

## **AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL CITOTOXICIDADE DA BOLDINA EM RIM E FÍGADO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À HEMORRAGIA INTRACEREBRAL**

**MARQUES, Magno S.<sup>1</sup>; LOUREIRO, Kamila F.<sup>2</sup>; RIBEIRO, Suellen A.<sup>1</sup>; JARDIM, Rodrigo D.<sup>3</sup>; HORN, Ana P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Ciências Biológicas - Bacharelado; <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas/Programa de Pós graduação em Fisiologia Animal Comparada, <sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Morfologia.

Correios eletrônicos: [magnomarques@aol.com](mailto:magnomarques@aol.com); [kamila-loureiro@hotmail.com](mailto:kamila-loureiro@hotmail.com); [suellenbio2010@hotmail.com](mailto:suellenbio2010@hotmail.com); [aleerod@terra.com.br](mailto:aleerod@terra.com.br); [anapaulahorn@yahoo.com.br](mailto:anapaulahorn@yahoo.com.br)

### 1 INTRODUÇÃO

Nosso grupo de pesquisa tem como foco a hemorragia intracerebral e o estudo de moléculas que atuem como possíveis fármacos, a fim de amenizar o sofrimento dos pacientes acometidos por essa patologia. Na busca de efeitos colaterais desses possíveis fármacos, a análise histopatológica torna-se uma ferramenta essencial.

Trabalhos recentes demonstraram que a boldina (S-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina), que é o principal alcalóide presente nas folhas e casca de *Peumus boldus* Molina, conhecida como Boldo-do-Chile, possui efeito antiproliferativo em linhagens de gliomas *in vitro* (GERHARDT et al., 2009) e que é neuroprotetora em um modelo de privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de ratos (HORN et al., manuscrito submetido). Além disso, já foi demonstrado que essa molécula possui atividade antioxidante e antiinflamatória (SPEISKY e CASSEL, 1994), sendo por isso um potencial fármaco a ser estudado para o tratamento da hemorragia intracerebral.

O rim e o fígado são órgãos envolvidos com a metabolização e a excreção de drogas, sendo normalmente afetados quando as mesmas apresentam citotoxicidade. Nesse contexto, nosso estudo concentrou-se em avaliar a possível citotoxicidade da boldina em rins e fígados de ratos Wistar em um modelo de hemorragia intracerebral.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

#### 2.1. Modelo experimental.

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da colônia Wistar, machos, com peso entre 250-300 g. Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande – FURG e mantidos em condições padrão. Os animais foram anestesiados utilizando-se uma injeção intraperitoneal de cetamina (90 mg/Kg) e xilasina (60 mg/Kg) e, logo após, colocados no aparelho de cirurgia estereotáxica. A hemorragia intracerebral foi induzida por injeção de colagenase tipo VII (Sigma) nas coordenadas referentes ao estriado do animal. A dose de colagenase administrada foi de 0.23 U em 2 µL de solução salina (KIM et al., 2007). Esse projeto está aprovado pela CEUA/FURG sob o número P001/2011.

## 2.2. Grupos experimentais e dosagem.

A boldina foi obtida da Sigma, dissolvida em solução salina e administrada através de uma única injeção intraperitoneal 4 horas após a cirurgia estereotáxica. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos como descrito abaixo:

- 1º GRUPO: Controle + salina (SS)
- 2º GRUPO: Hemorragia + salina (HS)
- 3º GRUPO: Hemorragia + boldina 25 mg/Kg
- 4º GRUPO: Hemorragia + boldina 50 mg/Kg
- 5º GRUPO: Hemorragia + boldina 75 mg/Kg

## 2.3. Preparo das lâminas histológicas.

Ao final de 4 dias após a injeção de boldina, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma dose letal (100 mg/Kg) de pentobarbital sódico. Em seguida o rim e o fígado foram retirados, fixados por um período de 8 horas com formol 10% e posteriormente armazenados em álcool 70%. Os órgãos foram desidratados, emblocados com Paraplast® (Sigma) e cortados a 6 µm em micrótomo. As lâminas resultantes foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise.

## 2.4. Parâmetros avaliados.

**RIM:** Na leitura das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o rim os seguintes quesitos: bem conservado, apresentando corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros; os glomérulos formados por capilares, podócitos, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas. Ainda: cápsula de Bowman íntegra, presença de células cúbicas ou poliédricas, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleo arredondado. Na região medular, analisaram-se as alças de Henle junto aos capilares e túbulos coletores, estes com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico, quando dentro da normalidade (RHODEN et al., 2000; CARVALHO et al., 2007; KUHNEL, 2010).

**FÍGADO:** Já no fígado, foram avaliadas e quantificadas as alterações das seguintes características histológicas: bom estado de conservação, identificação de lóbulos hepáticos íntegros, espaço porta íntegro, presença de necrose e esteatose hepática (RHODEN et al., 2000; CARVALHO et al., 2007; KUHNEL, 2010).

A intensidade das características histopatológicas, para ambos os órgãos, foi expressa em graduações (0 a 3), obtidas através da média de três campos microscópios aleatórios, sendo avaliados em aumento de 200x, considerando-se a seguinte graduação:

- 0: ausência de alterações;
- 1: alterações de intensidade leve (menos de 25% do campo analisado);
- 2: alterações de intensidade moderada (25 a 50 % do campo analisado);
- 3: alterações de intensidade severa (mais de 50% do campo analisado).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto aos fígados estudados, morfologicamente não foram encontradas quaisquer alterações perceptíveis à microscopia óptica em nenhum dos grupos estudados (Tab. 1). Foram visualizados facilmente os lóbulos hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineadas. Os hepatócitos formavam cordões confluentes para a veia centro-lobular (Fig. 1).

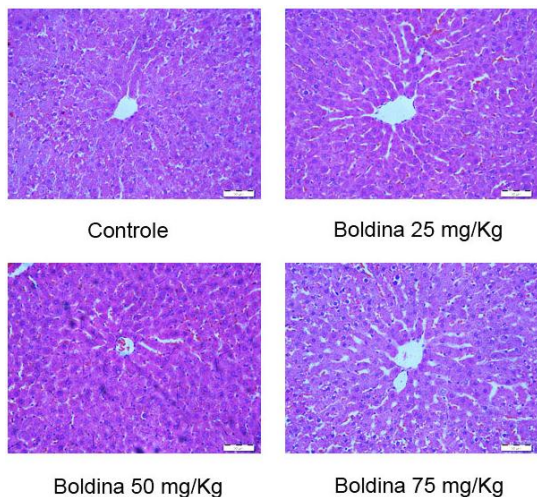


Tabela 1 – Estudo histopatológico de fígado de ratos do grupo controle (SS e HS) e nos diferentes tratamentos com boldina (HB).

TRATAMENTOS	NECROSE	ESTEATOSE
SS	0/9	0/9
HS	0/8	0/8
HB 25	0/8	0/8
HB 50	0/9	0/9
HB 75	0/9	0/9

Figura 1. Lâminas de fígado de ratos mostrando a veia centro-lobular e cordões de hepatócitos no grupo controle e nos diferentes tratamentos com boldina. Coloração: Hematoxilina/eosina, 400X.

Nos rins a morfologia geral do órgão também apresentou padrão de normalidade para a observação em microscopia óptica (Tab.2). Foram visualizados corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais (na cortical), ductos coletores e alça de Henle (na medular) típicos (Fig. 2).

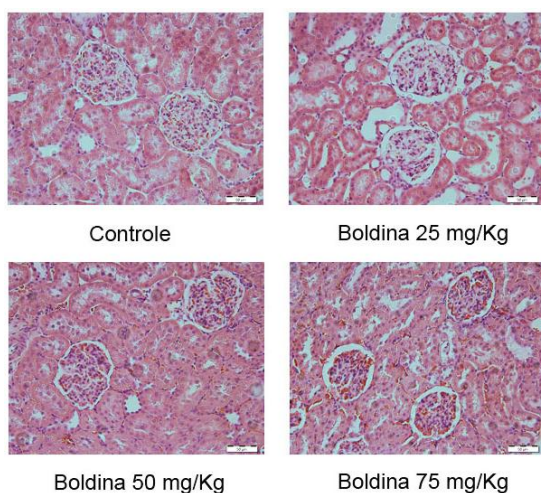


Tabela 2 - Estudo histopatológico de rim de ratos do grupo controle (SS e HS) e nos diferentes tratamentos com boldina (HB).

TRATAMENTOS	CORTEX			MEDULA	
	Cápsula Bowman	Glomérulo	Tubul. Contorc. (prox. e dist.)	Alça Henle	Túbulos coletores
SS	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
HS	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
HB 25	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
HB 50	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
HB 75	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7

Figura 2. Lâminas de rim de ratos mostrando cápsula de Bowman e túbulos contorcidos proximais e distais do grupo controle e nos diferentes tratamentos com boldina. Coloração: Hematoxilina/eosina, 400X.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento sugerem que, nas doses e no modelo estudado, a boldina não induz alterações histopatológicas perceptíveis, sendo, portanto, um potencial fármaco a ser estudado como agente neuroprotetor.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi realizado com o apoio financeiro das agências FAPERGS e CNPq. O apresentador do trabalho recebeu auxílio permanência da FURG durante a realização de seu trabalho.

#### 6 REFERÊNCIAS

CARVALHO, Adelino M.; SIMÕES, Ricardo S.; OLIVEIRA, Fábio H. et al. Análise morfológica dos fígados e rins no binômio materno-fetal após tratamento de ratas prenhez com Ritovanir durante toda a prenhez. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v.29, nº7, 348-353, 2007.

GERHART, D.; HORN, AP.; GAELZER, MM. et al. "Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines". *Invest New Drugs*, Porto Alegre, V. 27, 517-525, 2009.

HORN AP, COMIRAN R, GERHARDT D et al. Boldine prevents the damage caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Manuscrito submetido*.

KIM, JM, LEE, ST, CHU K et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Research*, v. 1183, p.43-50, 2007.

KUHNEL, Wolfgang. *Histologia Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Editora Artmed, 2010.

ROHDEN, Ernani L.; LIMA, Luiz P.; RHODEN, Cláudia R. et al. Análise das alterações histopatológicas dos fígados de ratos pré-tratados com Alopurinol e submetidos à isquemia: reperfusão hepática. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro, v. 27, nº6, 373-377, 2000.

SPEISKY, H.; CASSELS, BK.; "Boldo and Boldine: an emerging case of natural drug development". *Pharmacological Research*. Santiago-Chile, v. 29,1-12, 1994.