaboradores (2003) e nos permitiu uma análise morfológica e estereológica mais detalhada.

A distribuição das células NKu nos SIEs foi analisada através de uma análise estereológica realizada nos animais de 8<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> ddg tanto controles como tratados com o extrato hidroalcolico de *cassia angustifolia*, na mesma dose dos experimentos anteriores. A distribuição morfológica das áreas analisadas pode ser acompanhada panoramicamente nos SIEs onde já podem ser observadas algumas diferenças na distribuição geral das NKu entre os animais controles e tratados (Fig.12).

Nos animais controle, na região I (R1), próxima ao miométrio uterino da região mesomentrial observamos uma incidência média de 15 células no 8<sup>o</sup>ddg e 30 células no 11<sup>o</sup>ddg por 200 $\mu$ m<sup>2</sup>. Na região II (R2), localizada em uma área intermediária entre o miométrio e o endométrio decidualizado, próximo ao embrião, obtivemos uma contagem média de aproximadamente 30 NKu no 8<sup>o</sup>ddg e 38 no 11<sup>o</sup>ddg (Fig. 12 A). Já na região III (R3), localizada na porção do endométrio mais próxima ao embrião em desenvolvimento, observamos nos mesmo animais uma incidência média de 40 NKu no 8<sup>o</sup>ddg e 45 uNK no 11<sup>o</sup>ddg (Fig. 13 A e E).

Segundo Paffaro-Jr e colaboradores (2003) cada uma das regiões uterinas observadas apresenta uma atividade específica em relação à histofisiologia das células NKu. Desta maneira, a R1 corresponde a região de influxo das NKu, a R2 a região de proliferação das NKu e a R3 a região de maturação e migração destas célula

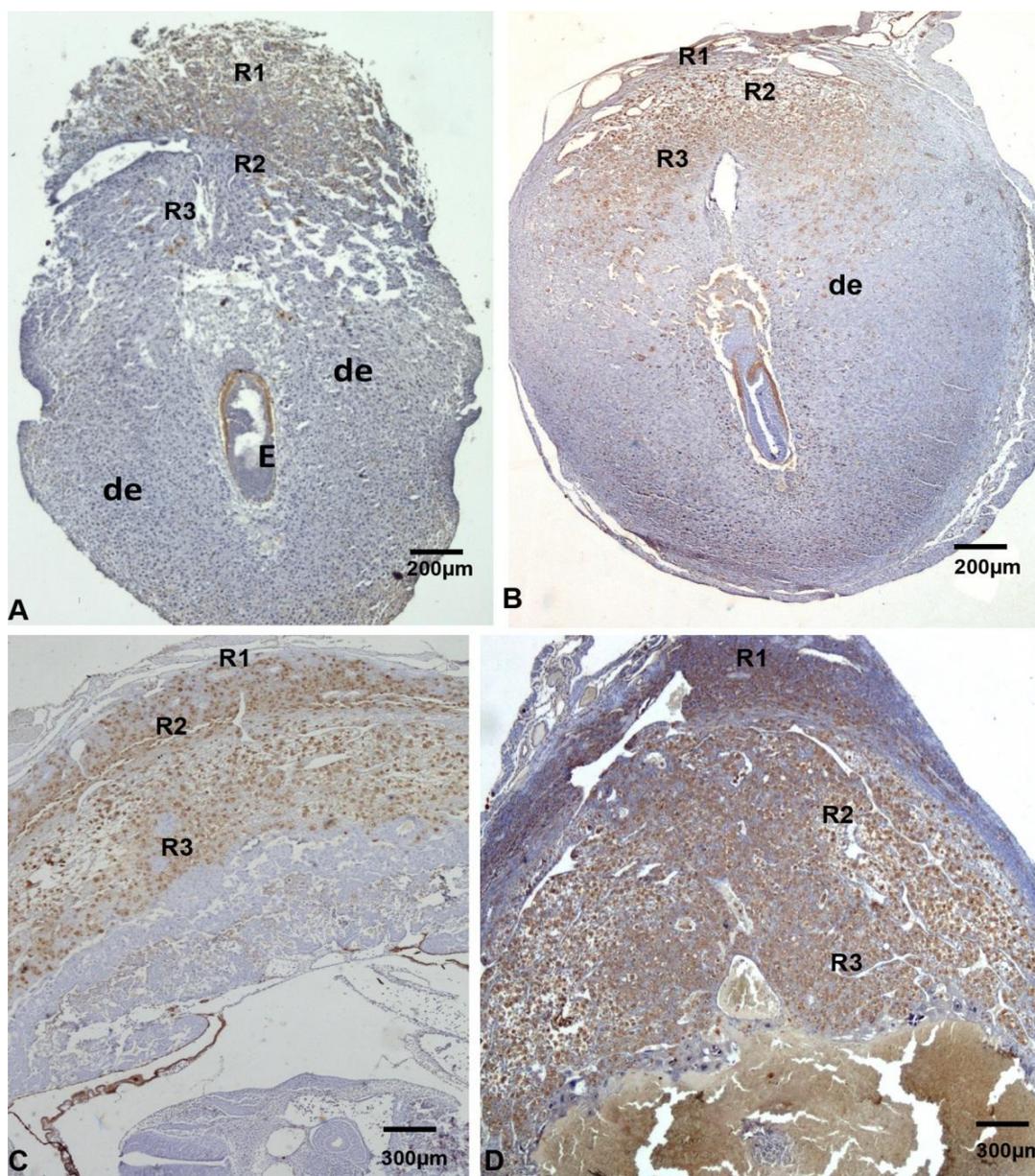


Figura 12- Fotomiografias de cortes histológicos de SIE no 8ºddg e 11ºddg , submetidos a reação de lectina- DBA. A- Animal controle no 8ºddg destacando as regiões 1, 2 e 3, aumento de 10x. B- Animal tratado no período pré – implantacional sacrificado no 8ºddg, destacando as regiões 1, 2 e 3, incidência maior de NKU, aumento de 10x. C- Animal controle sacrificado no 11ºddg, aumento de 10x. D - Animal tratado no período implantacional e sacrificado no 11ºddg, destacando a incidência maior de NKU em ambas as regiões 1, 2 e 3, aumento de 10x. Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte: Do Autor.

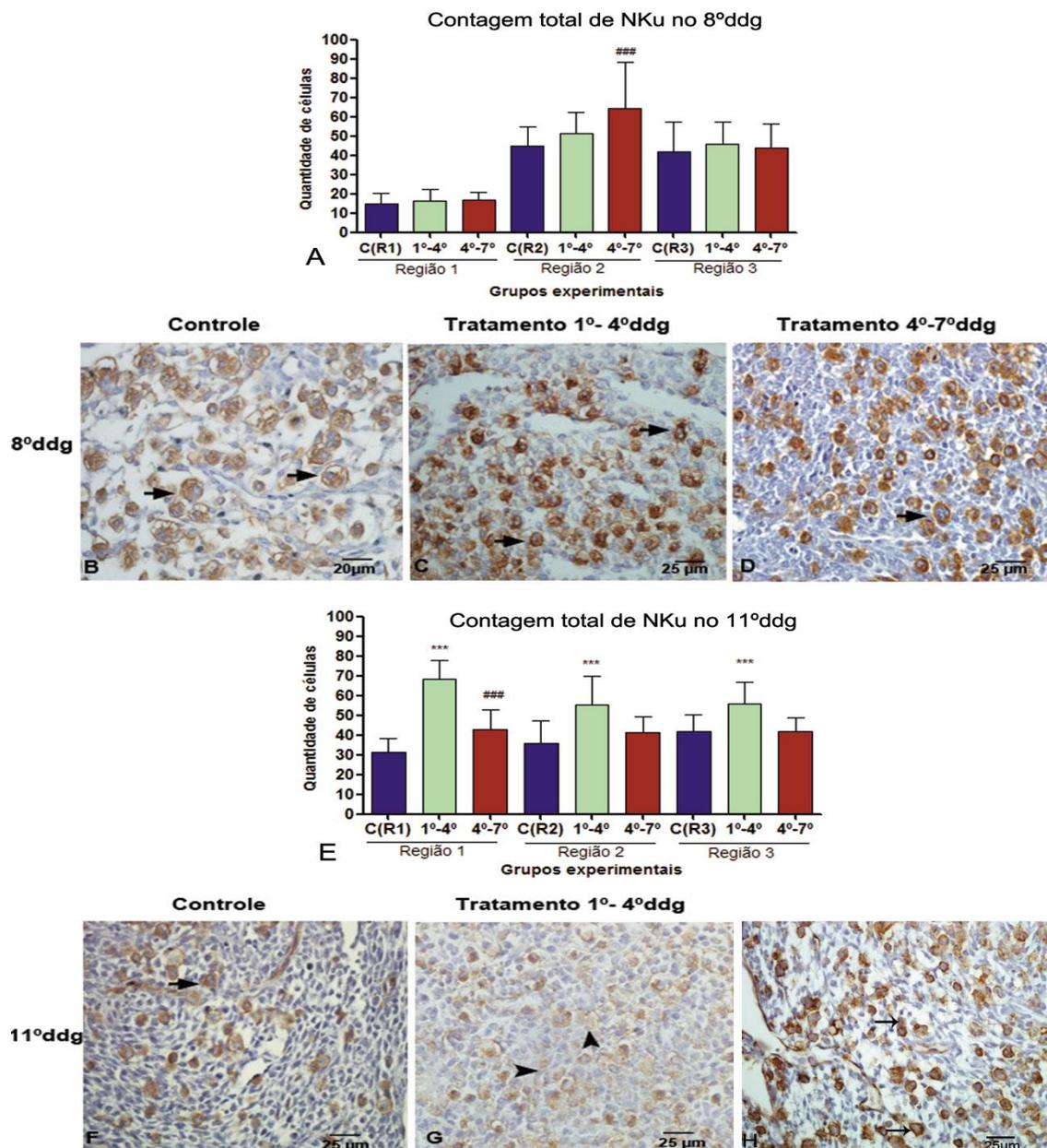


Figura 23- Análise estereológica do número total de células NKu no 8º ddg e 11ºddg A- Gráfico representa a média com S.E.M. para 3 animais no 8ºddg. Os símbolos (\*) representa o tratamento de 1º-4º dia de gestação e (#) representa o tratamento de 4º-7ºddg, foi utilizado one-way ANOVA com pós teste Bonferroni's  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ , e #  $p < 0.05$ ;  $##p < 0.01$ ;  $###p < 0.001$  quando comparados com o grupo controle. B, C e D - Cortes histológicos da região 2 de SIEs no 8º controle e tratados, mostrando a distribuição de NKu(setas), no período pré- implantacional e implantacional, aumento de 40x. E-Gráfico representa a média com S.E.M. para 3 animais no 11ºddg. Os símbolos (\*) representa o tratamento de 1º-4º dia de gestação e (#) representa o tratamento de 4º-7ºddg, foi utilizado one-way ANOVA com pós teste Bonferroni's  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ , e #  $p < 0.05$ ;  $##p < 0.01$ ;  $###p < 0.001$  quando comparados com o grupo controle. F G e H- Cortes histológicos da região 2 de SIEs no 11º controle e tratados, mostrando a marcação irregular de Lectina DBA/DAB-Peroxidase nas NKu (cabeceras de setas) no período de tratamento 1º- 4ºddg e 4º- 7º ddg, aumento de 40x.

A análise da R1 nos animais tratados com extrato de sene, em ambos os períodos de tratamento, sacrificados no 8ºddg não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Fig. 13 A). Na R2 desses animais observamos um aumento significativo no número de NKu no tratamento do 1º ao 4º ddg e um aumento ainda mais expressivo no tratamento de 4º ao 7º ddg (Fig. 12 C e D). A análise da região R3 também não foi significativa para o 8º ddg.

Na análise dos SIEs no 11º ddg observamos que houve um aumento de células em todas as regiões para o tratamento realizado do 1º ao 4º ddg. No entanto para o tratamento do 4º ao 7º ddg este aumento não demonstrou ser efetivo na contagem total de NKu (Fig. 13 E) e (Fig. 13 G e H).

Quando analisamos as características morfológicas das NKu DBA positivas dos animais controles no 8º e 11º ddg foi possível detectar uma reatividade para lectina-DBA de forma contínua nas membranas celulares nos grânulos citoplasmáticos e este aspecto foi considerado normal para as células Nku (Fig. 14 A). Nas fêmeas tratadas em ambos os períodos quando analisadas no 8º ddg apresentavam poucas diferenças para o controle no geral aumentava apenas a quantidade de células contendo espaços vazios que podemos associar a um aspecto de degranulação celular. (Fig. 14 B). No entanto, quando verificamos os animais tratados com sene no período de implantação notamos um maior número de alterações nas células NKu. Além dos grânulos com aspecto vazio observamos que ocorreu perda de especificidade da lectina DBA com a membrana plasmática destas células acarretando uma descontinuidade da reatividade em suas membranas, até mesmo ausência de reatividade para DBA em algumas células Nkus (Fig. 13 G e H). Esta alteração morfológica refletindo na reatividade das Nkus foi descrita recentemente por Zavan (2011) em camundongos tratados com LPS durante a prenhez.

Acreditamos que esta alteração pode ter interferido na análise morfométrica, pois foram contabilizadas apenas as células DBA positivas, desta maneira acreditamos que o número de células NKus presentes com este tratamento seja maior do que o observado no gráfico (Fig. 13 A e E). Se considerarmos este fato podemos inclusive supor que o efeito do tratamento no período de implantação foi mais drástico uma vez que foi capaz de alterar morfológicamente uma grande quantidade de células Nku.

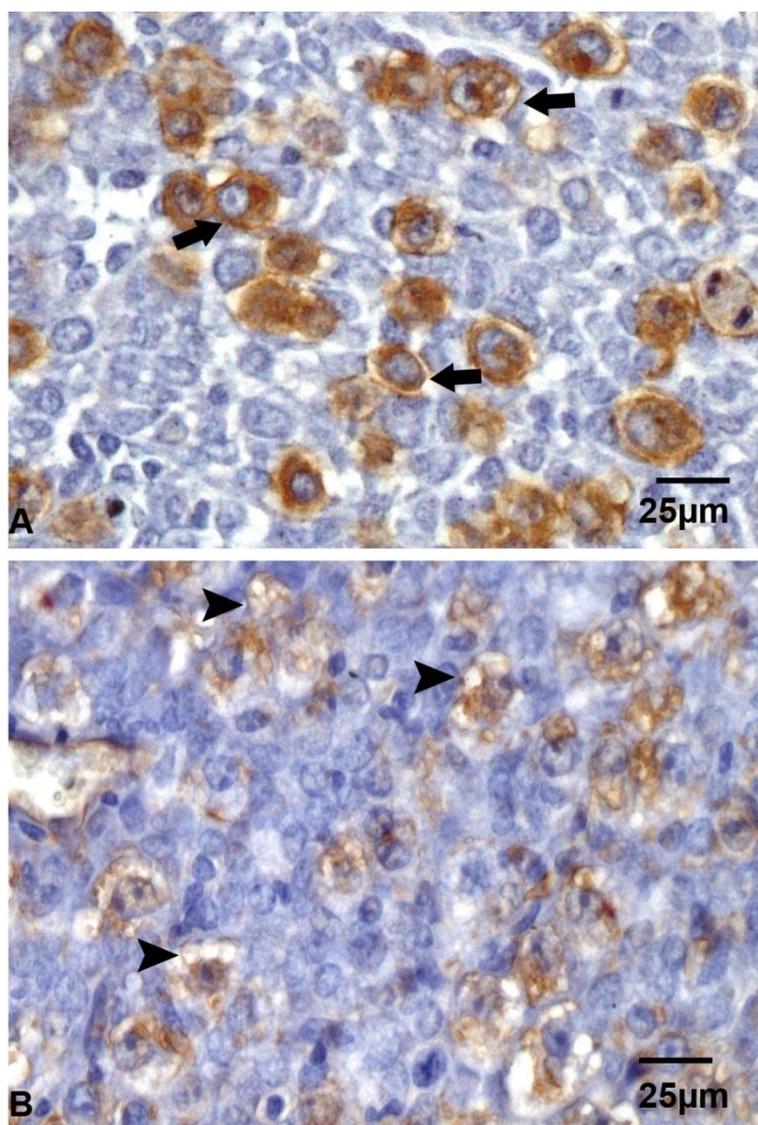


Figura 14- A- Fotomicrografia de corte histológico de SIE no 11ºddg controle, em destaque boa reatividade para DBA e células NKu sem grânulos (setas), aumento 40x. B- Corte histológico no 11ºddg de um animal tratado no período implantacional (4º- 7ºddg) evidenciado alterações no padrão de reatividade para lectina DBA nas NKu e também grânulos de aspecto vazio(cabeças de setas), aumento 40x. Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte: Do Autor.

De acordo com o que temos descrito na literatura, as células NKu começam a entrar no ambiente uterino no 5ºddg (Croy et al., 1997) e a quantidade máxima destas células é encontrada no 11º ddg seguida por uma queda (BULMER et al., 2005; TRUNDLEY, 2004). Se a este fato for considerado, o tratamento do 1º ao 4º ddg foi realizado antes da presença das Nku no ambiente uterino e o tratamento de 4º ao 7º ddg realizado no momento em que o influxo destas células estava ocorrendo para o útero gestante. Desta maneira, de acordo com os nossos resultados podemos supor

que o tratamento com o extrato de sene aparentemente parece ser mais significativo quando as Nku já estão presentes no endométrio materno.

Embora o fenômeno da degranulação das células NKu não tenha sido experimentalmente confirmado em nosso trabalho, o fato das alterações das células NKu presentes nos sítios em reabsorção perderem o conteúdo granular reativo à lectina DBA é um forte indício de que deva ocorrer a liberação parcial ou total deste conteúdo. Não sabemos como o extrato de sene pode estar interferindo nesta degranulação, no entanto, Van del Heuvel e colaboradores (2000), sugerem que as células NKu apresentam uma dinâmica funcional peculiar sendo capazes de responder ao estímulo de uma alteração embrionária, ocasionado por fatores químicos ou físicos, com a liberação de seu conteúdo granular e em seguida restaurar esse conteúdo rapidamente. Uma vez que estes grânulos parecem conter perforina, serina, esterases, fosfatases entre outras (PEEL, 1989), glicoproteínas incluindo Muc-1 (CROY et al., 1997), TNF-  $\alpha$ , IL- 10 ,IL-17, IL- 15, IL- 7, TGF  $\beta$ , (SANTNER et al., 2009; HUNTINGTON et al., 2009; HATTA et al., 2012). A liberação dos mesmos pode caracterizar um efeito citotóxico em todo ambiente uterino (CROY; KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997; ASHKAR; CROY, 2003).

Algumas alterações morfológicas nas NKu foram analisadas por Roman e colaboradores (2002), onde através de uma lesão mecânica nos sítios de implantação embrionários observou focos hemorrágicos no interior dos sítios, entre os sítios e alterações morfológicas das células NKu que indicavam ausência ou redução de reatividade na superfície celular pela lectina DBA, reproduzem a perda, ausência ou redução temporal do receptor expresso na superfície celular, o qual deve ser importante papel no controle da ativação das Nku. Esta descrição vem perfeitamente de encontro com as alterações descritas em nosso trabalho e no trabalho de Zavan (2011).

No ambiente gestacional as citocinas inflamatórias devem estar em equilíbrio adequado para o sucesso da gestação. O aumento significativo de IFN $\gamma$ , por exemplo, pode acarretar no comprometimento no desenvolvimento gestacional (KIMURA et al., 2004; GERMAIN et al., 2007). Concentrações muito altas de IFN- $\gamma$  mostram ocasionar morte das CTGs, *in vitro* (ALBIERI et al., 2005) e podem ser deletérias aos embriões jovens (GRAHAM et al., 1994).

Segundo Croy e colaboradores, 2010 os mesmos autores, estas células são responsáveis pela produção de INF-y, influenciando a partir desta citocina modificações vasculares que aumentam o suprimento sanguíneo durante a gestação.

Além do IFN- $\gamma$  (GRAHAM et al., 1994) estas células produzem também TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ 1 (DUNK et al., 2000; BAUER et al., 2004) que são citocinas essenciais para o crescimento, proliferação e diferenciação do trofoblasto (VON RANGO, et al., 2003; ZHANG et al., 2012). Assim, estudos recentes sugerem que as NKu podem regular a invasão do trofoblasto auxiliando no aumento do suprimento sanguíneo das artérias espiraladas para o feto, através da liberação de IFN- $\gamma$  (GRAHAM et al., 1994, ASHKAR et al., 2009).

O aumento da atividade das CTGs observado em nosso trabalho pode estar diretamente associado ao incremento da atividade fagocitária destas células pelo IFN- $\gamma$  (AMARANTE-PAFFARO, 2002; AMARANTE PAFFARO et al., 2004; ALBIERI et al., 2005; BEVILACQUA et al., 2010). Este fato associado aos achados de CTGs em intensa atividade fagocitária nos SIEs em reabsorção nos leva a supor que o extrato de sene possa acarretar um aumento atividade fagocitária exercida pelas CTGs em decorrência da reação inflamatória observada nestas regiões. Desta maneira, o IFN- $\gamma$ , assim como outras moléculas do processo inflamatório, poderiam estar agindo diretamente no recrutamento e incremento da atividade fagocitária destas células. Uma vez que as CTGs são largamente comparadas aos macrófagos (GILBERT et al., 1993; SHARMA et al., 1998) e até mesmo sugeridas para serem inclusas no sistema imune inato do organismo durante a gestação (GULERIA ; POLLARD, 2000; AMARANTE-PAFFARO, 2002; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; 2011; BEVILACQUA et al., 2010) esta hipótese parece condizente.

Dentro deste contexto, a análise quantitativa das células NKu em animais tratados com plantas que contenham atividade abortiva torna-se interessante pois de acordo com Silva e colaboradores (2008) uma inibição ou super expressão inadequada das células NKu pode culminar em aborto, passando por problemas de nutrição responsável pelos óbitos fetais e retardo de crescimento intra-uterino, além de se associar à hipertensão gestacional.

Ainda de acordo com nossos resultados estereológicos, foi possível averiguar uma possível ação sinérgica entre as células Nku e as células trofoblásticas gigantes que se encontravam em grande quantidade nos cortes histológicos de reabsorção embrionária, assim como nos processos hemorrágicos existentes.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por nossos estudos morfológicos, citoquímicos, e estereológicos nos permitem concluir que:

- O extrato de *Cassia angustifolia* utilizado em nosso trabalho apresenta como principal constituinte os senosídeos A.
- O tratamento com o extrato hidoralcólico de *Cassia angustifolia*, nos camundongos prenhes acarretou hemorragias e reabsorções embrionárias diminuindo da viabilidade gestacional e o número da prole.
- O tratamento com o extrato de *Cassia angustifolia* induziu um aumento significativo no número total de células NKu presentes no sítio de implantação de 8º e 11º ddg.
- As células Nku, das fêmeas tratadas com extrato de *Cassia angustifolia* apresentaram uma perda da reatividade para lectina DBA, com acúmulo de grânulos de secreção.
- Os efeitos quanto a presença de focos hemorrágicos anormais, reabsorções embrionárias, diminuição da viabilidade gestacional e morte celular programada aqui observados podem estar sendo causados pela grande concentração de senosídeos presentes no extrato.
- Devido as alterações observadas neste trabalho o uso de *Cassia angustifolia* deve ser contra indicado durante a gestação.

## REFERÊNCIAS

ALBIERI, A.; BEVILACQUA, E. Induction of erythrophagocytic activity in cultured mouse trophoblast cells by phorbol myristate acetate and all-trans- retinal.

**Placenta.**, São Paulo, v. 17, p. 507–512, 1996.

ALBIERI, A.; AMARANTE, A. M.; GAGIOTI, S.; BEVILACQUA, E. In vitro behavior of post implanting and placental trophoblast cells during zymosan challenging and interferon-g stimulation. **Placenta.**, São Paulo, v. 22, p. 211- 215, 2001.

ALBIERI, A. et al. Interferon – gamma alters the phagocytic activity of the mouse trofoblast. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, São Paulo, v. 10, p. 30 – 34, 2005.

ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, P. I. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Botucatu, v. 73, p. 53–60, 2000.

AMARANTE-PAFFARO, A. M. **Expressão da fagocitose e de enzimas antioxidantes pelas células trofoblásticas da placenta de camundongos.** 2002. Tese (Doutorado em Biologia Celular e estrutural) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

AMARANTE-PAFFARO, A. M. et al. Phagocytosis as a potential defense mechanism of the mouse trophoblast placental cells. **Reproduction.**, São Paulo, v. 128, p. 207 - 218, 2004.

ARIMA, Y. et al. 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. **Toxicol. Sci.**, Tokyo, v. 91, p. 382- 392, 2006.

ARNOUS, A. H, et al. Plantas medicinais de uso caseiro- conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Rev. Espaço para a Saúde.**, Londrina, v. 6, p. 1 - 6, 2005.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J.P.; CROY, B.A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.**, v. 171, p. 2937- 2303, 2000.

BABIOR, B. M. et al. Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p. 741-744, 1973.

BALA, S. et al. An improved method for the analysis of sennoside in *Cassia angustifolia* by high-performance liquid chromatography. **Phytochem. Anal.** v. 12, p. 277- 306, 2001.

BARBOSA-FERREIRA, M. J. et al. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. **Food and Chem. Toxicol.**, São Paulo, v. 43, p. 497–503, 2005.

BARBOSA-FERREIRA, J. M. et al. Intoxication by *Senna occidentalis* seeds in pregnant goats: Prenatal and postnatal evaluation. **Exp. Toxicol. Pathol.**, São Paulo, v. 63, p. 263 – 268, 2011.

BARILLI, S.L.S.; SANTOS, S.T.; MONTANARI, T. Efeito do decocto dos frutos de buchinha-do-norte (*Luffa operculata* Cogn.) **Rev. Bras. Farmacogn.**, Porto Alegre, v. 17, p. 117-126, 2005.

BARROS. F. R. N.; ALBUQUERQUE, I. L. Substâncias e medicamento abortivo utilizados por adolescentes em unidades secundárias de saúde. **Ver. Bras. Prom. Saúde.**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 177-184, 2005.

BAUER, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **J Clin Endocrinol Metab.**, Vienna, v. 89, p. 812–822, 2004.

BELEW, C. Herbs and Childbearing woman. **J. Midwifery.**, Las Vegas, v. 44, p. 231 - 252, 1999.

BEVILACQUA, E. A.; ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. **J. Morphol.**, São Paulo, v. 198, p. 341–351, 1988.

BEVILACQUA, E. M. A. F.; ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Arch. Biol. Med.**, Santiago, v. 22, 107 - 117, 1989.

BEVILACQUA, E. A. M. F.; ABRAHAMSOHN, P. A. Growth of mouse ectoplacental cone cells in subcutaneous tissue. Development of placental-like cells. **Am. J. Anat.**, São Paulo, v. 192, p. 382 - 399, 1991.

BEVILACQUA, E., et al. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. A review. **Int. J. Dev. Biol.**, São Paulo, v. 54, p. 495 - 505, 2010.

BILLINGTON, W. D. Biology of the trophoblast. **Ad. Reprod. Physiol.**, London, v. 5, p. 27-66, 1971.

BOARETO, C. A. **Efeitos da artemisinina (*Artemisia annua* L.) na gestação de ratas *Wistar*. 2007.** Dissertação Mestrado em Farmacologia- Instituto de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações em Saúde.** Brasília, 2003. Disponível em : [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). Acesso em 3 set. 2010.

BULMER, J. N. et al. Granulate lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. **Human. Reprod.**, Oxford, v. 6, p. 791- 798, 1995.

BURKE, D. et al., A. Uterine NK Cells, Spiral Artery Modification and the Regulation of Blood Pressure During Mouse Pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Kingston, v. 63, p. 472 – 481, 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Bras. J. Med. Biol.**, Florianópolis, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia.**, Florianópolis, v. 78, p. 98 - 106, 2008.

CAMPESATO, V. R., FACHINNI, L. S., **Uso de plantas medicinais durante a gravidez e risco para malformações congênitas.** 2005. doutorado em Genética e Biologia Molecular – Instituto de Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia.**, Napoli, v. 71, p. 58-65, 2000.

CARTER, A. M. Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studie a review. **Placenta.**, Oence, v. 21, p. 31 – 38, 2000.

CAVALIERI, M. J. et al. Mitochondrial myopathy in Senna Occidentalis seed- feeded chicken. **Ecotox. Environ. Safety.**, Madrid, v. 37, p. 181- 185, 2010.

CIGANDA, C.; LABORDE, A. *Herbal infusions used for induced abortion*. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, Montevideo, v. 41, p. 235 - 244, 2003.

CLARKE, R., J.; RATES, S., K.; BRIDI, R. Uma alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Informa.**, Recife, v. 19, p. 120- 128, 2007.

CHIANG, J. et al. Danthron, an anthraquinone derivative, induces DNA damage and caspase cascades-mediated apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells through mitochondrial permeability transition pores and Bax-triggered pathways. **Chem Res Toxicol.**, Tokyo, v. 24, p. 20-29, 2011.

CHIOU, M. S. et al. Danthron Triggers ROS and Mitochondria-Mediated Apoptotic Death in C6 Rat Glioma Cells Through Caspase Cascades, Apoptosis-Inducing Factor and Endonuclease G Multiple Signaling. **Neurochem. Res.**, Taichung, v. 46, p. 258-294, 2012.

COELHO, H. L. Farmacovigilância: um instrumento necessário. **Cad. Saúde Pública.**, Fortaleza, v. 14, p. 871 – 875, 1998.

CONOVER, E. A. Herbal agents and over-the-counter medications in pregnancy. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, Omaha, v. 17, p. 237 - 297, 2003.

COOPER, M. et al. A. Human Natural Killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood.**, Columbus, v. 97, p. 3146 – 3151, 2001.

COSTA, P. P. **Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos**. 2005. Dissertação de mestrado em Zootecnia. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de São Paulo. 2005.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S.; Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Rev Bras Farmacogn.**, São Paulo, v.15, p. 272-278, 2005.

CORRÊA DA SILVA, C. R. **Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células da granulosa metriais em útero de camundongos prenhes**.1997. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Tecidual. Instituto de Biologia. UNICAMP, Campinas. 1997.

CORTEZ, et al. Levantamento das plantas medicinais utilizadas na região Umuarama, *PR. Arq. Ciên. Saúde.*, Curitiba, v. 3, p. 97-104, 1999.

CROY, B. A. et al. Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Ontario, v. 37, p. 463–470, 1997.

CROY, B. A. et al. Uterine Natural Killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, Guelph, v. 126, p. 149-160. 2003b

CROY, B. A. et al. Analysis of uterine natural killer cells in mice. In: Campbell KS Natural Killer Cell Protocols,., **J. Humana. Press.**, Totowa, v. 37, p. 465–503, 2010.

CUMMINGS, A.M.,. Toxicological mechanisms of implantation failure. **Fund. Appl. Toxicol.**, North Carolina, v. 15, p. 571– 579, 1990.

DAMASCENO, C. D. et al. Efeito do ácido acetilsalicílico na performance reprodutiva e na prole de ratas Wistar. **Rev Assoc. Med Bras.**, São Paulo, v. 48, p. 312-318, 2002.

DUNK, C. et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. **Am. J. Pathol.**, Birmingham, v. 156,p. 2185–2199, 2000.

ELDIN, S.; DUNFORD, A . **Fitoterapia na atenção primária a saúde.**, São Paulo; Cap 17, p. 187-201.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for reproductibe toxicity risk assessment.** EPA/630/R-96/009. Washington, 1996.

FABIAN D. et al. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. **Genology.**, Kosice, v.61, p.745-755, 2004.

FIGUEIRÓ FILHO, E. A. et al. Efeito das drogas anti-retrovirais sobre as taxas de fertilidade de ratas Wistar. **Rev. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 10, p. 647-52, 2002.

FRÍAS, G. M.; KREMER, M. Human teratogens: current controversies. **Advanced Pediadric.**, Downstonw, v. 55, p. 171- 211, 2008.

FOSTER, S. Tyler's honest herbal a sensible guide to the use of herbs and related remedies, **The Haworth Herbal Press.** ,New York, v. 4, p. 442-449, 1999.

FREITAS, T.G., AUGUSTO, P.M., MONTANARI, T. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. **Contraception.**, Porto Alegre, v. 71, p. 74-77, 2004.

GAGIOTI, S.; COLEPICOLO, P.; BEVILACQUA, E. Reactive oxygen species and the phagocytosis process of hemochorial trophoblast. **Ciê. e. Cult.**, São Paulo, v. 48, p. 37-42, 1996.

GAGIOTI, S.; SCAVONE, C.; BEVILACQUA, E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. **Biol. Repro.**, São Paulo, v. 62, p. 260–268. 2000.

GEORGIADES, P. et al. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta.**, Cambridge, v. 23, p. 3-19, 2002.

GILBERT, S. F. Development biology. 7<sup>th</sup> Ed. Sunderland: Sinauer, 2003. p. 694- 696, 2003.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 30, p. 374-381, 2007.

GRAHAM, C. H. et al. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. **Exp Cell Res**, Kingston, v. 214, p. 93–99, 1994.

GUILBERT, L.; ROBERTSON, S.A.; WEGMANN, T.G. The trophoblast as an integral component of macrophage-cytokine network. **Immunol. Cell. Biol.**, Edmonton, v. 71, p. 49-57, 1993.

GUIMOND, M. J., WANG, B., CROY, B. A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in Natural Killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. **J. Exp. Med.**, Montreal, v.187, p. 217- 223, 1998.

GULERIA, I.; POLLARD, J. W. The trophoblast is a component of the innate immunosystem during pregnancy. **Nat. Medicine.**, New York, v. 6, p. 589-593, 2000.

GUTIÉRREZ-PAJARES, J. L.; ZUÑIGA, L.; PINO, J. Ruta graveolens aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. **Reproduct. Toxicol.**, Lima, v. 17, p. 667-672, 2003.

HANNA, J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. **Nat Med.**, Jerusalém, v.12, p.1065–1002, 2006.

HATTA, K.; MACLEOAD, J. R.; GERBER, A. S.; CROY, A. B. Emerging Theme s in Uterine Natural Killer Cell Heterogeneity and Function. **AJRI.**, Toronto, v. 24, p. 57-69, 2012.

HARAGUCHI, M. et al. P.C.F..Muscle degeneration in chicks caused by Senna occidentalis seeds. **Avian Pathology.**, Detroid, v. 27, p. 346- 399, 1998.

HOFFMAN, L. H.; WOODING, F. B. P. Giant and binucleate cells of mammals. **J. Experi. Zool.**, Nashville, v. 266, p. 559-577, 1993.

HOSHIDA, M. S. et al. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. **Placenta.**, São Paulo, v. 28, p.1059-1072, 2007.

HUNT, J. S. PETROFF, M. G.; BURNEET, T. G. Uterine leukocytes: Key players in pregnancy. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v. 2 , p. 127- 257, 2000.

HUNTINGTON, N.D. et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. **J. Exp. Med.** Ontario, v. 206, p.25–34, 2009.

JIANHONG, Z. et al. A. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cell. Mol. Immunol.**, Ontario, v. 8, p. 1–11, 2011.

KATZ, S.; ABRAHAMSOHN, P. A. Involution of antimesometrial decidual in the mouse (an structural study). **Anat. Embryol.**, v. 176, p. 251- 258, 1987.

KANAI- AZUMA, M. et al. Giant cell transformation of trophoblast cells in mice. **Endocrine J.**, v. 41, p. S33- S41, 1994.

KIMURA K. et al. Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN-tau by bovine blastocysts. **Mol Reprod Dev.**, London, v. 68, p. 88-95, 2004.

KING, A. et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK

cell receptors. **Placenta.**, Cambridge, v.21, p. 81- 86, 2000.

KOPCOW, H. D. et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Cambridge, v.102, p. 15563–15571, 2005.

KORWAR, G. R.; YADAV, S. K. Productivity, quality, nutrient use efficiency and economics of senna (*Cassia angustifolia*) as influenced by FYM and fertilizer nitrogen under rainfed conditions. **Indian J. Agron.**, Andhra Pradesh, v. 55, p. 79-83, 2010.

LIPPE, E. M. O. **Avaliação da expressão de isoformas da óxido nítrico sintase nas células da interface materno fetal na gestação normal e com lesão embrionária.** 2007. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural. Instituto de Biologia. UNICAMP, Campinas. 2007.

LONGATO, G. B; **Estudo do efeito de *Ruta graveolens* e *Artemisia absinthium* durante a gestação em camundongos.** 2007. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas – Bacharelado, Universidade Federal de Alfenas, 2007.

LONGATO, G. B. et al. Study of the effect of *Ruta graveolens* extract in the mice reproduction, **Ethnopharmacol.**, Alfenas, v. 71, p. 74-77, 2010.

MALIK, F. et al. Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of antitumoural activity of a standardised herbal formulation of *Withania somnifera*. **Euro. J. Cancer., Jam.**, v. 45, p. 1494- 1504, 2009.

MANDELBOIM, O.; STANIESTSKY, N. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. **Febes letters.**, Ontario, v. 584, p. 4895–4900, 2010.

MARTINS, E. R, et al. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade mumbuca Jalapão- TO. **Plantas medicinais.**, Viçosa, v. 17, p. 145- 162, 2000.

MELITO, A. L.; BERNARDI, M. M.; FLÓRIO, J. C. Avaliação da embriofetotoxicidade do extrato bruto de *Ruta graveolens* L. administrado a camundongos em diferentes períodos de gestação. **Rev. Bra. Toxicol.**, São Paulo, v.16, p. 63-70, 2003.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. *Uso de plantas medicinais na gravidez.* **Manual de Teratogênese.**, Porto Alegre, v.13, p, 422-490, 2007.

MORALES, A. M.; DÍAZ, J., BARRIENTOS, C. El uso de sen durante el embarazo y la lactancia. **Rev. de Fitoterapia**. v.4, p. 41-54, 2004.

MOREIRA, L.M.A Associação entre o uso de abortifacientes e defeitos congênitos. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, São Paulo, v. 23, p. 517- 528, 2001.

MÜNTENER, M.; HSU, Y. C. Development of trophoblast and placenta in the mouse. **Acta Anatomica.**, Berlin, v. 98, p. 241-252, 1997.

MURPHY. S. P.; HANNA, N. N.; FAST, L.; SHAW, K.; ROMERO, R.; SHARMA, S. Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. **AJ. O. G.**, v. 308, p. 358-364, 2009.

NATALE, D. R.; STAROVIC, M.; CROSS, J. C. Phenotypic analysis of the mouse placenta. **Methods. Mol. Med.** Alberta, v. 121, p. 275- 301, 2010.

NETO RODRIGUES, E. M. C. et al. Utilização de plantas medicinais relacionadas a eventos do ciclo reprodutivo feminino no distrito de Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia. **Série Ciências Biológicas.**, Feira de Santana, v. 5, p. 125 - 127, 2005.

NILSSON, U. et al. The influence of net water absorption on the permeability of antipyrine and levodopa in the human jejunum, **Pharm. Res.**, Uppsala, v. 11, p. 1540–1544, 2004.

NOGUEIRA M. J. C. Fitoterapia popular e enfermagem comunitária. **Rev. Esc. Enf. USP**, São Paulo. v. 17, p.275, 1993.

PAFFARO JR, V. A.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T. Differentiation stages of mouse uNK and their distribution in the uterus during early pregnancy. **Acta. Microsc.**, Campinas, v. 8, p.283 – 284, 1999.

PAFFARO JR, V. A et al. Subset Classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells By DBA Lectin Reactivity. **Placenta.**, Campinas, v. 24, p. 479- 454, 2003.

PAULESU, L. et al. Immunohistochemical localization of IL-1 beta in normal human placenta. **Lympho. Cytok. R.**, Siena, v.10, p. 443-448, 1991.

PAVIA, C.S. Expression of the cell-mediated antimicrobial immunity by mouse trophoblast monolayers. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 147, p. 1006-1010, 1983.

PASSEY, R.; et al. A Null mutation in the inflammation – Associated S100 Protein S100A8 cause early resorption of mouse embryo. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 163. p. 2209- 2216, 2012.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol**, Southampton, v. 115, p. 1-7, 1989.

PLAKS, V. et al. Uterine DCs are crucial for decidual formation during embryo implantation in mice. **J. Clinical. Dalkins.**, Invest. v. 75, p. 356- 69, 2010.

PLEVYAK, M. et al. Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Providence., v. 47, p. 242- 298, 2002

PERREIRA, A. C.; RAMIREZ, N. J.; LAGE, V.; ABRAMINO, L. Immunity in the Normal Pregnancy and in the Patient with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), **J. Reuma.**, Cidade do Mexico., v. 45, p. 134- 174, 2005.

RATES, S. M K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia., Porto Alegre, v. 11, p. 57- 69, 2001.

ROBBERS, J.E.; TYLER, V.E. TYLER'S HERBS OF CHOICE: **The Therapeutic Use of phytomedicinals.**, New York, v. 4, p. 247-252, 1999.

ROMAM, S. S. **Caracterização morfológica e comportamental das células NKu em camungos após lesão embrionária nos diferentes períodos gestacionais.** 2001. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Estrutural. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2001.

ROMAM, S. S. **Avaliação toxicológica de compostos orgânicos de telúrio sobre o desenvolvimento pré- natal em camundongos.** 2011. Tese de Doutorado em Bioquímica e Toxicologia. Universidade Federal de Santa Maria-RS, Santa Maria, 2011.

RUDDER, E. A. M. C. Guia compacto das plantas medicinais., São Paulo, v.5, p. 478, 2002.

RUSSEL, P. et al. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure I: Techniques. **J. Reproduc. Immunol.**, New York, v, 91, p. 90– 102 , 2011.

SASMONO, R. T et al. A macrophage colony-stimulating factor receptor green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse, **Blood.**, Brisbane, v. 101, p. 1155-1163, 2003.

SANTNER-NANAN, B et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3 + and IL-17-producing CD4 + T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. **J. Immunol.**, Washington, v.183, p. 7023 –7030, 2009.

SCHENKEL, E.P.; ZANNIN, M.; MENTZL, A.; **Plantas tóxicas: Farmacognosia: da Planta ao medicamento.** 2ed. Porto Alegre, 2000.

SILVA, C. R. et al. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. **Toxicol. Vit.**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 212-218, 2008.

SILVA, M. V. Plantas Mediciniais e tóxicas da Reserva Biológica do Lami, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bot.**, Rio de Janeiro, v. 57, p. 61-73, 2002.

SIMÕES, C.M.O. **Introdução à análise fitoquímica.** Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, v. único, p. 229-245, 2003.

SIMMONS, R. L.; RUSSEL, P. S. The antigenicity of mouse trophoblast. **Ann. N. Y. A. of Scien.**, New York, v. 99, p. 717-732, 1962.

SHARMA, R, K. Mouse trophoblast cell line: II – relationship between invasive potential and proteases. **In vivo**, v. 12, p. 209-218, 1998.

SHIA, C. S. et al. Steady-state pharmacokinetics and tissue distribution of anthraquinones of *Rhei Rhizoma* in rats. **J. Ethnopharmacol. Taichung.**, v. 137, p. 1388- 1407, 2011.

SHIMA, T. et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. **J. Reprod. Immunol.**, Senday, v. 85, p. 121- 129, 2010.

SHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional: Um Guia de Fitoterapia para as Ciências da Saúde.** Barueri: **Manole.**, São Paulo, v.5, p. 386,

2002.

SMYTH, M. J. et al. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer., **J. EXP. Med.** v. 12, p. 1973- 2020, 2005.

SOARES, M. K.; GLASSER, S. R. Placental lactogen production and function differentiation of rat trophoblast cells in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 79, p. 335- 341, 1987.

SOUZA, A. L.; LIMA, I. M. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré – implantação. **Rev. Bras. Reprod. Animal.**, v. 33, p. 194- 202, 2009.

SUN, S.W.; SU, H.T., Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. **J. Pharma. Biomed. Anal.**, Taipei, v. 29, p. 881–894, 2002.

TASAKA, A.C. et al. Toxicity of Senna occidentalis seed in rabbits. *Vet. Res. Commun.*, São Paulo, v. 24, p. 573–82, 2004.

TOLEDO, M. I. et al. Acute and subacute toxicity of Cochlospermum regium. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 359-361, 2000.

TOMAZZONI M.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e Contexto Enferm.**, Florianópolis, v. 15, p. 115-122, 2006.

TRUNDLEY A, MOFFETT A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens Rev.**, Cambridge, v.63, p 1–12, 2004.

VAN DEN HEUVEL, M. J. et al. A review of trafficking and activation of uterine Natural Killer cells. **Am J Reprod Immunol**, London, v. 54, p.322-331, 2005

VAN GORKOM, B.A. et al. Anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 443–452, 1999.

VIEGAS, JR.; PINTO, C. A. Plantas medicinais, cura segura? **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIEGAS, JR. et al. Aspectos Químicos, Biológicos e Etnofarmacológicos do Gênero Cassia. **Qumi. Nova.**, São Paulo, v. 29, p. 1279-1286, 2006.

VIGNATI, L. AA human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species-specific CYP3A induction. **Toxicol.**, Rio de Janeiro, v. 199, p. 23-33, 2004.

VON RANGO, U. et al. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. **Placenta**, Aachen, v. 24, p. 929–940, 2003.

WATSON, A.J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Anim. Reprod. Sci.**, Quebec, v.82, p. 583-592, 2004.

WATSON, D. E.; CROSS J. C. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse placenta. **Physiol.**, Ontario, v. 20, p. 180-193, 2005.

XU, L. et al. Simultaneous Determination of Eight Anthraquinones in Semen Cassiae by HPLC-DAD. **Phytochemical. Anal.** 2011.

YAO, Y. et al. Anthraquinone C, a novel natural compound derived from *Juglans mandshurica* Maxim, induces S phase arrest and apoptosis in HepG2 cells. **Apoptosis. Chang. Chum.**, v. 67, p. 486- 497, 2012.

YU, J et al. A. Pro- and anti-inflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. **Immunity**; Toronto, v.24, p. 575–590, 2006.

YUNES R. A.; PEDROSA R. P.; FILHO V. C. Fármacos e Fitoterápicos : A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofarmacos no Brasil .**Qui. Nova.**, São Paulo, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZAVAN, B. **Aspectos Morfofisiológicos e comportamentais após inflamação induzida por LPS durante a gestação de camundongos.**2011. Dissertação de Mestrado em Ciências fisiológicas. Instituto de Biologia Celular e Integrativa. UNIFAL. Alfenas. 2011.

ZHANG, Z. et al. In vitro genotoxicity of danthron and its potential mechanism. **Mutat. Res.**, Ontario, v. 722, p. 39-46, 2011.

ZHANG, J. et al. Natural Killer cell-triggered caspase transformation: maternal care before birth?. **Cell. Mol. Immunol.**, Ontario, v. 11, p. 1- 11, 2011.

ZHANG, J. et al. Unusual timing of CD127 expression by mouse uterine natural killer cells. **JLB.**, Ontario, v. 91, p. 417- 426, 2012.

ZUCKERMANN, F. A.; HEAD, J. R. Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. **Placenta**, v. 7, p. 349-364, 1986.

## ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-4000 Fax: (35) 3299-1063



I

Alfenas, 02 de agosto de 2012.

Prof. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 444/2012, intitulado “Efeito do extrato hidroalcolico de *Cassia angustifolia* na gestação de camundongos” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

---

Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento  
Presidente do CEUA - Unifal-MG