



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^a. Dr^a. Patrícia Rosa de Oliveira, pela dedicação e paciência durante estes anos. Você tem minha eterna gratidão e amizade.

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

À Prof^a. Dr^a. 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

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

SUMÁRIO

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

2. OBJETIVOS

Considerando a potencial importância da planta *C. oxyacantha* como medicamento alternativo natural para seres humanos, e a inexistência de estudos envolvendo a potencial toxicidade celular do extrato de frutos da mesma, o presente estudo foi elaborado visando:

Analisar os efeitos morfo-histoquímicos de diferentes doses do extrato de frutos de *C. oxyacantha* no tecido hepático e esplênico de camundongos a ele expostos, a fim de avaliar os efeitos citotóxicos deste extrato, utilizando técnicas histológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Os frutos de *C. oxyacantha* foram coletados na Turquia e adquiridos por distribuidora certificada no Brasil. Uma excicata foi enviada ao Laboratório de Fitofármacos da Universidade de Alfenas, UNIFENAS, Minas Gerais, Brasil, com o número LFF00297. Frutos frescos de *C. oxyacantha* foram secos e a extração realizada a temperatura ambiente com metanol a 70%. O macerado foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida, utilizando um evaporador rotativo, fornecendo então um extrato metanólico bruto.

Para determinação química, o extrato a 70% foi analisado usando cromatografia líquida ligada a um detector de massa. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna C18 (100 x 2,1 milímetros, 1,7 milhões de metros cúbicos, temperatura de 30 °C, com volume de injeção de 2 mL).

O extrato de frutos de *C. oxyacantha* foi obtido pelo farmacologista colaborador desta pesquisa, Dr. Fábio Ferreira Perazzo, da UNIFESP de Diadema, Estado de São Paulo, Brasil. O mesmo também foi responsável pela caracterização fitoquímica do extrato através da cromatografia líquida (QUADROS et al., 2017, in press).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP, Campus de Marília, estando registrado com o número 0839/2013.

3.2 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos albinos suíços machos de 12 semanas de idade (*Mus musculus*), pesando 25-30 g. Os animais foram adquiridos na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil, e alojados em caixas de polietileno em clima controlado (25 ± 4 ° C, $55 \pm 5\%$ de umidade) com 12 h ciclo claro/escuro (7:00 da manhã a 7:00 da tarde). Os alimentos (Nuvilab CR1, Nuvital) e água estavam disponíveis *ad libitum*.

Os camundongos foram divididos em 4 grupos experimentais de 6 animais cada. O grupo controle negativo recebeu 0,3 mL de água destilada por gavagem. Nos grupos de tratamento, o extrato de frutos de *C. oxyacantha* foi dissolvido em água destilada e administrado a uma dose de 0,3 mL por gavagem, durante sete dias consecutivos e com

intervalo de 24 h, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg / kg de peso corporal. Estas doses foram selecionadas com base nas doses eficazes anti-inflamatórias relatadas por Tadic et al. (2008). Nestas doses, os animais não apresentaram sinais de toxicidade, tais como alterações locomotoras, diarreia ou piloereção.

Os animais utilizados neste estudo foram sacrificados. O Comitê de Bioética Animal da Faculdade de Medicina de Marília (CEP / FAMEMA, Marília, Estado de São Paulo, Brasil) aprovou o presente estudo em 31 de janeiro de 2013 (protocolo número 1661/12), de acordo com as legislações federais sobre cuidados com animais.

3.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO E DO BAÇO

3.3.1. Técnica da hematoxilina de Harris e eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Esta metodologia foi desenvolvida com a colaboração da Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias e Dra. Patrícia Rosa de Oliveira, especialistas na mesma e pesquisadoras da UNESP, Campus de Rio Claro, SP.

Dos 6 animais de cada grupo que foram submetidos à eutanásia após os 7 dias de tratamento com o extrato, foram retiradas frações do fígado (lobo direito) e do baço, que foram depositadas em solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L). Esse tempo de tratamento foi baseado nos trabalhos de Ferreira et al. (2011; 2012). Em seguida, os órgãos foram fixados por 24 horas em paraformaldeído 4%. E logo após, o material foi transferido para solução tampão fosfato de sódio onde permaneceu por mais 24 horas.

Foi feita, então, a desidratação em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95%. Cada banho teve a duração de 30 minutos. Em seguida, o material foi embebido em resina Leica por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo resina Leica mais polimerizador.

No presente estudo, os blocos foram seccionados em micrótomo para a obtenção de cortes com espessura de 3 µm, e recolhidos em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo os fragmentos do fígado e do baço dos animais dos grupos de tratamento e controle foram coradas pela hematoxilina durante 5 minutos, depois lavadas por 5 minutos em água corrente, coradas com eosina aquosa durante 5 minutos e lavadas novamente em água corrente.

Após secagem ao ar livre, em suportes de madeira, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, montadas com bálsamo do Canadá e recobertas com lamínula.

As lâminas obtidas foram examinadas e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-50.

3.3.2 Técnica do PAS (ácido periódico- Schiff) – Detecção de Polissacarídeos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Para a detecção de polissacarídeos foi realizada a reação de PAS. Fragmentos dos fígados e baços foram fixados em Bouin aquoso por cinco dias. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 15 minutos cada. Logo após foram transferidos para resina de embebição, inclusos em historesina (*HistoResin*, Leica) e seccionados com 3 µm de espessura. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Logo após foram lavadas em água destilada por 1 minuto e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Após esta etapa as secções foram lavadas por 30 minutos em água corrente, secas em temperatura ambiente e montadas em bálsamo do Canadá para posterior observação e foto documentação em microscópio de luz LEICA DM750.

3.3.3. Técnica do Azul de Bromofenol - Detecção de Proteínas Totais (PEARSE, 1985).

Fragmentos dos fígados e baços foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em resina (JB-4 Polaron Instruments/Bio Rad) por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador. Após esse processo, os blocos foram seccionados em micrótomo Sorvall JB-4/Bio Rad, com secções de 3 µm de espessura, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas foram coradas com solução de azul de bromofenol por duas horas à temperatura ambiente. Após serem lavadas com ácido acético 0,5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos, as

mesmas passaram rapidamente por solução de álcool butílico terciário. A seguir, foram secas ao ar livre, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá, para posterior documentação fotográfica em microscópio de luz LEICA DM750.

3.3.4. Técnica de Baker - Detecção de Lipídios (BAKER, 1946).

Os fragmentos dos fígados e baços foram fixados em formol cálcio por 15 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em resina (JB-4 Polaron Instruments/Bio Rad) por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador. Após esse processo, os blocos foram seccionados em micrótomo Sorvall JB-4/Bio Rad, com secções de 3 μm de espessura, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram tratadas por 18 horas com bicromato de cálcio. Após lavadas em água destilada, permaneceram durante 5 horas em solução de hemateína. Logo depois, procedeu-se a última lavagem com água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina e recobertas com lamínula para posterior documentação fotográfica em microscópio de luz LEICA DM750, para detecção de lipídeos totais.

3.3.5. Técnica de Azul de Nilo - Detecção de Lipídeos (LISON, 1960).

Fragmentos dos fígados e baços dos animais foram fixados em formol cálcio por 15 horas. Para este teste histoquímico, todas as lâminas do fígado e baço foram coradas com azul de Nilo por 10 minutos em 37°C. Após lavadas em água destilada, permaneceram no ácido acético 1% por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina e recobertas com lamínula, para detecção de lipídeos e ácidos neutros.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISES HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

4.1.1 Histologia do fígado

- Grupo Controle

Os resultados obtidos por meio de técnicas histológicas revelaram que os fígados dos animais dos grupos controle apresentam-se como descrito na literatura, com hepatócitos poligonais formando placas anastomosadas (Figs. 2A, 2B). Cada hepatócito apresenta um ou dois núcleos arredondados, fortemente corados pela hematoxilina e localizados na região central. A presença de um ou dois nucléolos, bem como de um citoplasma pouco acidófilo, também pode ser observada (Figs. 2A, 2B).

Entre as placas de hepatócitos são encontrados os capilares sinusóides (Figs. 2A, 2B). A parede desses capilares é revestida pelas células de Kupffer (Fig. 2), observadas na microscopia de luz, principalmente pelos seus núcleos alongados ou triangulares e fortemente corados (Fig. 2).

- Grupo I (50 mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O fígado dos animais do grupo I, que foram tratados com 50 mg/Kg do extrato de *C. oxyacantha*, não apresentaram alterações histológicas em comparação àqueles do grupo controle. Os hepatócitos, os capilares sinusóides e as células de Kupffer continuam apresentando as mesmas características (Figs. 2C, 2D).

Os indivíduos do grupo II, tratados agora com 100 mg/Kg do extrato, apresentam fígado em estágios iniciais de desorganização tissular e citoplasmática (Figs. 2F-J). As alterações são caracterizadas pela presença de hepatócitos com citoplasma mais acidófilo, capilares sinusóides aumentados e principalmente pelo grande aumento do número de células de Kupffer (Figs. 2F-J).

O fígado dos animais do grupo III, tratados com 200 mg/Kg do extrato, exibem maiores alterações histológicas em comparação com o grupo controle, pois apresentam extensa desorganização tissular. (Figs. 3A-E).

Já as células de Kupffer continuam em grande quantidade como no grupo II, reconhecida pelos seus núcleos achatados e fortemente corados entre as placas hepáticas

(Figs. 3A-E), inclusive hipertrofiados (maiores do que aqueles dos grupos anteriores), sugerindo que as mesmas estejam ativas (Figs. 3A-E).

Quanto aos capilares sinusóides, a luz desses vasos é ampla e repleta de grande quantidade de células sanguíneas vermelhas (hemácias) (Figs. 3A-E).

4.1.2 Histoquímica do fígado

4.1.2.1 Detecção de polissacarídeos neutros – Técnica do PAS

- Grupo Controle

A aplicação do PAS revela a presença de polissacarídeos no fígado dos indivíduos do grupo controle (Figs. 3F-G), demonstrada por uma granulação grosseira positiva distribuída por todo o citoplasma dos hepatócitos, mas com certa preferência pelas regiões periféricas dos núcleos (Figs. 3F-G).

Esta técnica não é específica para demonstração de núcleo, assim as células de Kupffer (identificadas na microscopia de luz pelo núcleo) não são observadas, nem o núcleo dos hepatócitos (Figs. 3F-G).

O lúmen dos capilares sinusóides e dos grandes vasos sanguíneos ou não reagem ou reagem fracamente ao teste (Figs. 3F-G).

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O fígado dos indivíduos do grupo I apresenta mesma resposta à reação ao PAS que aqueles do grupo controle, ou seja, granulação grosseira positiva distribuída por todo o citoplasma dos hepatócitos, mas com certa preferência pelas regiões periféricas dos núcleos (Figs. 3H-I).

No fígado dos animais do grupo II, a marcação dos polissacarídeos foi menos intensa quando comparado àqueles do grupo controle. O fígado dos animais submetidos a este tratamento apresenta reação fracamente positiva e homogênea por todo o órgão (Figs. 3J; 5A).

O fígado dos indivíduos do grupo III apresenta regiões com moderada positividade e regiões com forte positividade. As regiões centrais reagem fortemente, enquanto que as regiões periféricas do órgão reagem moderadamente, ou seja, menos

intensamente à medida que se aproxima das regiões mais periféricas do órgão (Figs. 5B-D).

4.1.2.2 Detecção de proteínas – Técnica do azul de bromofenol

- Grupo Controle

A técnica do azul de bromofenol detectou a presença de grande quantidade de proteínas em todas as regiões do fígado nos indivíduos do grupo controle (Fig. 5E), o que é evidente pela forte reação positiva do citoplasma, do núcleo tanto dos hepatócitos quanto das células de Kupffer, bem como a luz dos capilares sinusóides.

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O fígado dos indivíduos tratados com 50mg/Kg, 100 mg/Kg e 200 mg/Kg de extrato apresenta forte positividade assim como encontrada nos indivíduos do grupo controle, devido à grande quantidade de proteínas. No grupo III, mesmo com a detecção de alterações histológicas, como o aumento das células de Kupffer. Dessa forma, até mesmo neste grupo, não ocorre redução na quantidade de proteínas (Figs. 5F-D).

4.1.2.3 Detecção de lipídios – Técnica de Baker

- Grupo Controle

Com a aplicação da Técnica de Baker, observa-se a presença de lipídeos no fígado dos animais controle. Os núcleos de todas as células, incluindo os dos hepatócitos e das células de Kupffer, bem como os nucléolos (hepatócitos) estão corados devido à utilização da hemateína, solução obtida através da contra-coloração com hematoxilina (Fig. 6A).

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O fígado dos indivíduos submetidos a 50 mg/Kg e 100 mg/Kg de extrato, apresenta a mesma positividade encontrada nos indivíduos do grupo controle (Figs. 6B e 6C).

Fígados dos indivíduos submetidos a 200 mg/Kg do extrato reagiram fortemente ao teste, indicando o aumento de componentes lipídicos nas células e nos tecidos hepáticos quando comparados àqueles dos grupos anteriores (Figs. 6D e 6E). No citoplasma dos hepatócitos desse grupo também foram encontrados vacúolos negativos ao teste (Figs. 6D e 6E).

4.1.2.4. Detecção de lipídios – Técnica de azul de Nilo

- Grupo Controle

A aplicação do azul de Nilo revela a presença de lipídios no fígado dos indivíduos do grupo controle (Fig. 6F), o que é demonstrado pela reação positiva do parênquima hepático (Fig. 6F). Os núcleos de todas as células, incluindo os dos hepatócitos e das células de Kupffer, estão corados devido a contra-coloração rápida com hematoxilina (Fig. 6F).

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O fígado dos indivíduos do grupo I e II apresentam reação positiva semelhante àquela encontrada nos indivíduos do grupo controle (Figs. 6G e 6H).

O fígado dos indivíduos submetidos a 200 mg/Kg do extrato apresentam marcação mais intensa de lipídios demonstrada pela forte reação positiva (Figs. 6I e 6J). Nos hepatócitos deste grupo observa-se, ainda, a presença de vacúolos negativos ao teste (Figs. 6I e 6J).

4.1.3 Histologia do baço

- Grupo Controle

Os resultados obtidos por meio da aplicação das técnicas histológicas revelam que o baço dos indivíduos do grupo controle, assim como o já descrito na literatura, é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, que envia trabéculas para o interior do órgão. Apresenta duas regiões distintas: a polpa branca e a polpa vermelha (Figs. 4A-H).

A polpa branca possui os nódulos esplênicos, os quais são atravessados por pequenos vasos sanguíneos (arteríolas centrais) (Figs. 4A-H).

A polpa vermelha encontra-se entre os nódulos esplênicos e possui cordões esplênicos separados por vasos sanguíneos (sinusóides esplênicos) (Figs. 4A-H).

Os cordões esplênicos apresenta núcleos de células variadas, inclusive hemácias (Figs. 4A-H). Os vasos sanguíneos (sinusóides esplênicos) contêm hemácias e núcleos bem evidentes de leucócitos em seu interior (Figs. 4A-H).

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O baço dos indivíduos submetidos aos tratamentos com as diferentes concentrações do extrato de *C. oxyacantha* não foi alterado, permanecendo intacto após os tratamentos e semelhante ao baço dos indivíduos do grupo controle (Figs. 4A-H).

A arquitetura do órgão se mantém semelhante à do grupo controle (Figs. 4A-H).

4.1.4 Histoquímica do baço

4.1.4.1 Detecção de polissacarídeos neutros – Técnica do PAS

- Grupo Controle

O teste histoquímico do PAS revela que o baço dos indivíduos do grupo controle apresenta fraca positividade tanto em sua polpa branca quanto na maior parte de sua polpa vermelha, demonstrando a pouca quantidade de polissacarídeos presentes (Figs. 4M-P). No entanto, na polpa vermelha é possível observar reação PAS moderadamente positiva nos vasos sanguíneos (sinusóides esplênicos) e fina granulação fortemente positiva nos cordões esplênicos (Figs. 4M-P).

Como essa técnica não é específica para demonstração de núcleo, o núcleo das células não é observado.

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

No baço dos indivíduos dos grupos de tratamento, não foram detectadas alterações nem histoquímicas nem morfológicas (Figs. 4M-P). A afinidade pela reação do PAS é a mesma encontrada no baço dos indivíduos do grupo controle. Dessa forma, nota-se que o tratamento não alterou a quantidade de polissacarídeos no baço dos indivíduos tratados (Figs. 4M-P).

4.1.4.2 Detecção de proteínas – Técnica do Azul de Bromofenol

- Grupo Controle

A aplicação deste teste histoquímico detecta a presença de proteínas, em todas as regiões do baço dos indivíduos do grupo controle, que reagiram com forte positividade (Figs. 4I-L).

A polpa branca apresenta de fraca a moderada positividade (Figs. 4I-L).

Na polpa vermelha, os vasos sanguíneos (sinusóides esplênicos), tanto a parede quanto o lúmen contendo as células de defesa e hemácias, são moderadamente positivos (Figs. 4I-L). Já os cordões esplênicos apresentam reação fortemente positiva, hemácias fortemente positivas entre os núcleos fortemente positivos das outras células (Figs. 4I-L).

- Grupo I (50mg/Kg), Grupo II (100 mg/Kg), Grupo III (200 mg/Kg)

O baço dos indivíduos dos grupos de tratamento apresenta reação semelhante àquelas encontradas no baço dos camundongos do grupo controle, indicando que o tratamento com as diferentes concentrações do extrato de *C. oxyacantha* não alterou a constituição protéica do baço dos indivíduos tratados (Figs. 4I-L). Reação semelhante por todo o parênquima do órgão (Figs. 4I-L).

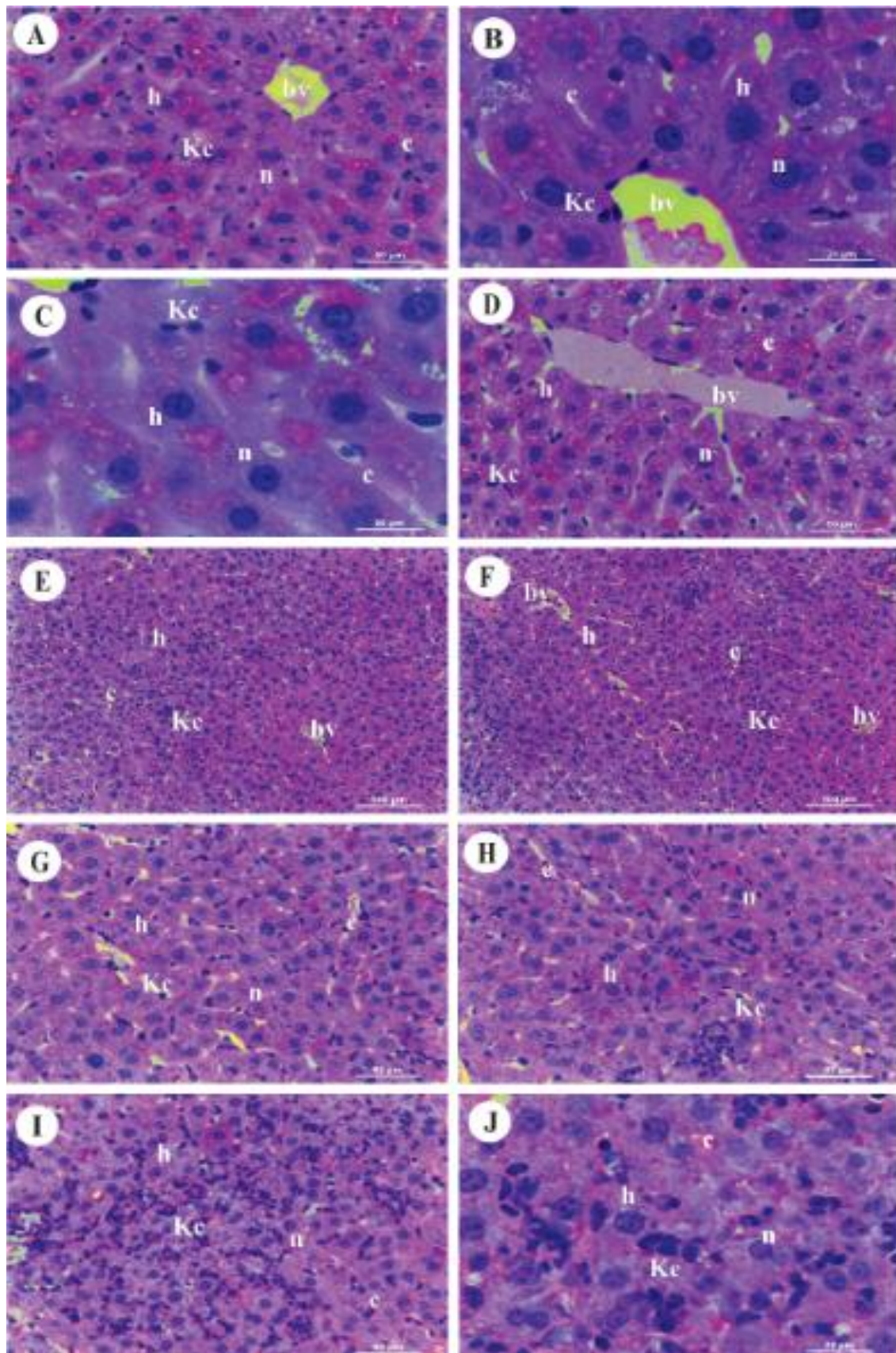


Figura 2 - Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de *Crataegus oxyacantha*.

Legenda: **A-J**. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). **A-B**. Grupo controle, **C-D**. Grupo I (50mg/Kg), **E-J**. Grupo II (100mg/Kg). (c= capilares sanguíneos, h=hepatócitos, Kc= células de Kupffer, n= núcleos dos hepatócitos; bv= vasos sanguíneos).

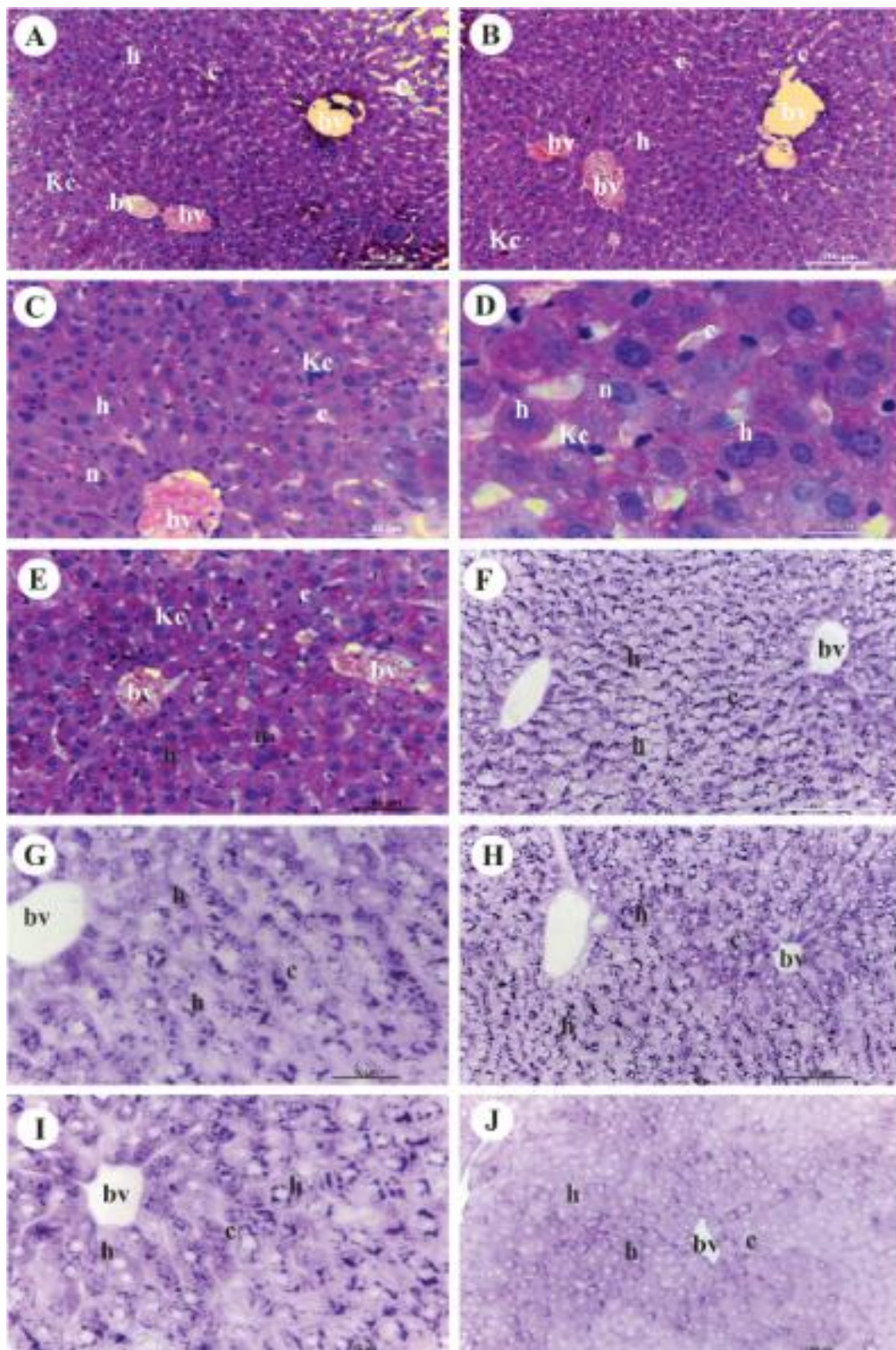


Figura 3 - Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de *Crataegus oxyacantha*. Legenda: **A-E**. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). **A-E**. Grupo III (200 mg/Kg). **F-J**. Aplicação do teste histoquímico PAS, para detecção de polissacarídeos. **F-G**. Grupo controle, **H-I**. Grupo I (50 mg/Kg), **J**. Grupo II (100 mg/Kg). (c= capilares sanguíneos, h=hepatócitos, Kc= células de Kupffer, n= núcleos dos hepatócitos; bv= vasos sanguíneos).

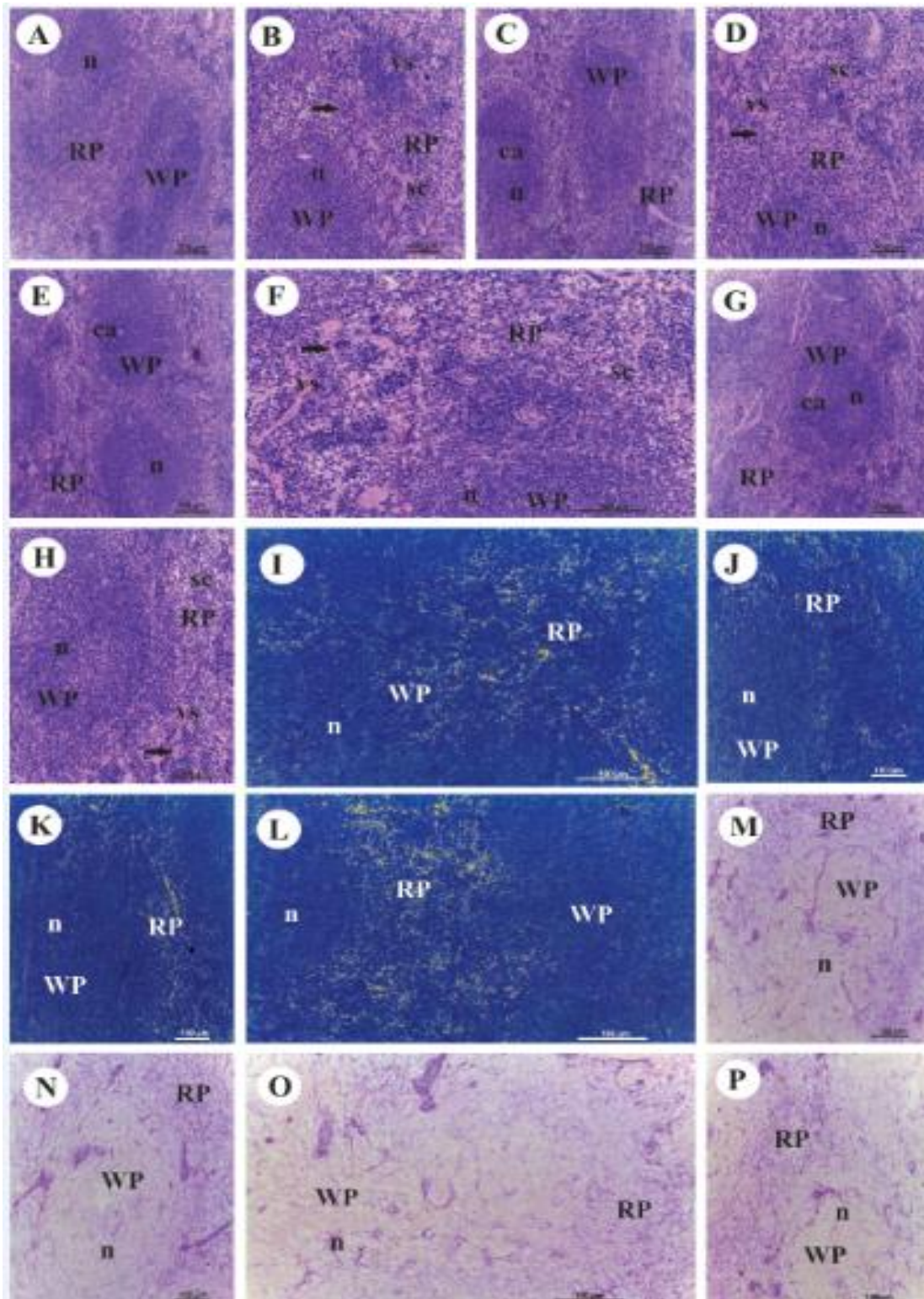


Figura 4 - Secções histológicas de baço de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de *Crataegus oxyacantha*.

Legenda: **A-H**. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE). **A-B**. Grupo controle, **C-D**. Grupo I (50mg/Kg), **E-F**. Grupo II (100 mg/Kg), **G-H**. Grupo III (200 mg/Kg). **I-L**. Aplicação do teste histoquímico de Azul de Bromofenol, para detecção de proteínas. **I**. Grupo controle, **J**. Grupo I (50 mg/Kg), **K**. Grupo II (100 mg/Kg), **L**. Grupo III (200 mg/Kg). **M-P**. Aplicação do teste histoquímico PAS, para detecção de polissacarídeos. **M**. Grupo controle, **N**. Grupo I (50 mg/Kg), **O**. Grupo II (100 mg/Kg), **P**. Grupo III (200 mg/Kg). (ca= arteríola central; n= nódulo esplênico, RP= polpa vermelha; sc=cordões esplênicos; vs= vasos sanguíneos; WP= polpa branca, arrow= leucócitos).

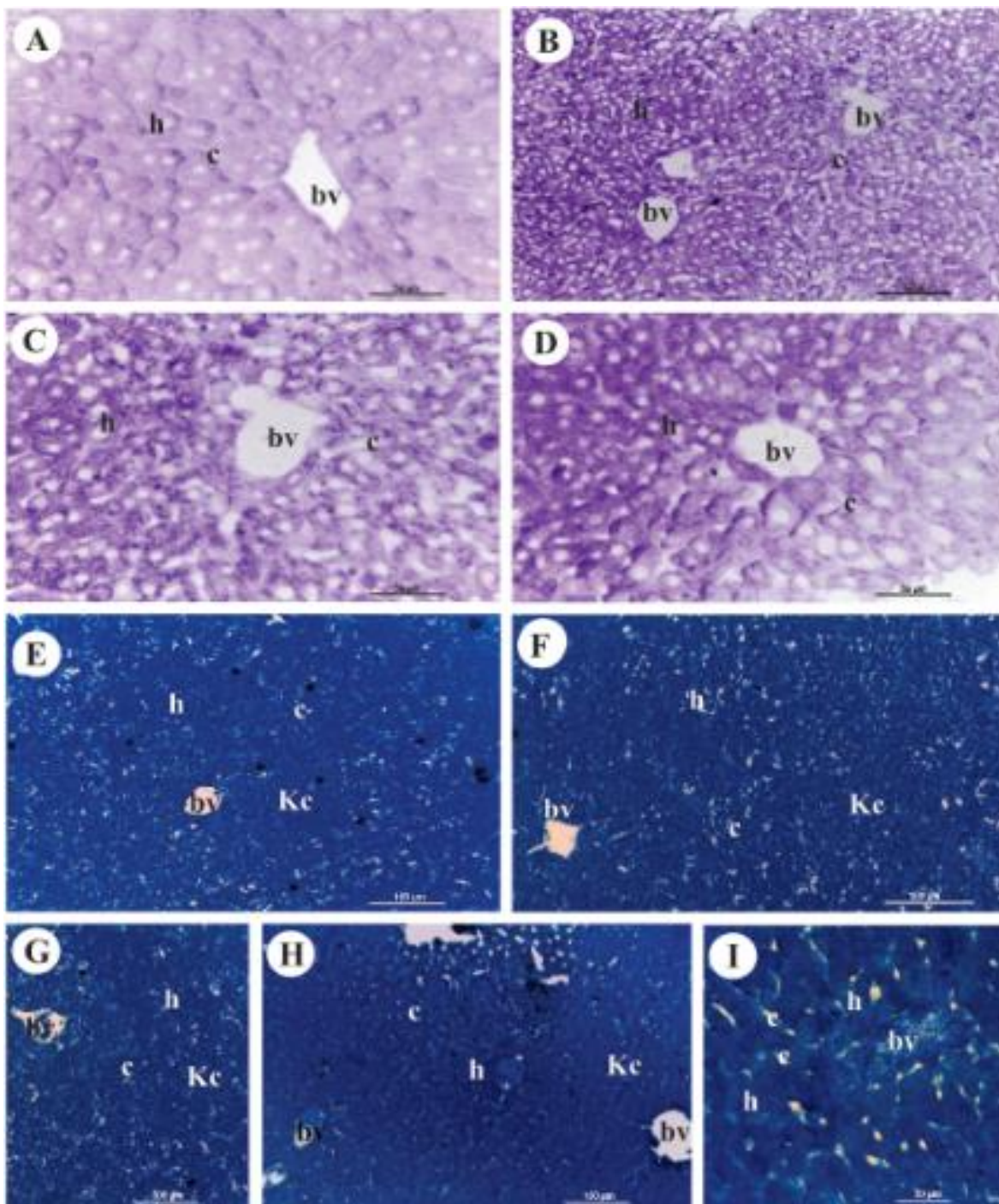


Figura 5 - Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de *Crataegus oxyacantha*.

Legenda: **A-D**. Aplicação do teste histoquímico PAS, para detecção de polissacarídeos. **A**. Grupo II (100 mg/Kg), **B-D**. Grupo III (200mg/Kg), **E-I** Aplicação do teste histoquímico de Azul de Bromofenol, para detecção de proteínas. **E**. Grupo controle, **F**. Grupo I (50 mg/Kg), **G**. Grupo II (100 mg/Kg), **H-I**. Grupo III (200 mg/Kg). (c= capilares sanguíneos, h=hepatócitos, Kc= células de Kupffer, n= núcleos dos hepatócitos; bv= vasos sanguíneos).

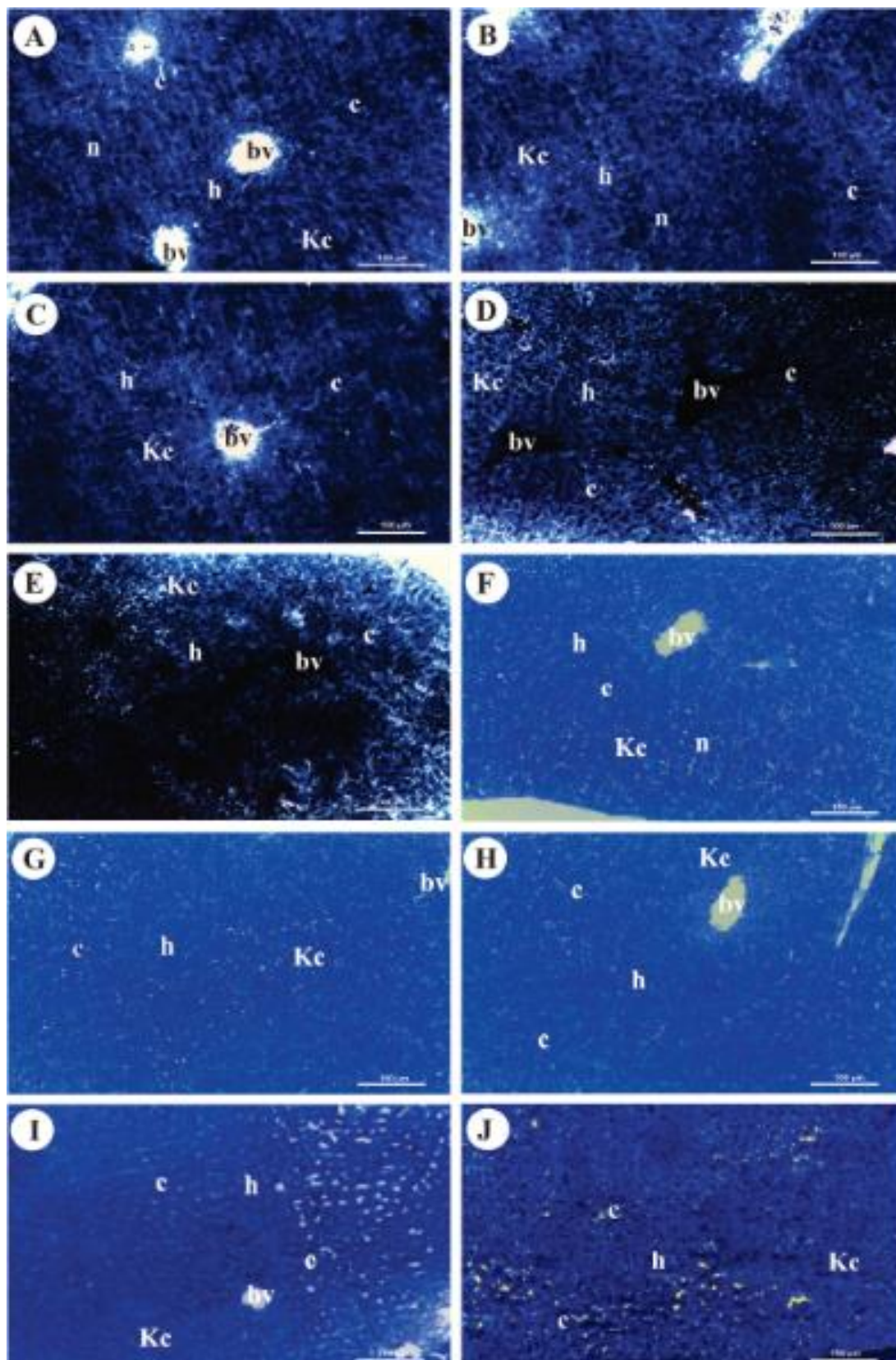


Figura 6 - Secções histológicas de fígado de camundongo submetidos a tratamento pelo extrato de *Crataegus oxyacantha*. Legenda: **A-E**. Coloração de Baker, para detecção de lipídeos. **A**. Grupo controle, **B**. Grupo I (50mg/Kg), **C**. Grupo II (100 mg/Kg), **D-E**. Grupo III (200 mg/Kg). **F-J**. Coloração Nilo, para detecção de lipídeos. **F**. Grupo controle, **G**. Grupo I (50 mg/Kg), **H**. Grupo II (100 mg/Kg), **I-J**. Grupo III (200 mg/Kg). (c= capilares sanguíneos, h=hepatócitos, Kc= células de Kupffer, n= núcleos dos hepatócitos; bv= vasos sanguíneos).

5. DISCUSSÃO

A *Crataegus oxyacantha*, é um exemplo de planta amplamente utilizada em diversos países devido ao seu potencial medicinal. Seus extratos, que podem ser de folhas, flores e frutos, são conhecidos por apresentar uma grande variedade de efeitos farmacológicos, dentre eles: agente cardiotônico, hipolipidêmico, antioxidante, anti-inflamatório e ansiolítico (SOKÓL-LETOWSKA; OSZMIANSKI; WOJDYLO, 2007; AKELA; DEVARAJ, 2008; NASCIMENTO et al., 2009). É uma planta de atuação lenta, devendo ser utilizada de 4 a 8 semanas para se obter uma ação completa, e as doses testadas em estudos clínicos variam de 160 a 900 mg/dia na Europa (LONG et al., 2006; KASHYAP; ARYA; THAKUR, 2012).

O potencial terapêutico da *C. oxyacantha* se dá pela presença de altos níveis de flavonóides e proantocianidinas oligoméricas (PCOs), que são 20 vezes mais potentes que a vitamina C, e 50 vezes mais potentes que a vitamina E (LAKSHMI; GEETHA; ROY, 2012). Neste estudo, utilizamos o extrato de frutos de *C. oxyacantha*, cuja avaliação da composição do extrato revelou a presença de 2,7% de flavonóides, sendo a vitexina-4-O-ramnosido (1,79%) o composto majoritário presente (QUADROS et al., 2017, in press). Pode-se considerar este valor expressivo, já que a taxa de compostos fenólicos pode variar devido a fatores externos, tais como local, clima, luz e fatores hereditários (CUI et al., 2006). Em outros estudos realizados por Lakshmi e colaboradores. (2012), a presença destes compostos foi de 3,54%.

Os flavonóides estão amplamente presentes nos produtos naturais, sendo o maior representante dos compostos fenólicos, e o hiperosídeo, o composto predominante (ZHANG et al., 2001; KAO et al., 2005). No presente trabalho, confirma-se a presença do composto químico hiperosídeo (0,63%). Este composto está localizado predominantemente nas flores e frutos, enquanto as proantocianidinas oligoméricas estão presentes nas folhas (TASSEL et al., 2010).

A metodologia utilizada no presente estudo foi baseada em diversos estudos que comprovaram que o extrato alcoólico da planta *C. oxyacantha* é o mais eficiente para extrair os principais componentes dessa planta (BONI; ZENI; ALBUQUERQUE, 2011; LAKSHMI; GEETHA; ROY, 2012).

O fígado é a maior glândula do corpo humano e tem papel essencial na regulação dos processos fisiológicos envolvidos, como: armazenamento e liberação de glicose, metabolismo de lipídeos, proteínas, processamento de hormônios, destruição

das células sanguíneas desgastadas e bactérias, emulsificação da gordura durante o processo de digestão através da secreção da bile, entre outros (HAMZA; AL-HARBI, 2015).

Além disso, armazena algumas vitaminas e minerais, por exemplo, A, B12, D, E, K, ferro e cobre; e participa também da regulação do volume sanguíneo (BRAUNBECK, 1998). Uma das características mais interessantes do fígado é a sua capacidade de regeneração, em alguns animais a perda do tecido hepático leva os hepatócitos a um mecanismo de multiplicação até que a massa original de tecido tenha sido restaurada, porém, em humanos esta capacidade é consideravelmente restrita (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O fígado ainda está exposto a todas as substâncias que ingerimos e, por isso, é o responsável pela biotransformação xenobiótica (metabolização de substâncias tóxicas) que leva a desintoxicação de tudo que será absorvido no intestino (THOOLEN et al., 2010). Tais características justificam a sua grande utilização na avaliação toxicológica pré-clínica e em estudos de oncogenicidade em roedores.

Os resultados histológicos obtidos no grupo controle deste estudo se comparam à literatura, hepatócitos do mesmo tamanho com presença de um ou dois núcleos centrais e que formam extensas placas anastomosadas, separadas pelos capilares sinusóides; e citoplasma acidófilo (GARTNER, HIATT; 2007; ROSS; PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Nos grupos tratados, observou-se danos progressivos a partir da dose do extrato de *C. oxyacantha* de 100 mg/kg (grupo II) administrada aos camundongos. As principais alterações detectadas foram estágios iniciais de desorganização tissular, presença de hepatócitos com citoplasma mais acidófilo. Essas alterações podem estar ocorrendo com a finalidade de filtrar com mais eficiência o sangue contendo substâncias estranhas e/ou de permitir a chegada de maior quantidade de células sanguíneas (hemácias/leucócitos) para participarem da destruição dessas substâncias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Nos Grupos II e III foi observado também grande aumento do número de células de Kupffer (macrófagos responsáveis pela fagocitose) provavelmente para eliminar restos de células que foram danificadas após o tratamento dos indivíduos, bem como substâncias estranhas (ROSS; PAWLINA, 2008; JENNE; KUBES, 2013, BALMER et al., 2014). Assim, nota-se a tentativa de remover substâncias estranhas da circulação sanguínea, evitando que haja a lesão no organismo dos indivíduos testados.

Especificamente nos indivíduos tratados com 200 mg/kg (Grupo III) foram encontradas as maiores alterações histológicas, indicando que a maior dose do extrato é que causa os maiores danos (modelo dose-dependente). Essas alterações incluem o surgimento de pequenos vacúolos neste grupo de tratamento. Resultados semelhantes também foram encontrados por Oliveira et al. (2016) e Lora et al. (2007), em camundongos tratados com extrato etanólico de *Morus alba L.* (Moraceae) e com extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora*, respectivamente.

Salam, Sleem e Shafee (2014), em estudos realizados com ratos tratados com o extrato de *C. oxyacantha*, registraram a capacidade de proteção desse extrato quando administrado na concentração correta. O grupo controle deste estudo, recebeu somente CCl₄ e apresentou grave lesão hepática marcada por uma completa desorganização da arquitetura do órgão. Já os grupos de tratamento que receberam o extrato nas doses de 10, 20 e 40 mg/Kg, apresentaram redução notável de danos no tecido hepático, diminuindo a fibrose e a degeneração vascular. Naqueles que receberam as maiores doses, ocorreu o surgimento de alterações histológicas. No presente estudo, também foram detectadas alterações hepáticas apenas nos grupos submetidos às maiores doses do extrato. Ambos os estudos destacam a importância da correta utilização das plantas, isto é, padronização da dose e tratamento correto.

Após a aplicação dos testes histoquímico do PAS, foi detectada granulação grosseira positiva, com certa preferência pelas regiões periféricas dos núcleos nos indivíduos do grupo controle. O polissacarídeo encontrado provavelmente é a glicose vinda do alimento que foi absorvida pelo fígado e armazenada nos hepatócitos na forma de glicogênio (HAMZA; AL-HARBI, 2015).

O grupo I de tratamento não sofreu nenhuma alteração histoquímica. No grupo II foi encontrada menor intensidade de marcação de polissacarídeos e no grupo III, positividade variando de forte a fraca à medida que aproxima das regiões mais periféricas do órgão. Essa situação pode estar ocorrendo por excesso de quebra do glicogênio.

Já após a aplicação do teste histoquímico do azul de bromofenol, foi observada a elevada quantidade de proteínas no citoplasma, nos núcleos e na luz dos capilares sinusóides. Quanto aos grupos de tratamento I, II e III, apresentaram a mesma positividade encontrada nos indivíduos do grupo controle, ou seja, forte positividade devido à grande marcação das proteínas no órgão. Esses dados nos permitem inferir que a síntese protéica realizada pela célula hepática não foi afetada pelo tratamento,

assim o fígado dos indivíduos tratados ainda é capaz de desempenhar suas atividades. Dados semelhantes também foram obtidos por Oliveira et al. (2012) e por Roma et al. (2012), em camundongos expostos a outros tratamentos.

O fígado também desempenha um papel fundamental no metabolismo de lipídeos, transformando as gorduras em ácidos graxos e glicerol, para sintetizar lipoproteínas como, HDL, VLDL e LDL, moléculas responsáveis pelo transporte de colesterol no sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No presente estudo, as técnicas de Baker e de azul do Nilo foram utilizadas para detecção de lipídeos. Os indivíduos do grupo controle apresentaram fígado com moderada marcação de lipídeos. O grupo I e II continuou apresentando a mesma positividade dos indivíduos controle. No entanto, o grupo III exibiu forte positividade, revelando o aumento na presença de elementos lipídicos nas células e tecidos hepáticos dos indivíduos tratados com 200 mg/Kg do extrato, sugerindo que esteja ocorrendo desequilíbrio na síntese, utilização ou mobilização dos lipídios. Outros estudos realizados por Oliveira et al. (2012) e por Roma et al. (2012) também observaram o aumento de lipídeos após o tratamento de camundongos.

Muitas substâncias químicas quando utilizadas inadequadamente, além de causar alterações em determinados órgãos, também podem influenciar o sistema imune, por isso é importante a avaliação dos seus efeitos não só nos sistemas desintoxicadores, (fígado) como também no imunológico (baço) (DOI et al., 1996).

O baço é o maior órgão linfático e único órgão linfóide interposto na corrente sanguínea, assim sendo, é capaz de filtrar diretamente o sangue. Em virtude de sua riqueza em células fagocitárias e de estabelecer um contato íntimo entre o sangue e essas células, o baço representa um importante órgão de defesa contra micro-organismos que penetram no sangue circulante. Como os demais órgãos linfáticos, origina linfócitos que passam para o sangue circulante. Por sua localização na corrente sanguínea, o baço responde com grande rapidez aos antígenos que invadem o sangue, sendo um filtro fagocitário e imunológico, bem como grande produtor de anticorpos (CESTA, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Segundo os dados descritos na literatura e verificados nos indivíduos do grupo controle do presente estudo, o baço é recoberto por uma cápsula de tecido conjuntivo a partir da qual trabéculas se estendem até a polpa esplênica do órgão. A polpa esplênica está dividida em duas regiões: a polpa branca e a polpa vermelha. A branca é formada pelo tecido linfático, principalmente por nódulos esplênicos e a polpa vermelha, pelos

cordões esplênicos entremeados por vasos sanguíneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O baço dos indivíduos dos grupos de tratamento (I, II e III) não foi modificado, sendo preservado após o tratamento e semelhante ao baço dos indivíduos do grupo controle, o que indica que nenhuma das concentrações aplicadas do extrato está danificando os indivíduos tratados.

Esses dados nos permite sugerir que a polpa vermelha e a polpa branca dos indivíduos do grupo de tratamento provavelmente continuam a executar suas funções de apresentação de antígenos, ativação e proliferação de linfócitos B e T, produção de anticorpos e remoção de materiais inúteis do sangue (GOLDSCHNEIDER; MCGREGOR, 1973; KUMARATNE et al., 1981; GREAVES; FACCINI, 1992; ROSS; PAWLINA, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Doi et al. (1996) em ratos submetidos ao agentes alquilantes (ciclofosfamida), onde a polpa branca do baço não foi alterada. Os mesmos autores também submetem os ratos à ação de outros agentes alquilantes, o nitromin e o melphalan. O primeiro causou a redução do tamanho do baço sem mudanças estruturais, enquanto que o segundo causou atrofia da polpa branca desse mesmo órgão.

Doi et al. (1996), em estudos com ratos expostos a ciclofosfamida, ao nitromin e ao melphalan, notaram que a polpa vermelha do baço não sofreu modificação no primeiro caso e desapareceu totalmente quando os outros dois agentes foram utilizados, dados estes que não foram observados pelo presente estudo após o tratamento com o extrato.

Através dos testes histoquímicos foi detectada a presença de proteínas e de polissacarídeos. Os indivíduos do grupo controle apresentaram resultado positivo ao teste de azul de bromofenol: a polpa branca apresenta de fraca a moderada positividade e a polpa vermelha com vasos sanguíneos (sinusóides esplênicos) moderadamente positivos e os cordões esplênicos fortemente positivos. Já no teste de PAS, apresentaram fraca positividade tanto em sua polpa branca quanto na maior parte de sua polpa vermelha.

No baço dos indivíduos dos grupos de tratamento foram encontradas reações semelhantes às aquelas encontradas no baço dos camundongos do grupo controle, tanto no teste do azul de bromofenol quanto no PAS, demonstrando que o tratamento com as diferentes concentrações do extrato de *C. oxyacantha* não alterou nem a constituição protéica nem a polissacarídica do baço dos indivíduos tratados. Dessa forma, percebe-se

por meio dos resultados obtidos pela exposição de camundongos ao extrato de *C. oxyacantha* que o baço dos indivíduos tratados não apresentou alteração morfológica nem histoquímica e assim continua íntegro e desempenhando suas funções.

Outros estudos realizados por SCHLEGELMILCH e HEYWOOD (1994), também avaliaram a toxicidade do extrato padronizado de *Crataegus* (WS1442). Segundo os referidos autores, este não causou toxicidade nos órgãos alvos em altas doses para humanos e apresentou resultados negativos nos testes mutagênico e clastogênico. No entanto, testes realizados em complemento a este estudo para investigar o potencial genotóxico do mesmo extrato de frutos de *C. oxyacantha*, *in vitro*, evidenciaram potenciais efeitos genotóxicos em linfócitos de sangue periférico humano e células HepG2 em cultura. No ensaio cometa, foi detectado danos primários ao DNA, que podem ou não ser reversíveis, porém, no teste do micronúcleo, foi observado danos irreversíveis, podendo afirmar que o extrato pode ser mutagênico (QUADROS, 2017).

Os recentes resultados envolvendo a análise da toxicidade do extrato de frutos de *C. oxyacantha* indicam que apesar do seu potencial terapêutico para seres humanos, o referido extrato não deve ser usado indiscriminadamente, já que foi observado um potencial efeito genotóxico do mesmo.

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>. 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 Medicinais 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>. Acesso em: 12 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_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&nrm=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.