



ARTIGO

## Efeito do extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. nos rins de camundongos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758)

Lécio Leone Almeida<sup>1\*</sup>, Diógenes Luís da Mota<sup>2</sup>,  
Luiz Lucio Soares da Silva<sup>2</sup> e Vitória de Cássia Félix de Almeida<sup>3</sup>

Recebido: 26 de setembro de 2010

Recebido após revisão: 03 de outubro de 2012

Aceito: 01 de janeiro de 2013

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1813>

**RESUMO:** [Efeito do extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. nos rins de camundongos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758)]. O propósito do trabalho foi avaliar e quantificar alterações morfológicas de corpúsculos renais e túbulos coletores de camundongos tratados com extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth., planta medicinal distribuída nas regiões da Caatinga e do Serrado do Nordeste do Brasil, utilizada pela população de baixa renda na preparação de infusões para casos de distúrbios renais e prostáticos. Dividiu-se 16 camundongos albinos suíços (*Mus musculus* Linnaeus), machos com idade entre 45 e 60 dias, e peso corpóreo variando de 22 a 32 g, em dois grupos com oito animais cada. O grupo controle recebeu solução salina a 0,9% de NaCl e o grupo experimental recebeu extrato de *Dioclea grandiflora* dissolvido em soro fisiológico (NaCl 0,9%) por sete dias via intraperitoneal. A dosagem do extrato para o tratamento foi de 62 mg/kg, conforme a DL50. Após a eutanásia dos animais, os rins foram seccionados póstero-lateralmente e submetidos à rotina histológica. Para a análise estatística utilizou-se o teste Mann-Whitney e o nível de significância aceito foi  $p < 0,05$ . No estudo histológico foram observadas diferenças estruturais significativas entre os grupos estudados como: hiperemia glomerular; degeneração tubular; desorganização do tufo glomerular e proliferação celular na matriz mesangial. Na análise morfométrica observou-se redução das áreas do diâmetro do corpúsculo renal, glomérulo e espaço subcapsular. Os resultados permitem sugerir que as alterações histopatológicas e histomorfométricas são decorrentes de alterações na magnitude da ação tóxica da planta sobre os componentes renais. Desta forma, a pesquisa demonstra a importância de estudos envolvendo plantas medicinais e seus possíveis efeitos tóxicos.

**Palavras-chave:** toxicidade, morfometria, histopatologia, planta medicinal.

**ABSTRACT:** [Effect of aqueous extract of *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth on kidneys of mice (*Mus musculus* Linnaeus, 1758)]. The purpose of this study was evaluate and quantify morphologic alterations in mice kidneys treated with aqueous extract of *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth., a medicine plant spread along semi wilderness and plateau regions in Northeastern Brazil, utilized by the low income population for preparing infusions on prostatic and renal diseases. Sixteen swiss albino mice (*Mus musculus* Linnaeus) have been divided at the age of about 45 and 60 days, and average weight of 22 to 32 g in two groups of eight animals each. The group control was given a salt solution 0,9% of NaCl and the group experimental was given the *Dioclea grandiflora* aqueous extract dissolved in physiological serum (NaCl 0.9%) during seven days via intraperitoneal. The extract of dosage for the treatment explained above has been 62 mg/kg according to the lethal dosage 50. After the euthanasia of the animals, kidneys have been selected post-laterally and subjected to histological routine. Statistical analysis was conducted using the Mann-Whitney test the accepted level of significance was  $p < 0.05$ . In this histological study it was noticed significant structural differences among groups analyzed as: glomerular hiperemy, tubular degeneration, glomerular tuft disorganization and cell proliferation in the mesangial matrix. In the morphometrical analysis it was observed renal corpuscles area reductions glomerule and subcapsular space. The results enable to suggest histopathologic and morphometrical alterations are due to the magnitude of plant's toxical action on renal components. Therefore the research shows the importance of studies involving medicine plants and their possible toxic effects.

**Key words:** toxicity; morphometry; histopathology, medicinal plant.

### INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde (Elizabetsky 2002).

O conhecimento inadequado da dosagem, da parte da planta empregada e das propriedades terapêuticas das plantas medicinais podem acarretar sérios riscos e provocar danos irreversíveis à saúde (Batista 1993, Matos 1989). Outro aspecto primordial está relacionado com acondicionamento inadequado dessas plantas (Santos *et al.* 1995).

Segundo Chaves *et al.* (1948), *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. é conhecida no Brasil como “mucunã-de-caroco”, “olho-de-boi” ou ainda por mucunã vermelha. É usada, em especial, pelos sertanejos devido as suas propriedades curativas, sendo utilizada pela população de baixa renda na preparação de infusões para doenças renais e prostáticas (Batista 1993). Os primeiros estudos sobre *D. grandiflora* e sua ação tóxica datam do século passado (Chaves *et al.* 1948). Após essa época, poucos estudos, em sua maioria envolvendo aspectos químicos e farmacológicos, foram relevantes para o seu conhecimento e sua aplicabilidade biológica (Bhattacharyya *et al.* 1998, Lemos *et al.* 1999, Moreira *et al.* 1983).

1. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri (URCA). CE, Brasil.

2. Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). PE, Brasil.

3. Departamento de Enfermagem, Universidade Regional do Cariri (URCA). CE, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: lecio\_leone@ymail.com

Dentre os trabalhos realizados com *D. grandiflora*, destacam-se os resultados obtidos com a indução de reação inflamatória cutânea em camundongos, após o uso de lectina isoladas de sementes da planta (Lima *et al.* 1993). Outro estudo faz referência ao perfil da *D. grandiflora* como droga depressora do Sistema Nervoso Central (SNC) e ao seu possível efeito tóxico, o que apresenta um sinal de alerta quanto ao uso popular (Mattei *et al.* 1995).

O efeito vasorrelaxante e vasodilatador da diocleína, flavonóide presente em *D. grandiflora*, foi relatado em ratos (Trigueiro *et al.* 2000), bem como sua indicação para o tratamento de isquemia miocárdica e suas complicações (Almeida *et al.* 2002). Além disso, Almeida *et al.* (2003) verificaram, em ratos e camundongos, efeito analgésico no movimento da cauda, indicando que o extrato hidroalcoólico de sementes de *D. grandiflora* tem uma ação analgésica central destituída de tolerância, efeito típico de drogas opióides.

Embora as pesquisas envolvendo os aspectos químicos e farmacológicos de *D. grandiflora* tenham sido relevantes, os aspectos histopatológicos causados por seus componentes químicos, bem como a avaliação quantitativa dos tecidos e órgãos acometidos por tais componentes são ainda incipientes e escassos. Segundo Pesce (1998), o conjunto de dados quantitativos em morfologia renal, tais como diâmetro, número de glomérulos é um bom começo para validar e reunir critérios objetivos para a determinação de doenças. Além disso, informações importantes com implicações diagnósticas e prognósticas podem ser obtidas por meio da avaliação morfométrica de células e componentes teciduais (Andrea *et al.* 2008).

O propósito deste trabalho foi avaliar e quantificar alterações morfológicas de corpúsculos e túbulos coletores renais de camundongos tratados com extrato da casca do caule de *D. grandiflora*, bem como somar informações importantes sobre sua atividade biológica, contribuindo para a sua introdução terapêutica no futuro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 camundongos albinos suíços machos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), com idade entre 45 e 60 dias e peso variando de 22 a 32 gramas. Estes foram mantidos em sala com temperatura média de 22 °C, em ciclo claro e escuro de 12 horas cada. Todos os animais foram submetidos à dieta padrão do biotério (Purina) e água *ad libitum* durante o período do experimento.

Para extração aquosa da casca do caule de *D. grandiflora*, foram utilizados 100 g de casca, previamente seco e pulverizado, individualizado, ao qual foi adicionado água destilada, submetido à agitação mecânica por 1 h e, em seguida, deixado em repouso por 24 h. Após o período da extração, o extrato foi filtrado, submetido à liofilização e acondicionado no freezer, até o seu uso.

Os grupos experimental (GEx) e controle (GC) foram constituídos cada qual com oito camundongos. O extrato da casca do caule, dissolvido em soro fisiológico (NaCl 0,9%), foi administrado uma vez ao dia por via intrape-

ritoneal, durante sete dias consecutivos. A dosagem do extrato utilizada para o tratamento foi de 62 mg/kg, de acordo com a DL50 (Silva 2003). Os animais do GC receberam volumes equivalentes de solução salina, sendo esses submetidos aos mesmos procedimentos do GEx.

Para a eutanásia dos animais, foi usada a técnica do deslocamento cervical (Mezadri *et al.* 2004). Logo depois, foi feita a tricotomia do ventre e laparotomia. Os rins foram dissecados a olho desarmado, excisados, seccionados medialmente e imersos, imediatamente, em líquido de Bouin, durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos de tecido renal foram lavados em água estilada e processados através de técnica histológica de rotina (Tolosa *et al.* 2003).

Para o estudo morfométrico, foram separados aleatoriamente, de cada lâmina das 30 lâminas por animal do GEx, bem como do GC, oito campos para análise, com captura das imagens e morfometria através do software ImageLab 2000. Os parâmetros aferidos foram a área do corpúsculo renal, área do glomérulo e área do espaço subcapsular.

As comparações estatísticas entre as médias das áreas dos parâmetros aferidos entre GEx e GC foram realizadas através do teste Mann-Whitney utilizando o software estatístico ASSISTAT Versão 7.6 beta, 2012 (Silva 2012). O nível de significância foi estabelecido para uma confiança de 95%.

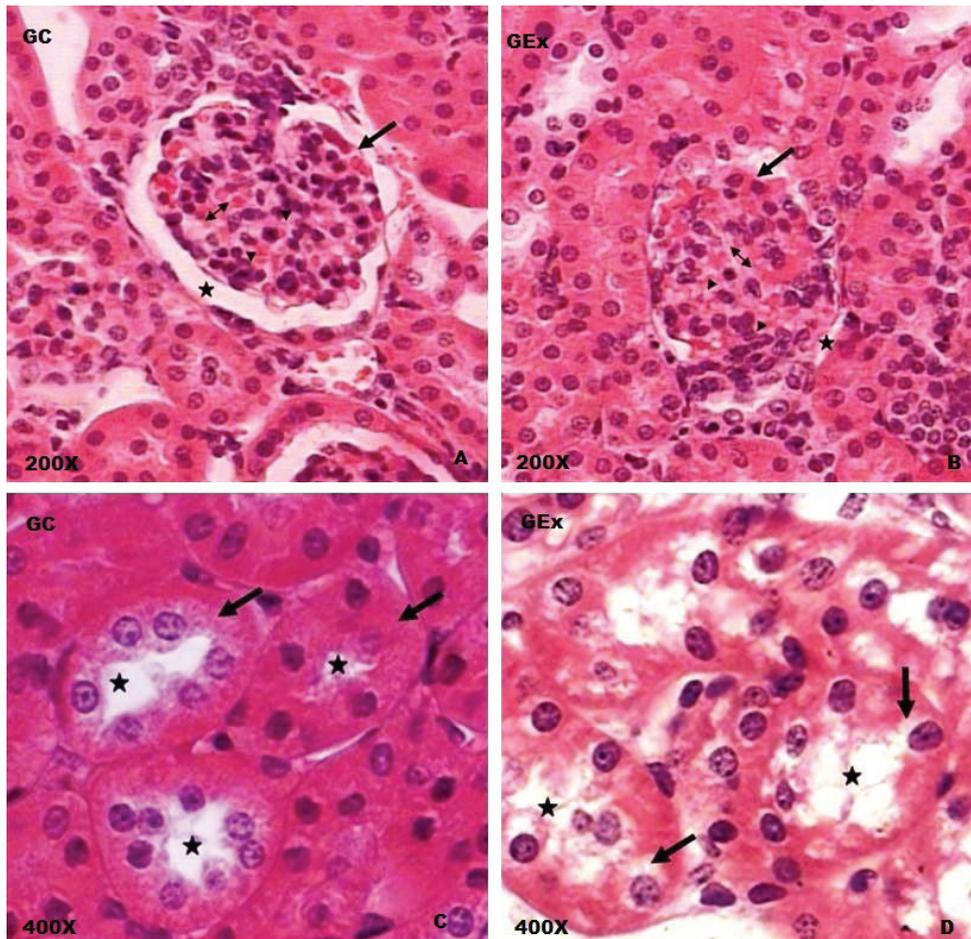
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura científica, estudos sobre a histologia e morfometria renal são abundantes e significativos. Porém, quase não existem estudos histopatológicos e histomorfométricos de rins tratados com produtos extraídos de plantas medicinais, muito menos com extratos de *D. grandiflora*.

Estudos referentes aos efeitos danosos de produtos elaborados a partir de *D. grandiflora* são ainda muito escassos, fato este que dificultou uma análise mais abrangente dos achados histopatológicos e histomorfométricos do presente trabalho.

Algumas pesquisas contribuíram com os nossos resultados, tais como os efeitos tóxicos do extrato aquoso e hidroalcoólico da casca do caule de *D. grandiflora* sobre a histologia dos corpúsculos renais. Estes demonstraram redução do espaço urinário, com pontos de adesão das células mesangiais, infiltração linfocitária no parênquima renal, proliferação mesangial e redução do lúmen dos capilares glomerulares (Silva 2003). Dessa forma, as figuras 1A e 1C representam as principais características estruturais do corpúsculo renal e dos túbulos contorcidos proximal e distal do GC, respectivamente. Podemos observar a integridade de suas estruturas, em especial, do seu espaço subcapsular, enquanto que no GEx, foi reduzido drasticamente (Fig. 1B).

A hiperemia no glomérulo renal observada nos nossos resultados (Fig. 1B) pode ter alguma relação com o efeito vasodilatador de um dos componentes químicos de *D.*



**Figura 1.** Seções histológicas de rins de camundongos tratados com extratos de *Dioclea grandiflora* (GEx, grupo experimental) e não tratados (GC, grupo controle). **A e C.** Grupo controle (GC). Em (A), podem ser observados o espaço subcapsular (estrela), glomérulo (seta), capilares sanguíneos (dupla seta), mesângio (ponta de seta). Em (C), a luz do túbulo (estrela) e o epitélio tubular (seta) com aspectos normais. **B e D.** Grupo Experimental (GEx). São exibidos hiperemia glomerular (seta), espaço subcapsular diminuído (estrela), desorganização dos capilares (dupla seta), proliferação do mesângio (ponta de seta), luz do túbulo parcialmente obstruída por fragmentos citoplasmáticos (estrela) e epitélio tubular vacuolizado (seta). Coloração: HE.

*grandiflora*, a diocleína (Almeida *et al.* 2002, Lemos *et al.* 1999, Trigueiro *et al.* 2000).

De acordo com Mitchell (2005), a hiperemia geralmente expressa um aumento do volume sanguíneo num determinado tecido particular. Dessa forma, observações semelhantes foram apresentadas no estudo da histologia de vários órgãos, além dos rins de bovinos, camundongos, ratos e coelhos intoxicados experimentalmente por *Riedeliella graciliflora* Harms, pertencente a mesma família de *D. grandiflora* (Fabaceae). Os resultados histopatológicos dos rins revelaram nefrose tubular e congestão renal (Riet-Correa *et al.* 2001).

Em relação aos túbulos contorcidos proximal e distal, os resultados apresentaram degeneração e vacuolização citoplasmática no epitélio tubular (Fig. 1D). Resultados similares foram observados em equídeos através do estudo do efeito tóxico da *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). Nesse estudo, foram observados congestão nos rins, com hemorragias na região medular, discreta vacuolização do epitélio tubular, além de processos necróticos (Nobre *et al.* 2004).

Os efeitos de três lectinas extraídas de *Dioclea violacea* Mart. ex Benth., *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth e *D. grandiflora* foram capazes de estimular, *in vivo*, células de nódulos linfáticos em camundongos. A ocorrência de apoptose, inflamação e necrose dos endotélios das vênulas caracterizaram esses estímulos (Barbosa *et al.* 2001).

De acordo com Batista (1993), as sementes de *D. grandiflora* têm sido usadas na medicina popular contra cálculos renais e problemas prostáticos. Estas são preparadas de várias formas: cozidas a modo feijão mulatinho; torradas e lavadas em nove águas, segundo a tradição popular e, ainda, a farinha das sementes apresentavam toxidez. Nas análises histopatológicas, foram identificadas hiperemia e degeneração dos rins e fígado, e degeneração albuminóide dos túbulos contorcidos em ambos os grupos (camundongos e pombos) e diarreia, vômito, perda de peso e morte para o segundo grupo experimental (pombos) (Chaves *et al.* 1948). Esses resultados também contribuíram para o presente trabalho.

Para análise quantitativa, foi utilizado o Software

**Tabela 1.** Medidas (média  $\pm$  DP) das áreas do corpúsculo renal, glomérulo e espaço subcapsular, realizadas em seções histológicas de rins de camundongos tratados com extrato da casca caulinar de *Dioclea grandiflora* (GEx), comparados com as medidas obtidas no grupo controle (GC).

Áreas ( $\mu\text{m}^2$ )	GEx	GC	P*
Corpúsculo renal	3046,1 $\pm$ 426,8	4451,3 $\pm$ 266,0	p<0,05
Glomérulo	2596,5 $\pm$ 309,7	3299,1 $\pm$ 210,8	p<0,05
Espaço subcapsular	186,8 $\pm$ 62,5	808,5 $\pm$ 7,0	p<0,01

\* Valor de probabilidade para o teste Mann-Whitney.

ImageLab. O mesmo proporcionou quantificar as áreas dos corpúsculos renais, glomérulos e espaço subcapsular (Tab. 1). Os parâmetros aferidos apresentaram alterações importantes para a determinação de patologias renais, como a redução da área do espaço subcapsular, bem como insuficiência renal aguda (Silva 2003).

Corroborando com a análise quantitativa, Pesce (1998) assinala que o conjunto de dados quantitativos em morfologia renal é um bom começo para validar os achados científicos. Os métodos quantitativos constituem uma importante ferramenta com a qual são extraídas muitas informações possíveis de espécimes teciduais, além de permitirem reunir critérios objetivos para a determinação de doenças. Esses métodos podem complementar dados moleculares com informações sobre quantidade e localização que são responsáveis pela avaliação estatística.

Finalmente concluiu-se que o tratamento agudo com extrato aquoso da casca do caule de *D. grandiflora* provocou alterações histológicas importantes nos principais componentes renais (corpúsculo renal, glomérulo, espaço subcapsular, túbulos contorcidos proximal e distal). A análise quantitativa das estruturas renais (corpúsculo renal e glomérulo) demonstrou uma redução significativa de suas áreas, principalmente, no espaço subcapsular. Verificamos, adicionalmente, que a utilização do extrato aquoso da casca do caule de *D. grandiflora* provoca lesão renal, expressa sob a forma de atrofia dos corpúsculos renais e, portanto, não deve ser utilizado como tratamento de doenças renais.

Estudos referentes aos efeitos danosos de *D. grandiflora* são ainda muito escassos e os achados histopatológicos e histomorfométricos deste trabalho fornecem uma primeira idéia da dimensão do problema.

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Diógenes Luís da Mota e Luiz Lúcio Soares da Silva, à bióloga e histotecnóloga Fábria Cristiane Melo Leite de Lira e ao histotecnólogo Alex Benício, pela orientação e colaboração durante a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P., CORTES, S. F., FERREIRA, A. J. & LEMOS, V. S. 2002. Increase on the coronary flow induced by Dioclein on isolated rat heart. *Life Sciences*, 70(10): 1121-1128.

ALMEIDA, E. R., ALMEIDA, R. N., NAVARRO, D. S., BHATTACHARYYA, J., SILVA, B. A. & BIRNBAUM, J. S. P. 2003. Central antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1): 1-4.

ANDREA, C. E., BLEGGI-TORRES, L. F. & ALVES, M. T. S. 2008. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 44(1): 51-57.

BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T. B., FREITAS, L. A. R., BARRAL-NETO, M. 2001. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5): 673-678.

BATISTA, J. S. 1993. *Estudo químico e farmacológico da casca das raízes da Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. 85f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 1993.

BHATTACHARYYA, J., MAJETICH, G., JENKINS, T. M., ALMEIDA, R. N. 1998. Dioflorin, a minor flavonoid from *Dioclea grandiflora*. *Journal of Natural Products*, 61(3): 413-414.

CHAVES, N., TEODÓSIO, N. R., LIMA, O. G., PESSOA, W. 1948. *A mucunã vermelha (Dioclea grandiflora Benth) na nutrição*. Recife: JC. 74 p.

ELIZABETSKY, E. 2002. Fitoterapia com base científica. *Ciência Hoje*, 31(182): 78-79.

LEMO, V. S., FREITAS, M. R., MULLER, B., LINO, Y. D., QUEIROGA, C. E. G. & CÔRTEZ, S. F. 1999. Dioclein, a new nitric oxide and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *European Journal of Pharmacology*, 386(1): 41-46.

LIMA, M. S., ALBUQUERQUE, D. A., IBAÑEZ, O. M. & SANT'ANNA O. 1993. Inflammatory cutaneous reaction induced by the lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(4): 599-603.

MATOS, F. J. A. 1989. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: IOCE. 146 p.

MATTEI, R., LEITE, J. R. & TUFIK, S. 1995. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* Martius ex Benth. *São Paulo Medical Journal*, 113(1): 687-92.

MEZADRI, T. J., TOMÁZ, V. A. & AMARAL, V. L. L. 2004. Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis-SC: UFSC. 155 p.

MITCHELL, R. N. 2005. Disfunções hemodinâmicas, doenças tromboembólicas e choque. In: ROBBINS & COTRAN (Ed.) *Patologia – bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier. 1592 p.

MOREIRA, R. A., BARRO, A. C. H., STEWART, J. C. & PUSZTAI, A. 1983. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Planta Heidelberg*, 158: 63-69.

NOBRE, V. M. T., RIET-CORREA, F., BARBOSA FILHO, J. M., DANTAS, A. F. M. & VASCONCELOS, S. J. 2004. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Equídeos no semi-árido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24(3): 132-143.

PESCE, C. 1998. Glomerular number and size: facts and artifacts. *The Anatomical Record*, 251(1): 66-71.

RIET-CORREA, K., GÓRNIK, L. S., HARAGUCHI, M. & DAGLI, M. L. Z. 2001. Histological changes caused by experimental *Riedeliella graciliflora* (Leg. Papilionoideae) poisoning in cattle and laboratory animals. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 21(1): 5-7.

SANTOS, M. G., DIAS, A. G. P. & MARTINS, M. M. 1995. Conhecimento e uso da medicina alternativa entre alunos e professores de primeiro grau. *Revista de Saúde Pública*, 29(3): 221-227.

SILVA, F. A. S. Assistência Estatística - ASSISTAT, 7.6 versão beta, 2012. Departamento de Engenharia Agrícola do CCT – UFCG, Campus I, Campina Grande, PB – Brasil. Disponível em: <<http://assistat.com>>. Acesso em set. 2012.

SILVA, L. L. S. *Aspectos farmacológicos de Dioclea grandiflora Mart. Ex. Benth. (FABACEAE): atividades antimicrobiana, citotóxica e antitumora*. 124f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2003.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A. & FREITAS-NETO, A. G. 2003. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 2. ed. São Paulo: Manole. 331 p.

TRIGUEIRO, F., ALMEIDA, R. N., CORTEZ, S. F. & LEMOS, V. S. 2000. Endothelium-independent vasorelaxant effect of dioclein, a new flavonoid isolated from *Dioclea grandiflora* in the rat aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52: 1431-1434.