

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 21/02/2018.



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**JÉSSICA CRISTINA DOS SANTOS**

“ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA E ESPLÊNICA DO  
EXTRATO DE *Crataegus oxyacantha* EM CAMUNDONGOS:  
ANÁLISES HISTOLÓGICAS”

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**“ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA E ESPLÊNICA DO  
EXTRATO DE *Crataegus oxyacantha* EM CAMUNDONGOS:  
ANÁLISES HISTOLÓGICAS”**

**JÉSSICA CRISTINA DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas: estrutura e função.

*Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro*  
*Co-Orientadora: Dra. Patricia Rosa de Oliveira*

**BOTUCATU – SP**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Jéssica Cristina dos.

Estudo da toxicidade hepática e esplênica do extrato de *crataegus oxyacantha* em camundongos : análises histológicas / Jéssica Cristina dos Santos. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edson Luis Maistro

Coorientador: Patricia Rosa de Oliveira

Capes: 20100000

1. *Crataegus oxyacantha*. 2. Fígado - Doenças. 3. Baço - Doenças. 4. Histologia. 5. Plantas medicinais.

Palavras-chave: Baço; *Crataegus oxyacantha*; Fígado; Histologia.

**JÉSSICA CRISTINA DOS SANTOS**

**“ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA E ESPLÊNICA DO  
EXTRATO DE *Crataegus oxyacantha* EM CAMUNDONGOS: ANÁLISES  
HISTOLÓGICAS”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas: estrutura e função, sob orientação do Prof. Dr. Edson Luis Maistro.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Edson Luis Maistro  
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Marília-SP

---

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias  
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Rio Claro-SP

---

Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos  
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu-SP

Botucatu, 21 de fevereiro de 2017.

*Dedico este trabalho à minha família, especialmente meus pais, Paulo e Tica, que sempre estiveram ao meu lado incentivando e apoiando minhas decisões.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e iluminado meu caminho para concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Paulo Sérgio dos Santos e Benedita Ap. Pereira de Souza Santos, por todo amor e paciência que sempre tiveram, mesmo não entendendo muitas vezes o que lhes falava sobre o meu projeto. Tenham certeza que esta conquista não é só minha, mas de vocês também.

Estendo o agradecimento ao meu irmão Eduardo Luís dos Santos, pelo carinho e atenção que sempre teve comigo, me apoiando em todos os momentos com bons conselhos. E ao meu namorado Bruno Luiz Prandini, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e apoiando pacientemente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luis Maistro, pela oportunidade e confiança em me orientar de longe.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Rosa de Oliveira, pela dedicação e paciência durante estes anos. Você tem minha eterna gratidão e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Camargo Mathias, UNESP, Campus Rio Claro, por disponibilizar o laboratório para que eu pudesse realizar grande parte do meu projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilanda Ferreira Bellini, pela amizade, confiança, incentivo na minha decisão de cursar o mestrado, e me acompanhar ao longo de todo processo.

À minha amiga, Thais Bernardes de Queiroz, que se tornou uma irmã, sendo minha companheira de viagens, sempre apoiando e aconselhando nas minhas decisões.

Aos amigos que fiz durante a pesquisa, pela verdadeira amizade que construímos meu especial agradecimento.

E por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado, meu eterno agradecimento.

## RESUMO

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 75 à 95% da população utiliza a medicina popular para alívio de alguma sintomatologia desagradável. A grande preocupação é que mesmo as plantas medicinais sendo muito utilizadas, não se tem um conhecimento completo sobre sua ação no organismo. A planta *Crataegus oxyacantha*, também conhecida como espinheiro branco ou *Hawthorn*, é originária da Europa, América do Norte e Ásia, foi levada para outros continentes e vem sendo muito utilizada devido a seus potenciais efeitos farmacológicos, como agente cardiotônico, antioxidante, hipolipidêmico, anti-inflamatório, sedativo, entre outros. Considerando a importância da planta *C. oxyacantha* como medicamento alternativo natural e a inexistência de estudos envolvendo a toxicidade celular da mesma; o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos morfo-histológicos do extrato de frutos de *C. oxyacantha* em três grupos de tratamento I (50mg/Kg), II (100 mg/Kg), e III (200 mg/Kg) em células do fígado e baço de camundongos, a fim de avaliar os efeitos citotóxicos do extrato. O fígado dos indivíduos do grupo I não apresentou dano. Os indivíduos do grupo II apresentaram fígado em estágios iniciais de desorganização tissular e citoplasmática. Já aqueles do grupo III sofreram maiores alterações histológicas como extensa desorganização citoplasmática, surgimento de vacúolos e capilares sinusóides aumentados e grande quantidade de células de Kupffer. Por outro lado, o baço não foi modificado histologicamente, após os tratamentos, mantendo sua arquitetura como no grupo controle. Nas análises histoquímicas foi observada alteração apenas no fígado, tanto na quantidade de polissacarídeos quanto de lipídeos. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que o extrato de frutos de *C. oxyacantha* em doses mais elevadas levou a observação de estágios iniciais de desorganização tissular no fígado dos camundongos. Portanto, mais estudos devem ser realizados, já que o conceito popular de que tudo que é natural não faz mal, é contraditório.

**Palavras-chave:** *Crataegus oxyacantha*. Histologia. Fígado. Baço.



## ABSTRACT

Although modern medicine is well developed, according to the World Health Organization, about 75 to 95% of the population uses traditional medicine to relieve some unpleasant symptoms. The major concern is that even medicinal plants being heavily used, there is no complete knowledge about their action in the body. The plant *Crataegus oxyacantha*, also known as white hawthorn or Hawthorn, is native to Europe, North America and Asia, was taken to other continents and has been widely used due to its potential pharmacological effects, such as cardiogenic, antioxidant, hypolipidemic, anti-inflammatory, sedative, among others. Considering the importance of the *C. oxyacantha* plant as a natural alternative medicine and the lack of studies involving its cellular toxicity; the objective of this study was to analyze the morpho-histological effects of *C. oxyacantha* fruit extract in three treatment groups I (50 mg / kg), II (100 mg / kg) and III (200 mg / kg) in liver and spleen cells of mice, in order to evaluate the cytotoxic effects of the extract. The liver of the individuals in group I showed no damage. Individuals in group II presented liver in the early stages of tissue and cytoplasmic disorganization. Already those of group III suffered major histological alterations such as extensive cytoplasmic disorganization, emergence of vacuoles and increased sinusoidal capillaries and large amount of Kupffer cells. On the other hand, the spleen was not histologically modified after the treatments, maintaining its architecture as in the control group. Histochemical analyzes revealed alteration in the liver only, both in the amount of polysaccharides and in lipids. According to the results obtained in the present work it can be concluded that the extract of fruits of *C. oxyacantha* in higher doses led to the observation of the initial stages of tissue disorganization in the liver of the mice. Therefore, more studies must be carried out, since the popular concept that everything that is natural does not hurt, is contradictory.

**Keywords:** *Crataegus oxyacantha*. Histology. Liver. Spleen.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Frutos, folhas e flores de <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	10
<b>Figura 2:</b> I Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	25
<b>Figura 3:</b> II Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	26
<b>Figura 4:</b> Secções histológicas de baço de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	27
<b>Figura 5:</b> III Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	28
<b>Figura 6:</b> IV Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Crataegus oxyacantha</i> .....	9
1.2	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	11
<b>1.2.1</b>	<b>Toxicidade celular: o fígado como alvo de análises histológicas</b> .....	11
<b>1.2.2</b>	<b>Toxicidade celular: o baço como alvo de análises histológicas</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
3.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO.....	15
3.2	ANIMAIS E TRATAMENTOS.....	15
3.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO E BAÇO.....	16
<b>3.3.1</b>	<b>Técnica da hematoxilina de Harris e eosina aquosa</b> .....	16
<b>3.3.2</b>	<b>Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff)</b> .....	17
<b>3.3.3</b>	<b>Técnica do Azul de Bromofenol - Detecção de proteínas totais</b> .....	17
<b>3.3.4</b>	<b>Técnica de Baker – Detecção de lipídeos</b> .....	18
<b>3.3.5</b>	<b>Técnica de Azul de Nilo – Detecção de lipídeos</b> .....	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	19
4.1	ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS.....	19
<b>4.1.1</b>	<b>Histologia do fígado</b> .....	19
<b>4.1.2</b>	<b>Histoquímica do fígado</b> .....	20
4.1.2.1	<i>Detecção de polissacarídeos neutros – Técnica de PAS</i> .....	20
4.1.2.2	<i>Detecção de proteínas – Técnica do Azul de Bromofenol</i> .....	21
4.1.2.3	<i>Detecção de lipídeos – Técnica de Baker</i> .....	21
4.1.2.4	<i>Detecção de lipídeos – Técnica de Azul de Nilo</i> .....	22
<b>4.1.3</b>	<b>Histologia do baço</b> .....	22
<b>4.1.4</b>	<b>Histoquímica do baço</b> .....	23
4.1.4.1	<i>Detecção de polissacarídeos neutros – Técnica de PAS</i> .....	23
4.1.4.2	<i>Detecção de proteínas – Técnica do Azul de Bromofenol</i> .....	24
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, cerca de 70 a 95% da população mundial faz uso de terapias tradicionais, com emprego de plantas medicinais, no alívio de alguma sintomatologia desagradável (FONSECA; PEREIRA, 2004; BRASIL, 2006; GONÇALVES et al., 2013). Segundo Tomazzoni e colaboradores (2006) este fato pode estar relacionado com o elevado custo de medicamentos industrializados, falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica e, tendência em utilizar produtos de origem vegetal.

A utilização de plantas medicinais é uma das práticas mais antigas realizadas pelo homem, sendo muito difundida até hoje em todo o planeta, devido ao fato de possuírem muitas propriedades biológicas e farmacológicas (HOSSEINIMEHR, 2014).

A grande preocupação é quanto a toxicidade dos medicamentos preparados a base de plantas, pois mesmo sendo naturais, podem desencadear várias reações adversas, devido à interação com outros medicamentos e até mesmo alimentos (BALBINO; DIAS, 2010).

Em virtude disso, no Brasil, em 2006, foi criado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que constitui parte essencial das Políticas de Saúde Pública, e tem como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2009).

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Crataegus oxyacantha*

*Crataegus* é um gênero da planta pertencente à família Rosaceae, e possui aproximadamente 280 espécies, sendo as mais comuns *C. monogyna* e *C. oxyacantha*. É originária da Europa, América do Norte e oeste da Ásia, mas também é encontrada em outros continentes, como o sulamericano.

A *C. oxyacantha* é um arbusto ou pequena árvore que pode alcançar 5 metros de altura, suas folhas são compridas e apresentam uma tonalidade verde escura brilhante na parte superior, e mais clara na parte inferior (COSTA, 2011; LAKSHMI; GEETHA; ROY, 2012). Conhecida popularmente como espinheiro branco ou *Hawthorn* (Inglaterra), que faz referência aos numerosos espinhos encontrados na planta e suas flores brancas (ALONSO, 1998), que na primavera formam grandes cachos, e no

outono se transformam em pequenos frutos globosos vermelho brilhantes com uma a três sementes em seu interior (WEIHMAJR; ERNST, 1996).



Figura 1 - Frutos, folhas e flores de *Crataegus oxyacantha*  
Fonte: LAKSHMI; GEETHA; ROY (2012).

A planta vem sendo utilizada principalmente para tratar distúrbios cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca, angina pectoris, e hipertensão, além de outras propriedades como para atividade hipolipidêmica, antioxidante, anti-inflamatória, digestiva e sedativa (NASCIMENTO et al., 2009).

Seus frutos têm sido usados já há muito tempo como diurético, para a dispnéia e cálculo renal. Também há estudos que mostram seus efeitos sedativos e ansiolíticos (RIGELSKY; SWEET, 2002). Contudo, a maioria dos estudos farmacológicos nesta espécie fornecem evidências de suas propriedades cardiotônicas (WANG et al., 2013). Lakshmi e colaboradores (2012), relatam em seu estudo que os frutos de *Hawthorn* melhoram a circulação do coração, assegurando o uso em um tratamento de insuficiência cardíaca.

As plantas possuem em sua composição substâncias denominadas metabólitos, que se dividem em: metabólitos primários (lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos) e secundários (taninos, alcalóides, flavonóides, glicosídeos) (NIERO; 2003). Os metabólitos secundários por muito tempo foram considerados produtos de excreção (LORA, 2007), porém, hoje, apresentam uma atividade antioxidante significativa e cardiovascular protetiva, atribuída principalmente à sua composição química, rica em flavonóides, particularmente proantocianidinas oligoméricas (PCOs), que estão concentradas nas folhas, frutos e flores e são responsáveis pelos pigmentos que dão cores aos frutos (HOSTANSKA et al., 2007), tornando-a uma poderosa planta

adjuvante da terapêutica cardiovascular, ao aumentar o fluxo sanguíneo coronário através da indução do relaxamento das artérias (COSTA, 2011). Alguns estudos têm mostrado que o extrato reduz o estresse oxidativo no miocárdio após reperfusão e parece inibir a apoptose, resultando em um efeito cardioprotetor (JAYALAKSHMI et al., 2004/2006).

## 1.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A histologia é a ciência que estuda as células no contexto da estrutura tecidual e a inter-relação delas com os constituintes da matriz extracelular. A histoquímica é uma técnica histológica que tem como objetivo identificar a natureza química dos constituintes celulares. Consiste na coloração específica desses constituintes, recorrendo basicamente a substâncias que, ao reagirem com os componentes celulares, darão origem a produtos corados (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Assim, as técnicas histológica e histoquímica podem ser usadas para determinar o potencial citotóxico de compostos naturais e químicos, a serem avaliados quanto ao dano que este poderá causar aos órgãos.

### 1.2.1 Toxicidade celular: o fígado como alvo de análises histológicas

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo dos vertebrados, se encontra na cavidade abdominal, abaixo do diafragma e protegido pelo arcabouço costal. Recebe, ainda, grande quantidade de sangue da veia porta (75% do volume aferente sanguíneo), que transporta todo o sangue do trato digestório, do baço e do pâncreas, e da artéria hepática, fornecendo 25% do sangue oxigenado para o fígado através das artérias interlobar e interlobular antes de atingir o espaço porta (KIERSZENBAUM, 2004). Apoiando-se nessa peculiaridade, de duplo suprimento sanguíneo, o fígado é um órgão complexo, e está em posição privilegiada para executar suas funções: recebe grande variedade de substâncias endobióticas e nutrientes decorrentes da absorção intestinal, além de ser exposto às substâncias tóxicas (SOLTER, 2005; ROSS; PAWLINA, 2008).

Além de sua constituição principal que são os hepatócitos, que se agrupam em placas formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos, o fígado é composto também por células biliares, células de Kupffer, células de Ito (células estreladas), e células armazenadoras de gordura (THOOLEN et al., 2010).

Devido a sua localização e também por ser o órgão onde ocorre a maior parte das reações metabólicas, é o primeiro que sofre os impactos da ação de compostos tóxicos (FERREIRA et al., 2012). As lesões graves de fígado são a principal causa de retirada de medicamentos do mercado norte-americano, sendo responsável por mais de 50% dos casos de insuficiência hepática nos Estados Unidos (LEE, 2003; HARDISTY; BRIX, 2005).

Sendo assim, a utilização de técnicas histológicas e histoquímicas tem sido muito útil no sentido de fornecer dados de toxicidade celular de um fármaco ou produto químico em diversos órgãos, principalmente o fígado (HARDISTY; BRIX, 2005; FERREIRA et al., 2011; 2012; ROMA et al., 2012). Por esta razão, estas metodologias foram utilizadas complementarmente na avaliação do potencial citotóxico da ingestão do extrato de frutos de *C. oxyacantha* no presente estudo.

### **1.2.2 Toxicidade celular: o baço como alvo de análises histológicas**

O baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo dos mamíferos, possuindo cerca de um quarto dos linfócitos do organismo (BALOGH; HORVATH; SZAKAL, 2004), e atua como importante reservatório de sangue, podendo, quando solicitado e sob ação das catecolaminas, elevar o hematócrito em até 10% do seu valor normal (LIPOWITZ; BLUE, 1998). É um órgão de consistência mole, bem vascularizado, está localizado no lado esquerdo do abdome adjacente à grande curvatura do estômago. É alongado, e apresenta forma piramidal quando visto em corte transversal. Possui em uma de suas faces um hilo por onde entram e saem os vasos sanguíneos que irrigam o órgão, e muitos nódulos linfóides, espalhados por toda sua extensão (AGUIAR et al., 2008).

É revestido externamente por uma cápsula conjuntiva associada a fibras elásticas em roedores e uma fina camada de músculo liso que se projeta para o interior do parênquima formando trabéculas, as quais dividem o órgão em compartimentos incompletos. O parênquima não apresenta regiões de córtex e medula, entretanto, apresenta dois compartimentos distintos, a polpa vermelha e a polpa branca (CESTA, 2006).

A polpa vermelha é formada por cordões esplênicos circundados por capilares sinusóides (cordões de Billroth) contendo linfócitos B e T, plasmócitos e macrófagos, sustentados por uma fina rede de fibras e células reticulares. Estes cordões atuam como

um filtro de sangue onde hemácias velhas são destruídas pelo processo de hemocaterese, além de participar na defesa do organismo contra micro-organismos (CESTA, 2006).

A polpa branca é formada por três sub-regiões: a bainha linfóide periarteriolar, nódulos linfóides, e zona marginal. Na zona marginal são observados linfócitos, macrófagos e células dendríticas que atuam diretamente sobre antígenos oriundos da circulação sanguínea, iniciando a resposta imunológica (DIJKSTRA; VEERMAN, 1990).

O baço está envolvido em todas as inflamações sistêmicas, e sob condições de estresse pode apresentar depleção de células linfocíticas, congestão e necrose de células retículo - endoteliais (TEH et al., 1997; PEREIRA BITTENCOURT et al., 1999). Dessa forma, o estudo histopatológico do baço pode atuar como ferramenta biomarcadora de impacto ambiental uma vez que as possíveis alterações podem estar diretamente associadas ao estado de saúde desses animais (GARCIA-ABIADO et al., 2004).



## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados das análises histológicas e histoquímicas obtidos no presente trabalho, avaliando a potencial citotoxicidade do extrato de frutos de *C. oxyacantha* no tecido hepático e no baço de camundongos, pode-se concluir que as doses mais elevadas do extrato levaram a observação de estágios iniciais de desorganização citoplasmática nas células hepáticas, tais como, presença de hepatócitos com citoplasma mais acidófilo, surgimento de pequenos vacúolos, aparecimento de espaços intercelulares, aumento do lúmen dos capilares sinusóides e aumento de células de defesa do tecido hepático (células de Kupffer). Nas células do baço não foram detectadas alterações morfológicas distinguíveis. Os indícios de citotoxicidade hepática observados no presente estudo, somados as recentes observações de genotoxicidade relatadas na literatura, indicam que o extrato de frutos de *C. oxyacantha* deve ser usado com cautela pela população humana, evitando-se a administração de elevadas doses e/ou uso contínuo do mesmo.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, G.L.M. et al. Anatomic study of the splenic artery segmentation. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 311-314, 2008.

AKELA, M.; DEVARAJ, H. Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 49, p.173-177, 2008.

ALONSO, J. R. “**Tratado de fitomedicina – bases clínicas e farmacológicas**”. Editora Isis, 1998. Disponível em: <[http://www1.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/sec\\_saude/fitoterapia/publicacoes/crataegus.pdf](http://www1.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/sec_saude/fitoterapia/publicacoes/crataegus.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2017.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular. In:\_\_\_\_\_. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: EPSJV, v. 2, p. 215-253, 2010.

BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, London, v. 87, p.441-470, 1946.

BALBINO, E. E.; DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 6, 2010. (<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000031>)

BALMER, M. L. et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 6, n. 237, p. 237- 266, 2014.

BALOGH, P.; HORVATH, G.; SZAKAL, A. K. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 52, 1287–1298, 2004

BONI, A.P.; ZENI, A. L. B.; ALBUQUERQUE, C.A.C. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* em camundongos inoculados experimentalmente com veneno botrópico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 92, n. 3, p. 176-185, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**, Brasília, DF, 2006. (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa\\_nacional\\_plantas\\_mediciniais\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_mediciniais_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 09 jan. 2017.

BRAUNBECK, T. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics— Structural biomarkers of environmental contamination. In: **BRAUNBECK, T., HINTON, D. E., STREIT, B., editors. Fish ecotoxicology**. Birkhauser: Berlim. 1998. p. 61–140.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 34, p. 455–465, 2006.

COSTA, J. F. S. **Crataegus sp., uma planta com interesse terapêutico**. Dissertação para Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, 49 fls. Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Porto, 2011.

CUI, T. et al. Polyphenolic content and physiological activities of Chinese hawthorn extracts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v. 70, n. 12, p. 2948-2956, 2006.

DIJKSTRA, C. D.; VEERMAN, A. J. P. Normal Anatomy, Histology, Ultrastructure, Rat. In: **Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Hemopoietic System** (T. C. Jones, J. M. Ward, U. Mohr and R. D. Hunt, editors). Springer-Verlag: Berlim, 1990. p. 185–93.

DOI, T.; NAGAI, H.; TSUKUDA, R. SUZUKI, T. Dose-response relationships of cytotoxicity, PFC response and histology in the spleen in rats treated with alkylating agents. **Toxicology**, Amsterdam, v. 107, p. 47-60, 1996.

FERREIRA, M. et al. Fipronil (active ingredient of acaricide Frontline) acting on the mice thyroid. **Microscopy Research and Technique** (in press), New York, v. 75, p. 265-270, 2011.

FERREIRA, M. et al. Action of the Chemical Agent Fipronil (Active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: an ultrastructural analysis. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, p.197-205, 2012.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, Brasília, DF, v.16, n. 7-8, p.51-54, 2004.

GARCIA-ABIADO, M. A. et al. Effect of diets containing gossypol on blood parameters and spleen structure in tilapia, *Oreochromis* sp., reared in a recirculating system. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, p. 359–368, 2004.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas colorido de histologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 432 p.

GOLDSCHNEIDER, I.; MCGREGOR, D. D. Anatomical distribution of T and B lymphocytes in rat. Development of lymphocyte-specific antisera. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 138, p. 1443-1465, 1973.

GONÇALVES, N. M. T. et al. Políticas de saúde para a fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 18, n. 4, 2013.

- GREAVES, P.; FACCINI, J. M. Haemopoietic and lymphatic systems. In: **Rat Histopathology. A Glossary for Use in Toxicity and Carcinogenicity Studies**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 43-66.
- HAMZA, R. Z.; AL-HARBI, M. S. Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou v.5, n.7, p.521–531, 2015. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.03.011>)
- HARDISTY, J. F.; BRIX, A. Comparative hepatic toxicity: Prechronic/Chronic liver toxicity in rodents. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 33, p. 35-40, 2005.
- HOSSEINIMEHR, S. J. Beneficial effects of natural products on cells during ionizing radiation. **Reviews on Environmental Health**, Tel Aviv, v. 29, n. 4, p. 341–353, 2014. (<http://dx.doi.org/10.1515/reveh-2014-0037>).
- HOSTANSKA, K. et al. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. **Cancer Detection and Prevention**, New York, v. 31, p. 129-139, 2007.
- JAYALAKSHMI, R.; DEVARAJ, S. N. Cardioprotective effect of tincture of *Crataegus* on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 56, n. 7, p.921–926, 2004.
- JAYALAKSHMI, R.; THIRUPURASUNDARI, C. J.; DEVARAJ, S. N. Pretreatment with alcoholic extract of shape *Crataegus oxyacantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol—induced myocardial infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 292, n. 1-2, p. 59–67, 2006.
- JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, New York, v. 14, n. 10, p. 996- 1006, 2013.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Textos e Atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12º ed, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1983. p.48–81.
- KAO, E. S. et al. Anti-inflammatory potential of flavonoid contentes from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 430-436, 2005.
- KASHAP, C. P.; ARYA, V.; THAKUR, N. Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxyacantha* Linn – A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, p. S1184-S1199, 2012.
- KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.310-501.

- KUMARARATNE, D.S.; BAZIN, H.; MACLENNAN, I.C.M. Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 11, p. 858-864, 1981.
- LAKSHMI, T.; GEETHA, R. V.; ROY, A. *Crataegus oxyacantha* Linn. Commonly known as Hawthorn – A scientific review. **International Journal of Pharm Tech Research**, India, v. 4, n. 1, p. 458-465, 2012. Disponível em: <[http://sphinxesai.com/2012/pharm/PHARM/PT=64\(458-465\)JM12.pdf](http://sphinxesai.com/2012/pharm/PHARM/PT=64(458-465)JM12.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- LEE, W. M. Drug-induced hepatotoxicity. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 349, p. 474–485, 2004.
- LIPOWITZ, A.J.; BLUE, I. Baço. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. v.1, São Paulo: Manole, 1998. p.1143-1153.
- LISON, L. **Histochimie et Cytochimie Animales**. Gauthier-Villars, E ´diteur, Paris, 1960.
- LONG, S. R. et al. Effect of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 13, p. 643-650, 2006.
- LORA, J.; CAMPOS, L. C. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE)**. Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais. 59fls. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.
- NASCIMENTO, D. F. et al. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, mar. 2009 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2009000200014&lng=pt&nrn=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000200014&lng=pt&nrn=iso)>. Acesso em: 27 nov. 2016.
- NIERO, R. et al. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos**. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, p. 239, 2003.
- OLIVEIRA, P. R. et al. Cytotoxicity of Fipronil on Mice Liver Cells. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, p. 28–35, 2012.
- OLIVEIRA, A. M. et al. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 194, p.162–168, 2016. (DOI: 10.1016/j.jep.2016.09.004)
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and applied**. London: Churchill. p.530, 1985.

- PEREIRA BITTENCOURT, M. et al. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Research**, Athens, v. 19, n.5B, p. 4023-4025, 1999.
- QUADROS, A.P. et al. Fruit extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* exerts genotoxic and mutagenic effects in cultured human cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, part A. 2017. in press.
- RIGELSKY, J. M.; SWEET, B. V. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Bethesda, v. 59, n. 5, p. 417–422, 2002.
- ROMA, G. C. et al. Cytotoxic effects of permethrin on mouse liver and spleen cells. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, n. 2, p. 229-238, 2012.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia em correlação com biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 427-594.
- SALAM, O. M. E.; SLEEM, A. A.; SHAFEE, N. Hepatoprotective effects of *Cynara* extract and silymarin on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 23, n. 3, p.709-16, 2014.
- SCHLEGELMILCH, R.; HEYWOOD, R. Toxicity of *Crataegus* (hawthorn) extract (WS1442). **Journal of the American College of Toxicology**, United States, v. 13, p. 103-111, 1994.
- SOKÓL-LETOWSKA, A.; OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 853-859, 2007.
- SOLTER, P. F. Clinical pathology approaches to hepatic injury. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 33, p. 9-16, 2005.
- TADIC, V. M. et al. Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.56, p. 7700–7709, 2008.
- TASSEL, M. et al. Hawthorn (*Crataegus* spp.) in the treatment of cardiovascular disease. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 4, n. 7, p. 32-41, 2010.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 37, 51-70, 1997.
- THOOLEN, B. et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v.38, p. 5S-81S, 2010.
- TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto & Contexto Enfermagem**, v.15, n.1, p.115-21, 2006.

WANG, J.; XIONG, X.; FENG, B. Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013; Article ID 149363, 16 pages, 2013. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/149363>).

WEIHMAYR, T.; ERNST, E. Therapeutic effectiveness of *Crataegus*. **Fortschritte der Medizin**, Munchen, v. 114, p. 27–29, 1996.

ZHANG, F.S. et al. Evaluation of cadmium and other metal losses from various municipal wastes during incineration disposal. **Environmental Pollution**, Barking, v.115, p. 253–260, 2001.