

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**Efeito da *Niedenzuella multiglandulosa* em coelhas gestantes
e em embriões bovinos produzidos *in vitro***

VALQUÍRIA BULL

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2018

Valquíria Bull

**Efeito da *Niedenzuella multiglandulosa* em coelhas gestantes
e em embriões bovinos produzidos *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área: Medicina e Cirurgia Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Marília Martins Melo

Co-orientadores:

Prof. Álan Borges Maia

Prof. Benito Soto Blanco

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2018

Bull, Valquíria, 1989-
B935c Efeito da *Niederzuehlla multiglandulosa* em coelhas gestantes e em embriões bovinos produzidos *in vitro* / Valquíria Bull. – 2018.
57 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Co-orientadores: Alan Borges Maia, Benito Soto Blanco
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Teses. 2. Coelho – Teses. 3. Plantas venenosas – Teses. 4. Intoxicação – Teses. 5. Embriologia – Teses. 6. Embriões – Mortalidade – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Maia, Alan Borges. III. Soto-Blanco, Benito. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.089 595 2

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALQUÍRIA BULL

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 23 de Março de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Marília Martins Melo

Prof^ª. Marília Martins Melo
Presidente - Orientador

Antônio Último de Carvalho

Prof. Antônio Último de Carvalho
Escola de Veterinária - UFMG

João Bosco Barreto Filho

Prof. João Bosco Barreto Filho
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Alan Maia Borges

Prof. Alan Maia Borges
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me trazido até aqui e pelas pessoas que colocou no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Iracema e Baldoino, por terem sido o “gatilho” para a minha formação acadêmica e profissional, em um lugar onde o ensino superior não é costume, é exceção.

Agradeço a meus sete irmãos pelo suporte material e emocional, me mantendo firme nessa caminhada.

Obrigada, Prof^ª. Marília Martins Melo, por ter me aceitado como sua orientanda, por todo o suporte material e científico para realização dos experimentos. Foi uma honra trabalhar contigo e fazer novas descobertas.

Obrigada, Prof. Alán Borges por ter disponibilizado o Laboratório de Células Embrionárias e Animais Transgênicos e pela rica contribuição científica ao meu trabalho.

Obrigada, Prof. Benito Soto Blanco, por ter me auxiliado na produção do extrato da planta e ter sido sempre tão solícito para discutir as minhas dúvidas e questionamentos.

Obrigada, Prof. Antônio Último de Carvalho por sempre me receber com carinho em sua sala, pelas orientações, pelo delicioso café e por arrancar muitos sorrisos do meu rosto e renovar minha esperança.

Obrigada, professores Anilton César Vasconcelos e Felipe Pierezan por ter sido extremamente solícitos para a leitura de lâminas e por terem contribuído para a realização das análises.

Obrigada, Prof^ª Anelise Nepomuceno e Angélica Ferreira, por terem disponibilizado todo suporte material e técnico para realização da ultrassonografia e por terem dedicado tempo para a execução dessa análise.

Obrigada, Ana Carolina Leite e Eliane Beatriz M. Silva, por terem contribuído técnica e cientificamente com a execução da minha pesquisa, devo a vocês o sucesso desse trabalho.

Obrigada, Jaqueline Tavares, por ter me auxiliado nos momentos que precisei e por ter vindo “correndo”. Você é fantástica e única!

Obrigada, Ana Flávia Botelho, por sua disponibilidade na leitura das lâminas e por ter sido sempre tão solícita em várias etapas desse trabalho.

Obrigada, Daniel Campos, Ana Rafaela Alvim e Marina M. Nogueira, por todo auxílio no cuidado com os animais e na realização dos procedimentos laboratoriais. Tudo teria sido mais difícil sem vocês.

Obrigada, Bruno Damaceno, pelos tantos domingos e feriados que você me ajudou a cuidar dos coelhos, pelas suas ricas opiniões sobre este trabalho, pela sua paciência e por ter me estimulado a concluir essa etapa. Com seu apoio e incentivo tudo se tornou possível. Você faz parte disto.

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. <i>Niedenzuella (Tetrapteryx)</i>	14
2.1.1. Caracterização e epidemiologia	14
2.1.2. Distribuição geográfica	16
2.2.3. Propriedades tóxicas e toxicidade	16
2.1.4. Sinais clínicos da intoxicação	18
2.1.5. Achados macro e microscópicos	18
2.1.6. Fatores envolvidos na patogênese das lesões	19
2.1.7. Diagnóstico diferencial	20
2.2. COELHOS NOVA ZELÂNDIA (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	20
2.2.1. Puberdade.....	21
2.2.2. Anatomia do sistema genital da coelha	21
2.2.2. Ciclo estral	21
2. 2. 3. Pré-implantação e implantação	21
2.2.4. Placentação	22
2.3. EXAME ULTRASSONOGRÁFICO	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. LOCAL, PLANTA E ANIMAIS	26
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL <i>in vivo</i>	26
4.2.1 Exame ultrassonográfico gestacional	27
4.2.2. Eutanásia	28
4.2.3. Avaliação anatomohistopatológica	28
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL <i>in vitro</i> (FIV)	29
4.3.1. Obtenção dos oócitos	29
4.3.2. Maturação <i>in vitro</i>	29
4.3.3. Fecundação <i>in vitro</i>	29
4.3.4. Cultivo dos embriões	29
4.3.5. Exposição dos embriões ao extrato de <i>N. multiglandulosa</i>	30
4.3.6. Fixação dos blastocistos e análise TUNEL	30
4.4. Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5. 1. GESTAÇÃO E NEONATOS	31
5. 2. ULTRASSONOGRAFIA	32
5.2.1. Diâmetro biparietal	30
5.2.2. Ecogenicidade óssea fetal	30
5.2.3. Frequência cardíaca fetal	31
5.3. HEMATOLOGIA	35
5.5. ANATOMOHISTOPATOLOGIA	40
5. 5. 1. Achados de necropsia.....	41
5. 5. 2. Microscopia	42
5.6. EFEITO DA <i>N.multilandulosa</i> EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO	46
5. 6. 1.Quantificação de células apoptóticas	47
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudo fitoquímico de extrato aquoso e etanólico de <i>N. multiglandulosa</i> em folhas e caules (jovens e maduros). Adaptado de Facco et al., (2016).....	17
Tabela 2 -	Estágios de desenvolvimento gestacional de coelhos (dias).....	25
Tabela 3 -	Tabela 3. Médias e desvios padrão da ecogenicidade óssea dos fetos na última semana de gestação dos grupos controle, 12 dias e 21 dias em valor pixel mensurado pelo software IMAGEJ.....	33
Tabela 4 -	Médias e desvios padrão de hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) das coelhas dos diferentes grupos experimentais*. Referência: ^a Hewitt et al., 1989; ^b Campbell, 2012 ^a	35
Tabela 5 -	Contagens médias e desvio padrão de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos/heterófilos e eosinófilos das coelhas dos grupos controle, 12 dias e 21 dias. Referência: Campbell, 2012a.....	36
Tabela 6 -	Médias e desvios padrão de ureia, creatinina, ALT, AST, FA, GGT, proteína total, albumina e globulinas de coelhas, no T0 (tempo zero) e no TF (tempo final- pós-parto) dos grupos controle, 12 dias e 21 dias. Referência: ^a Mader, 1997; ^b Campbell, 2012b; ^c Spinelli et al., 2012; ^d Hewitt et al., 1989.....	37
Tabela 7 -	Valores médios e desvio padrão de CK e CK-MB das coelhas (U/L). Referência: Hewitt et al., 1989.....	39
Tabela 8 -	Médias e desvios padrão de cálcio, fósforo e magnésio (mg/dL) nos grupos experimentais após o parto e valores de referência para a espécie. Análises realizadas com o teste Student Newman Keuls (P>0,05). Referência: ^a Mader, 1997; ^b Kaneko et al., 2008.....	40
Tabela 9 -	Taxa de clivagem embrionária, taxa de produção de embriões (blastocistos) em relação ao número de clivados e em relação ao total de oócitos inseminados e taxa de eclosão.....	46
Tabela 10 -	Taxa de apoptose em blastocistos nos grupos controle e extrato.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Niedenzuella multiglandulosa</i> . A) Crescimento em forma de pseudo-arbusto. B) caracterização da inserção oposta e paralela das folhas. C. As setas demonstram as glândulas presentes nas extremidades das folhas, as quais identificam essa espécie. D) Aspecto do broto. E) Frutos verdes.....	15
Figura 2 -	<i>Niedenzuella multiglandulosa</i> . (A. Jussieu). A) Ramo florido. B) Margem da lâmina, lado abaxial, mostrando glândulas e tomento. C) Pecíolo, glândulas e estípulas na base. D) Botão de flor. E) Flor. F) Visão abaxial de cinco estames; os dois filamentos maiores são opostos às pétalas laterais posteriores. G). Ápice do estilo. H). Sâmara, visão abaxial. I) Sâmara, visão axial. Escala equivalente: A, 4 cm; B–E, 4 mm; F, 2 mm; G, 0,8 mm; H e I, 1 cm. A–D, Anderson 13628 (MICH); E–I, Anderson 11608 (MICH). Fonte: Anderson, 2006.....	15
Figura 3 -	Distribuição de <i>N. multiglandulosa</i> (A) e <i>N. acutifolia</i> (B) no território brasileiro. Fonte: Mamede, 2015.....	16
Figura 4 -	Placenta discoide da coelha.....	22
Figura 5 -	Classificação da placenta hemocorial pela relação entre o córion e a parede uterina. BM: membrana basal; Te: trofoectoderma; Cy: citotrofoblasto; FB: sangue fetal; FV: vaso fetal; MB: sangue materno; Sy: sinciciotrofoblasto. Fonte: Adaptado de Furukawa et al., (2014).....	22
Figura 6 -	Coelha: placenta. Placenta aos 28 dias de gestação. a) Sessão histológica, HE, barra=3mm. b) Decídua, HE, barra=60 µm. c) Zona labiríntica, HE, barra=60 µm. d) Zona juncional, HE, barra=60 µm. DN, decídua, zona de necrose; DS, decídua, zona de separação; EC, célula epitelial; FV, vaso fetal; JZ, zona juncional; LZ, zona labiríntica; MV, vaso materno; Tb, trofoblasto; UM, músculo uterino. Fonte: Furukawa et al., (2014).....	23
Figura 7 -	Imagem ultrassonográfica de um crânio de feto coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) de 26 dias, mostrando a medição do diâmetro biparietal. Corte transversal do crânio medindo 14,2 mm. Frequência utilizada: 10 MHz.....	28
Figura 8 -	Médias e desvios padrão do peso (g) dos láparos ao nascimento (A) e do diâmetro (mm) biparietal do crânio fetal na última semana de gestação (B) dos grupos controle, 12 dias e 21 dias. Análises realizadas com teste <i>Student Newman Keuls</i> ($P>0,05$).....	32
Figura 9 -	Imagem ultrassonográfica de crânio de feto coelho em corte transversal. A: Controle, 23 dias (de gestação). B: 21 dias (animal 20), 25 dias; C: 21 dias (animal 15), 23 dias. Observa-se uma moderada diferença de ecogenicidade entre A e B. Frequência utilizada: 10 MHz.....	33
Figura 10 -	Médias e desvios padrão da frequência cardíaca (batimentos/minuto) dos fetos na última semana de gestação. Análises realizadas com o teste <i>Student Newman Keuls</i> ($P>0,05$).....	35
Figura 11 -	Médias e desvios padrão, de ureia (A) creatinina (B), ALT (C), AST (D), FA (E), GGT (F), proteína total (G), albumina (H) e globulinas (I) das coelhas dos grupos controle, 12 dias e 21 dias após o parto. Análises realizadas com o teste <i>Student</i>	

	Newman Keuls ($P>0,05$), exceto a FA, submetida ao teste de Kruskal Wallis ($P<0,05$). (E)* diferença entre os grupos 12 e 21 dias; (H)* diminuição em relação ao controle.....	38
Figura 12 -	Médias e desvios padrão de CK e CK-MB após o parto. CK: análises realizadas com o teste de Kruskal Wallis ($P>0,05$) e CK-MB com o teste de Student Newman Keuls ($P>0,05$).....	40
Figura 13 -	Útero, coelha. Área de hemorragia circular no corno uterino direito, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro.....	41
Figura 14 -	Rim, coelho. A: nefrose tubular aguda focal moderada (200x). B: maior aumento da figura A; células dos túbulos proximais com perda de núcleos (grupo 21 dias) (400x). C. células tubulares proximais com perda da coloração citoplasmática, cariorrexia e ausência de núcleo (grupo 12 dias) (400x). D: (*) vacuolização intracitoplasmática nos túbulos contorcidos proximais multifocal moderada (200x). E: maior aumento da figura D. D: degeneração hidrópica (400x) (grupo 21 dias). H&E.....	43
Figura 15 -	Útero, coelha. Endométrio com hemorragia e perda do epitélio multifocal moderado no pós-parto. H&E, 40x.....	45
Figura 16-	Placenta, coelha. Placenta no pós-parto. A: Intensa vascularização na zona labiríntica (1) e zona decídua de necrose (2). Shorr, 40x. B: Células em apoptose (setas). Shorr, 200x.....	46
Figura 17 -	Embriões bovinos no nono dia de CIV. A: Controle. B: Extrato. BE: blastocisto eclodido; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto intermediário. Observa-se um desenvolvimento mais lento dos embriões submetidos ao extrato, ausência de eclosão embrionária e aspecto morfológico enegrecido em relação ao controle. As estruturas de coloração marrom em B são provenientes da solução do próprio extrato.....	47
Figura 18 -	A1 e B1: blastômeros totais de embrião bovino produzido <i>in vitro</i> do grupo controle e extrato, respectivamente, corados por Hoechst (azul) (filtro de 460nm). A2 e B2: blastômeros com coloração verde brilhante (Vectashield) estão em apoptose (filtro de 520 ± 20 nm). Imagem obtida por microscópio de fluorescência em objetiva de 400x.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

µL: microlitros

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CK: creatina-fosfoquinase

CK-MB: creatina-fosfoquinase isoenzima MB

CIV: cultivo *in vitro*

g/dL: miligramas por decilitro

GGT: gamaglutamiltransferase

g/mL: gramas por mililitro

FA: Fosfatase alcalina

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

PTHrP: Proteína paratormônio-recombinante

p.v.: peso vivo

RDW: *Red cell distribution width* (variação de tamanho das hemácias)

T0: tempo zero, antes da exposição à planta

TF: tempo final, após o parto

U/L: Unidades por litro

UI/L: Unidades internacionais por litro

VCM: Volume corpuscular médio

VG: Volume globular

RESUMO

Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa, cipó perene de ocorrência na região Sudeste e Centro-oeste do Brasil, tem sido correlacionada a surtos de intoxicação em bovinos gerando perdas econômicas relacionadas à morte de animais por insuficiência cardíaca, abortamentos, natimortalidade e mortalidade neonatal. A patogênese das lesões ainda é desconhecida e há controvérsias em relação aos fatores que desencadeiam a ocorrência de abortamentos. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar o potencial de indução de morte embrionária e fetal de *N. multiglandulosa* em coelhas e determinar o potencial embriotóxico da planta em embriões bovinos *in vitro*. Foram utilizadas 15 coelhas gestantes distribuídas aleatoriamente em três grupos (controle, 2 e 3), com cinco animais cada. Após 12 dias e 21 dias de gestação, somente os grupos denominados 2 e 3, respectivamente, receberam 10g/kg de folhas frescas jovens e maduras de *N. multiglandulosa*. O grupo controle funcionou como testemunha até o parto. Os animais foram avaliados por exame físico diário e ultrassonografia a cada cinco dias. Análises hematológicas e bioquímicas foram feitas antes da gestação e após o parto. Após o parto, as coelhas e os neonatos/fetos foram eutanasiados e procedeu-se a avaliação anatomohistológica. No estudo *in vitro*, foram realizadas cinco repetições de cultivo de embriões bovinos com dois grupos: extrato, onde foi administrado 2,7mg/mL de extrato aquoso da planta (10%) na gota de cultivo no sexto dia de cultivo *in vitro* (CIV), e controle, que não recebeu tratamento. Foram avaliados, qualitativamente e comparativamente, o desenvolvimento e a eclodibilidade embrionária até o nono dia de CIV nos dois grupos. A planta *N. multiglandulosa* não causou abortamento em coelhas nas doses e tempo de exposição utilizados. Os exames físicos, hematológicos e bioquímicos não se alteraram. Na ultrassonografia detectou-se menor ecogenicidade do esqueleto fetal nos grupos 2 e 3. Ao exame histopatológico observou-se nefrose focal aguda e discreta degeneração hidrópica no coração das coelhas. Conclui-se que *N. multiglandulosa* não causa abortamento em coelhas, mas leva ao subdesenvolvimento embrionário na dose de 27mg/mL.

Palavras-chave: cipó-ruão, embriologia, lesão renal, planta tóxica

ABSTRACT

Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa perennial cypress occurring in Southeastern and Midwestern Brazil has been correlated with outbreaks of intoxication in cattle, generating economic losses related to death of animals due to heart failure, miscarriage, stillbirth and neonatal mortality. The pathogenesis of the lesions is still unknown and there are controversies regarding the factors that trigger the occurrence of abortions. The objective of this research was to evaluate the potential of induction of embryonic and fetal death of *N. multiglandulosa* in rabbits and to determine the embryotoxic potential of the plant in vitro bovine embryos. Fifteen pregnant rabbits were randomly distributed in three groups (1, 2 and 3), with five animals each. After 12 days and 21 days of gestation, groups named 2 and 3, respectively, received 10 g / kg fresh young leaves of *N. multiglandulosa*. The group 1 functioned as a control and was monitored until parturition. The animals were evaluated by daily physical examination and ultrasound every five days. Hematological and biochemical analyzes were performed before and after parturition. After the parturition, the rabbits and the neonates / fetuses were euthanized and the anatomic-histopathological evaluation was carried out. To perform the in vitro study, five replicates of bovine embryo culture were distributed in two groups: extract, where 2.7 mg / mL of aqueous plant extract (10%) was administered to the culture, and control, without extract. Embryonic development and hatchability were evaluated qualitatively and comparatively up to the ninth day of culture in both groups. *N. multiglandulosa* did not cause abortion in the rabbits at the doses and time of exposure. The physical, hematological and biochemical exams did not change. Ultrasonography revealed lower echogenicity of the fetal skeleton in groups 2 and 3. Histopathological examination revealed acute focal nephrosis and discrete hydropic degeneration in the heart of the rabbits. It is concluded that *N. multiglandulosa* does not cause abortion in rabbits, but it takes embryonal underdevelopment at the dose of 27mg/mL.

Key words: cipó-ruão, embryology, renal injury, toxic plant

1. INTRODUÇÃO

A intoxicação pelo gênero *Tetrapteryx*, recentemente reclassificada para *Niedenzuella*, conhecido popularmente como cipó-preto ou cipó-vermelho, que tem sido correlacionado com surtos de mortalidade e abortamentos em bovinos, além do nascimento de bezerros fracos (Tokarnia et al., 1989; Carvalho et al., 2006). Como abortamentos, natimortos e nascimento de crias fracas, muitas vezes são associados a outras causas, principalmente infecciosas, torna-se necessário conhecer as características desta planta além da patogênese, para que se possa estabelecer um diagnóstico definitivo e adoção de medidas preventivas nos rebanhos. Além disto, a composição fitoquímica e a ação das substâncias causadoras de alterações sistêmicas nos animais requerem mais estudos, pois os dados existentes na literatura ainda são escassos (Santos et al., 1998; Melo e Dantas-Barros, 1999; Campos et al., 2004; Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009).

Diante deste contexto, é imperativo o estudo dos efeitos da *Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa* em embriões, fetos e em coelhas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Niedenzuella (Tetrapteryx)*

2.1.1. Caracterização e epidemiologia

Da família Malpighiaceae, *N. multiglandulosa*, *N. acutifolia*, *N. renidens* e *T. ramiflora* são as principais espécies descritas no Brasil, popularmente conhecidas como cipó-vermelho, cipó-ferro, cipó-ruão ou cipó-preto. A família *Malpighiaceae* compreende cipós que se fixam em suportes para sustentação durante o desenvolvimento (caule escandente) e possui como habitat a América Tropical (Melo, 1998; Tokarnia et al., 2000).

O gênero *Tetrapteryx* compreende 69 espécies, distribuídas entre o México e a Argentina (Anderson et al., 2006; Francener et al., 2015). Esse gênero apresenta fruto esquizocárpico dividido em três mericarpos samaróides com asas laterais na forma de um “X”, às vezes com uma asa lateral reduzida (Anderson, 2006). No Brasil, foram catalogadas 25 espécies do gênero (Mamede e Francener, 2015).

Esse gênero contém um grupo de mesma descendência: *Niedenzuella*. Este possui 16 espécies, anteriormente catalogadas como *Tetrapteryx*, sendo reclassificado porque possui sépalas mais longas que as pétalas no botão floral durante a floração, diferente das espécies *Tetrapteryx* spp, nas quais a sépala não cobre o botão floral na floração (Anderson, 2006; Francener et al., 2015).

Niedenzuella spp é classificada como trepadeira ou pseudoarburto, apresenta folhas ovais a elíptico-lanceoladas, de inserção oposta, sendo pilosas quando jovens e glabras quando maduras. Possui inflorescência vistosa tipo panícula, com flores amarelas contendo cinco pétalas, com uma delas menor que as demais. Os frutos são pequenos e compostos, com coloração marrom-avermelhada (Figuras 1 e 2). A planta floresce principalmente em julho e agosto, e frutifica em setembro (Melo, 1998; Carvalho e Arruda, 2011).



Figura 1. *Niedenzuella multiglandulosa*. A) Crescimento em forma de pseudoarbusto. B) caracterização da inserção oposta e paralela das folhas. C. As setas demonstram as glândulas presentes nas extremidades das folhas, as quais identificam essa espécie. D) Aspecto do broto. E) Frutos verdes.

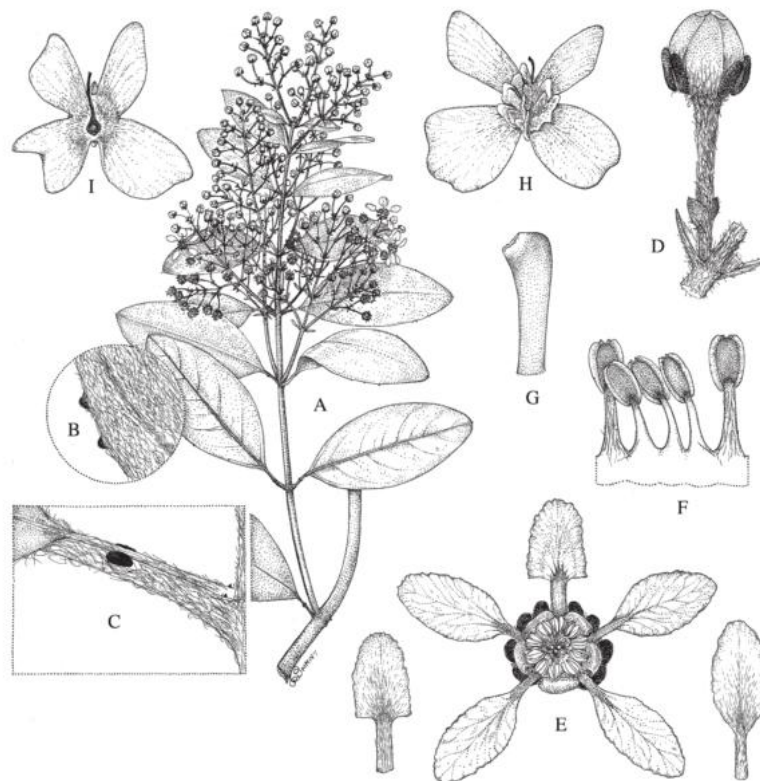


Figura 2. *Niedenzuella multiglandulosa*. (A. Jussieu). A) Ramo florido. B) Margem da lâmina, lado abaxial, mostrando glândulas e tomento. C) Pecíolo, glândulas e estípulas na base. D) Botão de flor. E) Flor. F) Visão abaxial de cinco estames; os dois filamentos maiores são opostos às pétalas laterais posteriores. G). Ápice do estilo. H). Sâmara, visão abaxial. I) Sâmara, visão axial. Escala equivalente: A,

4 cm; B–E, 4 mm; F, 2 mm; G, 0.8 mm; H e I, 1 cm. A–D, Anderson 13628 (MICH); E–I, Anderson 11608 (MICH). Fonte: Anderson, 2006.

2.1.2. Distribuição geográfica

O diagnóstico das intoxicações por plantas é determinado, além dos sinais clínicos, pela distribuição geográfica das espécies tóxicas (Vasconcelos et al., 2008). No Brasil, as diferentes espécies de *Niedenzuella* foram confirmadas em todos os estados, com exceção do Rio Grande do Norte (Mamede e Francener, 2015). No entanto, a espécie *N. multiglandulosa* ocorre somente nos estados do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia e em todos os estados no Sudeste. Por sua vez, a espécie *N. acutifolia* possui distribuição mais ampla, tendo sido encontrada no Acre, Amazonas, Tocantins, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e em todos os estados do Sudeste (Mamede, 2015) (Figura 3). Entre as espécies do gênero *Tetrapteryx/Niedenzuella*, *N. multiglandulosa* e *N. acutifolia* são as únicas comprovadamente tóxicas (Melo et al., 2001; Riet-Correa et al., 2009; Caldas et al. 2011), além da *T. mucronata* apresentar, comprovadamente, inibidores de acetilcolinesterase (Queiroz et al., 2014).

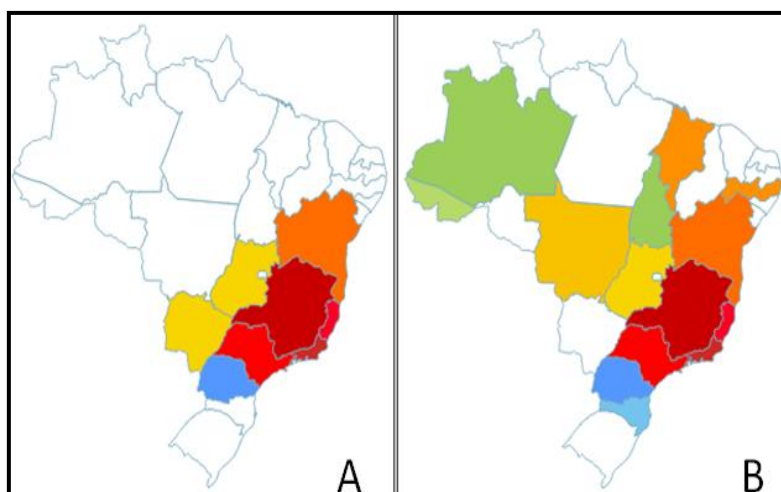


Figura 3. Distribuição de *N. multiglandulosa* (A) e *N. acutifolia* (B) no território brasileiro. Fonte: Mamede, 2015.

Entretanto, em relação aos surtos de intoxicação, estes se restringiram à região Sudeste e Centro-oeste (Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009). A ocorrência de intoxicações por *N. multiglandulosa* foi relatada nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo (Tokarnia et al., 1989; Tokarnia et al., 2000) e Mato grosso do Sul (Carvalho et al., 2006) e de *N. acutifolia*, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Tokarnia et al., 2000), todavia com apresentação clínica e histopatológica semelhantes.

2.2.3. Propriedades tóxicas e toxicidade

No estudo fitoquímico da *N. multiglandulosa*, realizado com folhas jovens e maduras, foram encontrados heterosídeos flavônicos, polifenóis, esteroides e glicosídeos cardiotônicos. Entretanto, taninos e alcalóides quartenários somente foram detectados nas folhas maduras (Melo e Dantas-Barros, 1999).

Facco et al. (2016) realizaram estudo fitoquímico do extrato aquoso e etanólico de folhas jovens e maduras e do caule de *N. multiglandulosa*, descrevendo diferentes compostos secundários conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Estudo fitoquímico de extrato aquoso e etanólico de *N. multiglandulosa* em folhas e caules (jovens e maduros). Adaptado de Facco et al. (2016).

Metabólitos secundários	Extrato aquoso (200µg L ⁻¹)				Extrato Etanólico (200µg L ⁻¹)			
	FJ	FM	CJ	CM	FJ	FM	CJ	CM
Compostos fenólicos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Taninos	+	+	++	+++	+++	+++	++	+++
Flavonoides	±	±	++	+	+++	+++	+	+
Antocianinas	++	++	++	+	-	-	+	-
Antraquinona livre	+	+	-	+	-	-	-	+
Cumarinas	+	+	+	-	+	+	+	-
Esteróides	-	-	+	+	+	+	+	+
Triterpenos	-	-	+	+	-	-	+	+
Alcaloides	+	+	+	-	+	+	+	-
Saponinas	+	+	+	+	++	+	+	+
Heterosídeos cardiotônicos	++	+	+	+	++	+	+	+

FJ: folhas novas; FM: folhas maduras; CJ: caules novos; CM: caules maduros; Testes: Fortemente positivo (+++), Moderadamente positivo (++), Fracamente positivo (+), Parcialmente positivo (±) e negativo (-).

Em relação ao grau de umidade, foram detectados compostos secundários tanto nas folhas verdes (Melo, 1998; Melo e Dantas-Barros, 1999) quanto nas dessecadas (Carvalho et al., 2006, Riet-Correa et al., 2009). No que diz respeito à palatabilidade, Melo (1998) e Melo e Dantas-Barros (1999) afirmaram que as folhas maduras apresentam baixa palatabilidade devido à presença de taninos condensados, enquanto que os brotos são mais palatáveis e tóxicos.

Mais recentemente, Arruda et al. (2017) detectaram a presença de monofluoracetato na espécie *N. stannea*, atribuindo à causa de falência cardíaca aguda em bovinos experimentalmente intoxicados.

As intoxicações são comuns na época da seca (agosto a outubro) quando os animais têm acesso restrito ao alimento e a planta se mantém verde na pastagem (Melo, 2006; Carvalho et al., 2006). Entretanto, em um surto no Mato Grosso do Sul em 2004 e 2005, os bovinos consumiram a planta apesar da boa disponibilidade de forrageira nas pastagens (Carvalho et al., 2006).

A intoxicação espontânea ocorre em bovinos e bubalinos e, experimentalmente, verificou-se que caprinos (Melo, 1998; Melo et al., 2001; Campos et al., 2004) e ovinos (Riet-Correa et al., 2005) também são susceptíveis. A dose capaz de causar intoxicações com alterações cardíacas varia entre as espécies e, segundo dados experimentais, ocorre intoxicação em bovinos com 5g/kg/dia durante 60 dias; 10g/kg/dia durante 13 a 41 dias e 20g/kg/dia durante 10 dias (Tokarnia et al., 2000).

Em estudo experimental com cabras gestantes (entre 30 a 40 dias de gestação), após a ingestão de folhas de *N. multiglandulosa*, abortamentos ocorreram oito semanas após a ingestão de 10 g/kg/dia e, quatro semanas após a ingestão de 20g/kg/dia (Melo et al., 2001; Campos et al.,

2004). Em ovinos, também experimentalmente, foram relatados abortamentos após ingestão de 6g de folhas/kg/dia, durante 30 dias e 3g de folhas/kg/dia durante 60 dias (Riet-Correa et al., 2005).

2.1.4. Sinais clínicos da intoxicação

A intoxicação em bovinos determina quadro subagudo ou crônico, sendo que o período patente é dependente da quantidade diária da planta ingerida (Tokarnia et al., 1989; Riet-Correa et al., 2005, Caldas et al., 2010). Os sinais clínicos são associados à necrose e, conseqüentemente, fibrose do coração pela cicatrização do tecido lesado, resultando em insuficiência cardíaca congestiva que leva a edema, ingurgitamento das veias jugulares, pulso venoso positivo, arritmia cardíaca e fraqueza (Gava et al., 2001; Tokarnia et al., 2000; Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009; Caldas et al., 2011, Arruda et al., 2017). Também são observados sinais como apatia, letargia, dificuldade de locomoção, tremores musculares (Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009; Arruda et al., 2017), fezes ressecadas, anorexia, dispnéia e ocorrência de abortamentos em qualquer fase gestacional ou nascimento de neonatos fracos que logo morrem (Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009).

Melo (1998), após administração de duas doses de folhas verdes e maduras de *N. multiglandulosa* (10 e 20mg/kg) para cabras com 30 a 40 dias de gestação, verificou, ao exame de ultrassonografia, líquido amniótico hiperecoico, diminuição gradativa dos batimentos cardíacos fetais e menor desenvolvimento fetal ao longo da gestação, culminando com 100% de morte fetal, seguida de abortamento. Também foi relatada a redução dos batimentos cardíacos nas cabras ao longo da gestação, sem ocorrência de arritmia, estando essa redução correlacionada à ação de alcaloides quaternários presentes na planta que, possivelmente, acarretaria estímulo vagal e bradicardia.

Ovinos que ingeriram dose menor de *Niedenzuella* spp (3 e 6g/kg) apresentaram sinais clínicos de cardiomiopatia e neuropatia semelhantes ao que ocorre em bovinos, inclusive com fibrose cardíaca e espongiose ou *status spongiosus* (edema extracelular, vacuolização da bainha de mielina ou tumefação dos corpos neuronais da substância branca) do sistema nervoso central (SNC) observados no exame histológico (Riet-Correa et al., 2005 e 2009). Os sinais clínicos progrediram mesmo após a suspensão da ingestão de *Niedenzuella* spp em ovinos (Riet-Correa et al., 2005) e bovinos (Carvalho et al., 2006).

2.1.5. Achados macro e microscópicos

Niedenzuella spp causa lesões necrótico-degenerativas e afeta principalmente órgãos como coração, fígado e sistema nervoso. Na necropsia são relatados hidrotórax, hidropericárdio, fibrose cardíaca, ascite e fígado com aspecto de noz moscada. Microscopicamente, o coração apresenta edema intra e extracelular, necrose, vacuolização e atrofia de fibras, infiltrado inflamatório e fibrose. No fígado observa-se congestão, edema, vacuolização (Tokarnia et al., 1989; Melo, 2006; Almeida et al., 2008; Riet-Correa et al., 2009; Caldas et al., 2011) e fibrose hepática (Caldas et al., 2011). Nos rins de animais experimentalmente intoxicados com 20g/kg de *N. stannea* observou-se degeneração hidrópico-vacuolar e necrose nas células epiteliais (Arruda et al., 2017).

Animais que manifestaram alterações clínicas nervosas geralmente apresentam espongiose e edema no SNC (Carvalho et al., 2006; Almeida et al., 2008; Riet-Correa et al., 2009; Caldas et al., 2010), uma alteração que também pode ocorrer em fetos de ovinos (Riet-Correa et al., 2009)

e bovinos (Caldas et al., 2011), abortados ou natimortos. Fetos abortados de vacas podem apresentar petéquias no epicárdio, fibrose e edema de coração e fígado em aspecto de noz moscada (Tokarnia et al., 1989; Caldas et al., 2011).

2.1.6. Fatores envolvidos na patogênese das lesões

Apesar de a etiopatologia clínica ser relacionada às alterações cardíacas e já terem sido identificados alguns grupos das fitotoxinas (Melo, 1998, Riet-Correa et al., 2005; Caldas et al., 2011), a patogênese das lesões ainda é desconhecida. Plantas como trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*), soja (*Glycine* sp) e alfafa (*Medicago sativa*) possuem fitoestrógenos com atividade uterotrópica como isoflavonas e lignina que causam infertilidade em ruminantes devido ao hiperestrogenismo. Santos et al. (1998), avaliando ratas ovariectomizadas e tratadas com extrato aquoso de *N. multiglandulosa* (40g/kg/dia), não observaram alterações macro e microscópicas significativas nos órgãos examinados, além de relatarem a hipotrofia uterina, resultante da ovariectomia. Diante destes resultados, os autores concluíram que a *N. multiglandulosa* não possui atividade uterotópica e sugeriram ausência de fitoestrógenos nessa espécie.

Cabras necropsiadas após abortamento causado por ingestão de 10 e 20g/kg/dia de *N. multiglandulosa* por seis e duas semanas, respectivamente, não apresentaram lesões cardíacas relacionadas à planta, mas foram observadas placentite com apoptose de células trofoblásticas binucleadas, endometrite, necrose de coagulação das carúnculas e apoptose das células cotiledonárias. Nos 13 fetos abortados, macroscopicamente foi detectado subdesenvolvimento, com presença de alterações vasculares generalizadas, além do relato de um feto mumificado. Microscopicamente havia autólise, congestão hepática em um feto e hemorragia pulmonar petequiral em outro (Melo, 1998; Melo et al., 2002). Não foi observada qualquer alteração congênita fetal, sugerindo que o tamanho reduzido dos fetos foi induzido pela insuficiente nutrição placentária sobre os anexos fetais causando necrose e intensificando ou induzindo a precocidade de apoptose devido à ação dos flavonoides, alcaloides quaternários e esteroides (Melo, 1998; Melo et al., 2001). Apesar de a apoptose ser processo fisiológico e normal da maturação placentária (Nunes et al., 2001), nesse estudo, essa esteve correlacionada à ação das fitotoxinas e caracterizada disfunção placentária. Cabras que ingeriram folhas de *N. multiglandulosa* apresentaram índice apoptótico placentário significativamente maior que o grupo controle (que não ingeriu a planta), sugerindo que a planta possui propriedades apoptóticas que não dependem da dose ingerida (Campos et al., 2004).

No estudo de Riet-Correa et al., (2009), usando ovelhas gestantes entre de 90 a 120 dias tratadas com extrato seco de *N. multiglandulosa*, na dose de 1,0 g/kg, houve nascimento de cordeiros fracos que morreram logo após o nascimento. Doses maiores, entre 1,5 a 3 g/kg do extrato, para ovelhas com mais de 90 dias de gestação resultaram em abortamentos entre 117 até 134 dias, com um caso de mumificação fetal (1/8). Dose de 1,5 g/kg para ovelhas com mais de 120 dias de gestação levou ao nascimento de cordeiros fracos que se recuperaram (2/4) ou foram eutanasiados pelo grave quadro clínico (2/4). Ao exame histológico dos órgãos dos fetos de cordeiros foram relatados espongiase no SNC, fibrose e necrose cardíaca. Nas ovelhas eutanasiadas (4/24), duas apresentaram áreas de fibrose cardíaca multifocal, e, duas, espongiase cerebral e cerebelar e vacuolização de hepatócitos.

Melo (1998) e Melo et al. (2001) hipotetizaram que a morte dos fetos caprinos estaria correlacionada à lesão placentária e dos anexos, com redução ou inibição da vascularização, levando à falha na oxigenação e nutrição fetal, resultando em bradicardia e subdesenvolvimento.

Diferentemente desta hipótese, Riet-Correa et al. (2009) e Caldas et al. (2011) correlacionaram a morte fetal com a ação de fitotoxinas que atravessariam a barreira placentária, agindo sobre o miocárdio fetal, já que, estes autores encontraram fibrose cardíaca nos fetos de ovinos e bovinos, respectivamente.

Os sinais clínicos e patológicos de intoxicação por *Niedenzuella* spp são semelhantes às produzidas por *Ateleia glazioviana* (timbó, maria-preta) em bovinos e ovinos no noroeste do Rio Grande do Sul e oeste de Santa Catarina, ocorrendo neuropatia (letargia, incoordenação motora, cegueira), cardiomiopatia (edema, ingurgitamento de veia jugular, bradicardia) e abortamentos (Gava et al., 2001; Gava e Barros, 2001; Raffi et al., 2004). A intoxicação de bovinos e ovinos com *A. glazioviana* causa alterações histopatológicas caracterizadas principalmente por necrose e fibrose de miocárdio, e degeneração espongiiforme da substância branca do encéfalo (Gava et al., 2001; Stigger et al., 2001). O princípio tóxico dessa planta não é conhecido, mas sugere-se que *A. glazioviana* possua fitotoxinas semelhantes à *Niedenzuella* spp (Almeida et al., 2008; Riet-Correa et al., 2009).

Considerando esses estudos, sugere-se que a patogênese das lesões no miocárdio e no SNC seja produzida diretamente pelas toxinas da planta que causam alterações necrótico-degenerativas. Ocorre lise de cardiomiócitos e edema intersticial, resultando em fibrose e isquemia; e edema intramielínico que promove menor velocidade na condução dos impulsos ou bloqueio da transmissão nervosa, levando à alterações neurológicas (Riet-Correa et al., 2005; Santos e Alessi, 2010; Caldas et al., 2011).

2.1.7. Diagnóstico diferencial

Os casos de intoxicação por *Niedenzuella* spp devem ser diferenciados de outras doenças que causam insuficiência cardíaca como endocardite, leucose e retículo-pericardite traumática (Radostits et al., 2002). As lesões cardíacas macroscópicas devem ser diferenciadas de intoxicação por *Senna (Cassia) occidentalis* e monensina, deficiência de selênio e vitamina E (Tokarnia et al., 2000), e os casos de abortamentos devem ter diagnóstico diferencial de causas infecciosas como brucelose e leptospirose (Radostits et al., 2002).

Outras plantas tóxicas devem ser consideradas nas causas de abortamentos e mortalidade neonatal. *Aspidosperma pyriformium* (pereiro) causa mortalidade embrionária, fetal e prematuridade de parto em cabras com ausência de teratogenicidade e de lesões na placenta e nos fetos (Riet-Correa et al., 2012), e mortalidade fetal e redução do peso dos filhotes em ratas (Lima, 2011). *Mimosa tenuiflora* e *Ipomea carnea*, além de causarem mortalidade embrionária e fetal, também causam malformações (Schwarz et al., 2003; Dantas et al., 2010; Júnior et al., 2013) divergindo dos abortamentos por *A. glazioviana* (García y Santos et al., 2004), *N. acutifolia* (Caldas et al., 2011) e *N. multiglandulosa* (Melo, 1998; Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009).

Pinus ponderosa (pinho) possui como composto tóxico o ácido isocuprêssico, bloqueando a produção de progesterona pelo corpo lúteo (Wu et al., 2002) e causa abortamentos no terceiro trimestre da gestação, parto prematuro, natimortalidade e nascimento de animais com baixo peso e fracos (Wang et al., 2004). As perdas gestacionais foram correlacionadas à vasodilatação caruncular e redução da oxigenação fetal (Ford et al., 1999).

2.2. COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA (*Oryctolagus cuniculus*)

O coelho Nova Zelândia tem se apresentado como um importante modelo para estudos na área de reprodução (Carter, 2007; Püschel et al., 2010; Fisher et al., 2012; Skoda et al., 2017). As

fêmeas saudáveis e em condições ambientais favoráveis mantêm-se em ciclicidade ovariana constante e acasalam praticamente ao longo de todo o ano. Além disso, apresentam gestação curta (28-32 dias) otimizando as pesquisas (Püschel et al., 2010).

2.2.1. Puberdade

A raça Nova Zelândia é classificada entre as raças de tamanho médio na cunicultura, desse modo, as fêmeas entram em idade reprodutiva aos quatro a cinco meses de idade, enquanto os machos entre seis e sete meses (Sirois, 2008; Fisher et al., 2012). A fêmea estará apta para o acasalamento quando apresentar aproximadamente 80% do seu peso quando adulto, isto é, 3,6 a 4kg para a raça Nova Zelândia Branco, o que geralmente ocorre aos cinco meses de idade (Ferreira et al., 2012).

2.2.2. Anatomia do sistema genital da coelha

O útero dos lagomorfos é duplo, apresentando dois cornos e ausência de corpo uterino. Cada corno se liga à cérvix ipsilateral, portanto, são duas cérvices distintas que se abrem diretamente na vagina (Senger, 2003; Sirois, 2008, Fisher et al., 2012). Essa característica permite que a coelha possa ser inseminada artificialmente por sêmen de dois machos diferentes porque não há migração transuterina de gametas ou embriões nessa espécie, gerando láparos com dois genótipos diferentes (Senger, 2003; McArdle et al., 2009).

2.2.2. Ciclo estral

As fêmeas apresentam folículos maduros continuamente nos ovários, com variação sazonal na receptividade sexual. A ovulação é induzida por um reflexo neuroendócrino por meio do estímulo sexual do macho no momento do coito, similar aos felídeos, e ocorre aproximadamente 10 horas após o acasalamento (Sirois, 2008; Fisher et al., 2012; Marongiu e Dimauro, 2013). A gestação dura de 29 a 35 dias, com ninhada de 4 a 12 filhotes (Sirois, 2008) que nascem com peso médio de 54g (Ferreira et al., 2012).

2. 2. 3. Pré-implantação e implantação

O oócito fecundado chega ao útero no início do quarto dia após a cópula (72-74 horas). No sétimo dia, com aproximadamente cinco milímetros de diâmetro, os blastocistos começam a ter uma posição fixa no lúmen uterino, com espaço homogêneo e apresentam expansão bem marcada localmente. No oitavo dia, a zona pelúcida do blastocisto se rompe estabelecendo o primeiro contato orgânico com o tecido materno (Amoroso, 1952).

A implantação depende de saúde embrionária e um útero receptivo, em sincronia com a fase de desenvolvimento embrionário. Em humanos, 75% das perdas gestacionais, nas primeiras 20 semanas, ocorrem durante a fase de implantação. Para que o embrião seja implantado é fundamental o reconhecimento materno da gestação, que depende do controle mútuo temporal e sinais locais, com receptividade epitelial do endométrio e decidualização das células do estroma. A expressão da proproteína convertase 5/6 (PC 5/6) é necessária para remodelação uterina através de células deciduais e epiteliais na coelha. Essa proproteína ativa precursores latentes de proteínas e as converte na sua forma biologicamente ativa, regulando proliferação celular,

invasão e adesão, permitindo a aderência do blastocisto na superfície apical do epitélio (Nicholls et al., 2011).

2.2.4. Placentação

As coelhas desenvolvem placenta corioalantoide discoidal (Figuras 4 e 5), decídua, com interdigitação labiríntica, diferenciando da placenta de humanos, que apresenta interdigitação por vilosidades (Wooding e Burton, 2008; Furakawa et al., 2014; Carter, 2015; Enders e Carter, 2016). A interface materno-fetal é do tipo hemocorial, em que todas as camadas teciduais maternas desaparecem e o córion é envolto diretamente pelo sangue materno, similar à placenta humana e dos roedores (Wooding e Burton, 2008; Carter, 2015; Enders e Carter, 2016). O córion persiste em todas as placentas corioalantoídes, mas é extremamente fino e não pode ser visualizado ao microscópio óptico (Wooding e Burton, 2008).

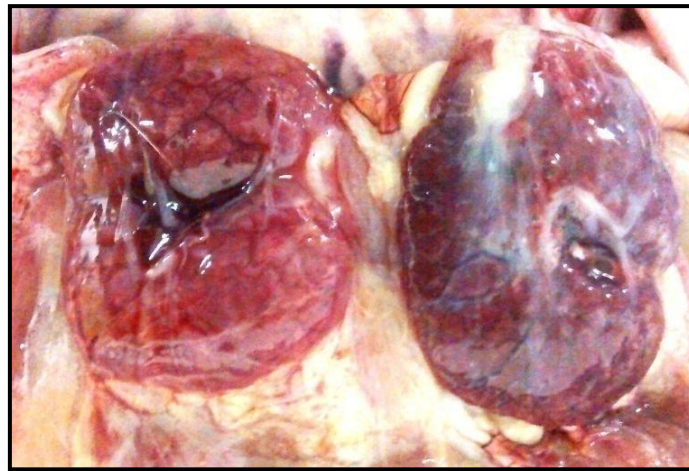


Figura 4. Placenta discoide da coelha.

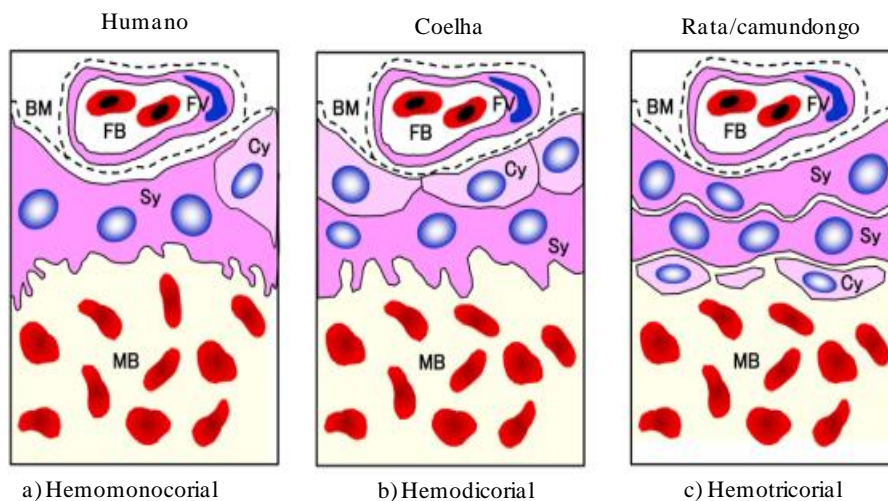


Figura 5. Classificação da placenta hemocorial pela relação entre o córion e a parede uterina. BM: membrana basal; Te: trofoectoderma; Cy: citotrofoblasto; FB: sangue fetal; FV: vaso fetal; MB: sangue materno; Sy: sincitiotrofoblasto. Fonte: Adaptado de Furukawa et al., 2014.

A placenta dos lagomorfos é do tipo hemodivisional, isto é, há duas camadas de córion entre o sangue materno e fetal, se assemelhando mais à placenta humana (hemomonocorial) do que à placenta hemotricorial de ratos e camundongos (Wooding e Burton, 2008; Fisher et al., 2012; Enders e Carter, 2016; Skoda et al., 2017). Histologicamente, a placenta das coelhas é constituída pela zona labiríntica, zona juncional, a zona decídua de necrose, a zona decídua de separação e o mesométrio (Figura 6) (Furukawa et al., 2014). A zona labiríntica é formada por duas camadas de trofoblastos, a externa, em contato com o sangue materno, e a interna, que entra em contato com os vasos sanguíneos fetais (Enders, 1965; Furukawa et al., 2014). O trofoectoderma externo é composto pelos sinciciotrofoblastos (células multinucleadas) que se ligam por junções aderentes nos citotrofoblastos (mononuclear) do trofoectoderma interno subjacente (Larsen, 1962; Furukawa et al., 2014).

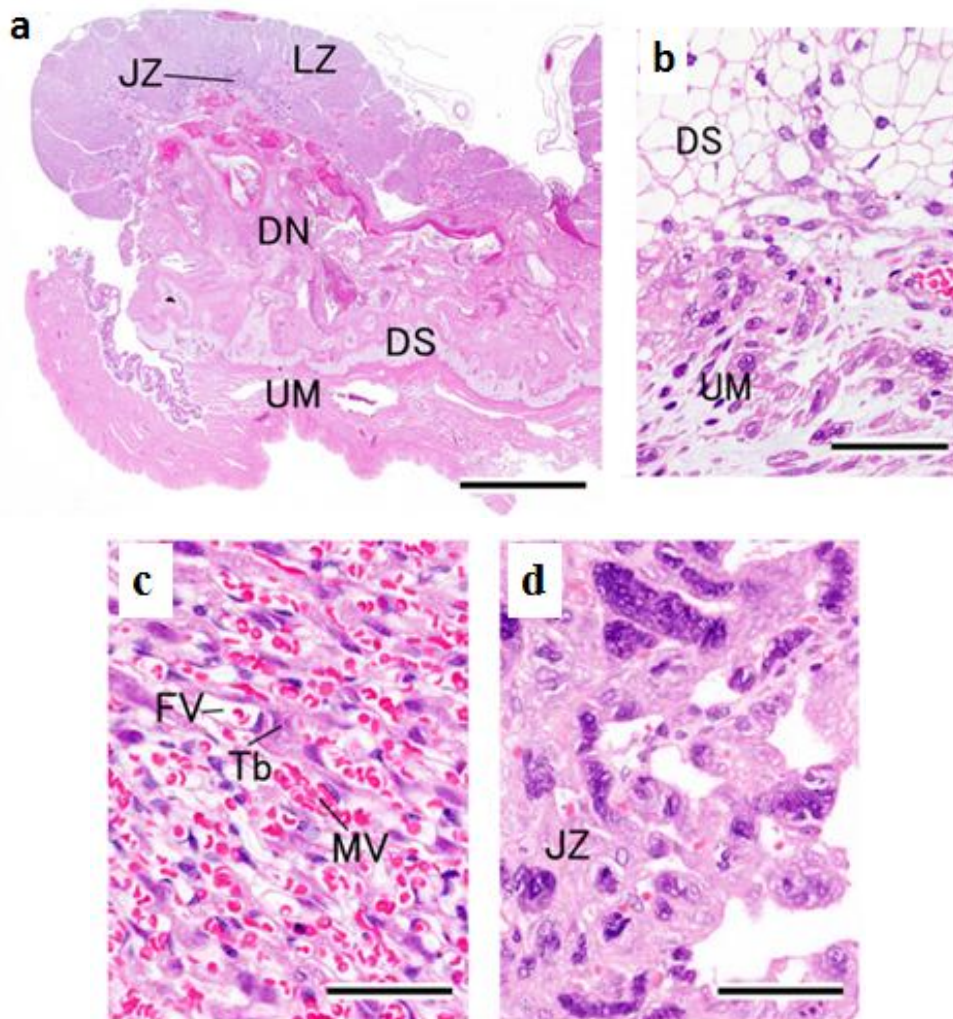


Figura 6. Coelha: placenta. Placenta aos 28 dias de gestação. a) Sessão histológica, HE, barra=3mm. b) Decídua, HE, barra=60 μ m. c) Zona labiríntica, HE, barra=60 μ m. d) Zona juncional, HE, barra=60 μ m. DN, decídua, zona de necrose; DS, decídua, zona de separação; EC, célula epitelial; FV, vaso fetal; JZ, zona juncional; LZ, zona labiríntica; MV, vaso materno; Tb, trofoblasto; UM, músculo uterino. Fonte: Furukawa et al., 2014.

A decídua, fração materna da placenta, é originada pelas células estromais do mesométrio endometrial e é composta pela zona de necrose e zona de separação. A zona de necrose se desenvolve pela dilatação dos vasos sanguíneos com o avançar da gestação. Ela se encontra subjacente à zona de junção e é constituída por tecido necrótico. A zona de separação, paradoxalmente à zona necrótica, se torna mais fina com o decorrer das semanas gestacionais (Furukawa et al., 2014).

A formação da placenta é iniciada no momento da implantação (7,5 dias após a fecundação), mas as suas características são totalmente expressas somente aos 12 dias de gestação. As glândulas uterinas são invadidas pelo trofoblasto e substituídas completamente por células multinucleadas decíduais aos 20 dias de gestação (Amoroso, 1952). O desenvolvimento placentário é rápido na primeira metade da gestação, entretanto o ganho de peso fetal é mais pronunciado na segunda metade com grande aumento das trocas materno-fetal, principalmente devido ao aumento da circunvolução da superfície de troca, assim como acontece em primatas (McArdle et al., 2009).

A placenta hemocorial é abundante em retículo endoplasmático, particularmente nas áreas intimamente associadas com o espaço sanguíneo materno. Na coelha, a camada externa do trofoblasto, é rica em retículo endoplasmático granular enquanto na camada interna ele é escasso. O retículo endoplasmático tem a função de produzir proteínas e quanto menor é a distância de difusão entre o espaço materno e o fetal, maior será a eficiência de utilização de energia na síntese proteica (Enders, 1965).

2.3. EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

Estudos da morfologia de fetos de coelhos são inexistentes. A realização de exames ultrassonográficos durante a gestação é importante para se avaliar a viabilidade e desenvolvimento fetal, a maturidade placentária, anomalias congênitas (Léga et al., 2007; Bezerra et al., 2013; Fortes et al., 2013) e a determinação da idade gestacional por avaliação do diâmetro biparietal do crânio dos fetos (Nyland e Mattoon, 2004; Silva et al., 2007; Silva et al., 2013). O diâmetro biparietal corresponde à mensuração da largura do crânio fetal e, além de auxiliar na determinação da idade dos fetos, colabora na avaliação de alterações do desenvolvimento (Silva et al., 2013).

A ultrassonografia também permite a avaliação da anatomia fetal, dependendo da idade gestacional e da espécie. Pode-se acompanhar a organogênese e a arquitetura de ventrículos cerebrais, coração, coluna vertebral, ossos longos, estômago, bexiga urinária e rins, permitindo identificar anomalias e determinar a funcionalidade dos principais órgãos fetais (Nyland e Mattoon, 2004; Beltrame et al., 2010). A frequência cardíaca também pode ser avaliada e serve como instrumento para indicar viabilidade fetal (Beltrame et al., 2010; Sklansky et al., 2010). Para o estudo com plantas tóxicas de potencial abortivo, a ultrassonografia gestacional auxilia na determinação do momento em que ocorrem alterações no desenvolvimento, na organogênese e morte fetal, assim como a gravidade dessas alterações. E, como é um método não invasivo e não radiogênico, a ultrassonografia não causa danos aos fetos e não interfere nas pesquisas realizadas durante a fase embrionária e fetal (Beltrame et al., 2010; Castro et al., 2011).

Em coelhas, a gestação geralmente é confirmada por palpação abdominal aos 10-12 dias pós-coito por práticos experientes (Ypsilantis, 1999). A ultrassonografia permite diagnóstico gestacional precoce e acurado a partir de sete dias pós-cópula, em que pode ser visualizado a vesícula embrionária com diâmetro médio de 8mm (Ypsilantis, 1999; Gutierrez e Zamora,

2004). O diâmetro da vesícula embrionária não sofre interferência pela quantidade de blastocistos, idade e raça da fêmea (Gutierrez e Zamora, 2004).

2.4. TOXICOLOGIA E EMBRIOLOGIA

Os estudos toxicológicos em embriões e fetos mostraram a sua importância nos meados de 1950, quando se descobriu que a talidomida causava malformação congênita, derrubando a teoria de que os fatores genéticos eram responsáveis por todas as alterações congênitas. Na mesma década, se descobriu por meio de estudos toxicológicos em roedores que a anoftalmia e microftalmia, reportado em suínos em 1930, era consequência da hipervitaminose A (Hood et al., 2002).

Considerando-se que os surtos de intoxicação e os estudos experimentais mostram a *Niedenzuella* sp. como uma planta abortiva ou que causa nascimento de neonatos fracos (Mello, 1999; Riet-Correa et al. 2009; Carvalho et al., 2011), é importante determinar a fisiopatogênese do abortamento e se a planta é capaz de causar danos ao embrião.

Apesar da sensibilidade do embrião, a maioria das suas células são totipotentes. Assim, geralmente há morte embrionária ou as células se renovam onde ocorre injúria (Hood et al., 2002). Na fase de gastrulação, quando é formado o endoderma, mesoderma e ectoderma, nem todas as células são totipotentes, então um insulto resulta na morte do conceito ou reabsorção embrionária. A organogênese é o estágio mais complexo do desenvolvimento pré-natal e, conseqüentemente, agentes exógenos podem interferir gravemente na formação do conceito (Hood et al., 2002). As fases de desenvolvimento embrionário e fetal de coelhos estão exemplificadas na tabela 2.

Tabela 2. Estádios de desenvolvimento gestacional de coelhos (dias).

Implantação	Desenvolvimento primitivo	Início da diferenciação	Final da organogênese	Parto
7,5	7,25	9	18	30-32

Adaptado de DeSesso (1997).

Os efeitos de um agente tóxico no desenvolvimento embrionário e fetal dependem da sua natureza, dose, estágio de desenvolvimento do conceito durante a fase de exposição, e fatores que modificam a toxicidade, como genótipo do conceito (espécie/raça), ambiente materno e a placenta. A organogênese é o estágio mais sensível à injúria, mas cada órgão ou sistema tem seu período crítico e desse modo, diferentes momentos de exposição promovem lesão em diferentes órgãos/sistemas (Hood et al., 2002). A placenta geralmente não sofre lesão por substâncias químicas, mas a sua interação com substâncias específicas pode alterar a sua função, como é o caso do metilmercúrio que inibe o transporte de aminoácidos (Hood et al., 2002) e da swainsonina da *Ipomea* sp que inibe a Golgi monosidase II (Gotardo et al., 2012; Oliveira Júnior et al., 2013).

Segundo os dados da literatura, a *Niedenzuella* sp causa abortamento em diferentes fases da gestação, e a exposição mais tardiamente à planta resulta em natimortos ou nascimento de crias fracas (Melo, 1999; Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009, Tokarnia, 2012). Em relação ao seu efeito durante a embriogênese, não existem dados porque os estudos experimentais foram

realizados no meio ou final da gestação (Melo, 1999; Riet-Correa et al., 2009) e, nos casos de intoxicação natural, geralmente o que se vê é o abortamento e não foi feita correlação com perdas embrionárias ou reabsorção (Tokarnia, 1989; Carvalho et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se folhas de *N. multiglandulosa* possuem potencial de induzir perda embrionária *in vivo* e abortamentos em coelhas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar os efeitos da ingestão de folhas de *N. multiglandulosa* em coelhas, em duas fases gestacionais, sobre o perfil hematológico, aspectos ultrassonográficos gestacionais e avaliação anatomohistopatológica no sistema reprodutor, placenta e feto de coelhas.

Determinar o potencial embriotóxico da planta, em embriões bovinos *in vitro*, na fase de mórula e blastocisto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA), sob o protocolo número 388/2016.

4.1. LOCAL, PLANTA E ANIMAIS

As folhas verdes de *N. mutiglandulosa*, fornecidas aos animais, foram coletadas nos Canteiros de Plantas Tóxicas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

A fase experimental *in vivo* foi realizada no galpão de Reprodução Animal da Escola de Veterinária; e a fase *in vitro* foi realizada no Laboratório de Células Embrionárias e Animais Transgênicos da EV-UFMG.

Quinze coelhas adultas da raça Nova Zelândia Branco (*Oryctolagus cuniculus*) sexualmente maduras, entre quatro e cinco meses de idade, com peso médio de 3,2kg, foram avaliadas previamente por exames clínicos e laboratoriais (hematológicos e bioquímicos séricos) e, então, utilizadas neste estudo.

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL *in vivo*

Após 15 dias do período de adaptação, as coelhas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos (n=5) e cada fêmea foi levada à gaiola para cópula por um coelho macho (total de quatro machos), saudável e sexualmente maduro. O coito foi observado e a data registrada.

Folhas inteiras da planta *N. multiglandulosa* (10g/kg p.v.) foram fornecidas para dois grupos de coelhas hípidas em duas fases gestacionais: **grupo 1** - 12 dias pós-cópula (início da placentação); **grupo 2** - 21 dias pós-cópula (período em que a placentação está completa). O **grupo 3** – controle, foi formado por coelhas gestantes que não receberam a planta. A

confirmação da gestação foi feita na segunda semana após a cópula, pela observação das vesículas embrionárias por meio da ultrassonografia transabdominal (Ypsilantis e Sratsis, 1999).

As coelhas foram alimentadas, durante o dia, com ração comercial específica para animais adultos da espécie (*ad libitum*). Às 19h, a ração foi retirada e os animais ficaram em jejum por 12h. De manhã foram fornecidas as folhas de *N. multiglandulosa* e, após a ingestão completa, a ração foi novamente disponibilizada. A água foi fornecida *ad libitum* em bebedouro do tipo chupeta. Esse procedimento foi feito em todo o período experimental, até o parto.

Os parâmetros vitais (temperatura retal, frequências cardíaca e respiratória, foram avaliados diariamente, entre 9 e 10h00 da manhã. Os animais foram acompanhados por ultrassonografia trans-abdominal, uma vez por semana, para avaliação do desenvolvimento fetal e batimentos cardíacos dos conceptos.

Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular para avaliação hematológica (eritrócitos, volume globular, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, RDW e plaquetas) e bioquímica sérica (creatinina, ureia, creatina quinase, creatina quinase isoenzima MB, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamyltransferase, proteína total, albumina e globulinas) antes administração da planta (tempo zero) e após abortamento/parto (tempo final). A avaliação hematológica foi realizada em contador de células, Sysmex Poch-100iVDiff™, e a avaliação do perfil bioquímico no aparelho Cobas Mira® - Roche, seguindo protocolo de kits comerciais Bioclin S.A.

4.2.1 Exame ultrassonográfico gestacional

Foi realizada ultrassonografia transabdominal (Mindray M5, transdutor linear 5 MHz) durante a gestação, semanalmente, de todas as coelhas, somando-se um total de 10 avaliações por grupo. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e as regiões abdominais ventral e lateral tricotomizadas, sem sedação e acompanhados pelo experimentador.

Avaliou-se um feto de cada corno uterino analisando-se aspectos morfológicos e morfométricos, o desenvolvimento dos órgãos, ecogenicidade óssea baseada no artefato de sombra acústica do esqueleto, morfometria biparietal da cabeça e frequência cardíaca. A cabeça fetal foi mensurada a partir de quando se apresentou distinguível do corpo e foi abordada em sua distância ou diâmetro biparietal (DBP), na sua maior secção transversal (Figura 7).

A ecogenicidade óssea da cabeça dos fetos foi convertida em valor pixel pelo software IMAGEJ (Java) visando uma mensuração objetiva da imagem ultrassonográfica e comparação estatística entre os grupos.

A tomada de medida em exames ultrassonográficos do comprimento céfalo-caudal é dificultada devido ao feto geralmente apresentar flexão lateral ou dorso ventral segundo Texeira et al. (2009) e, portanto, essa mensuração não foi realizada.

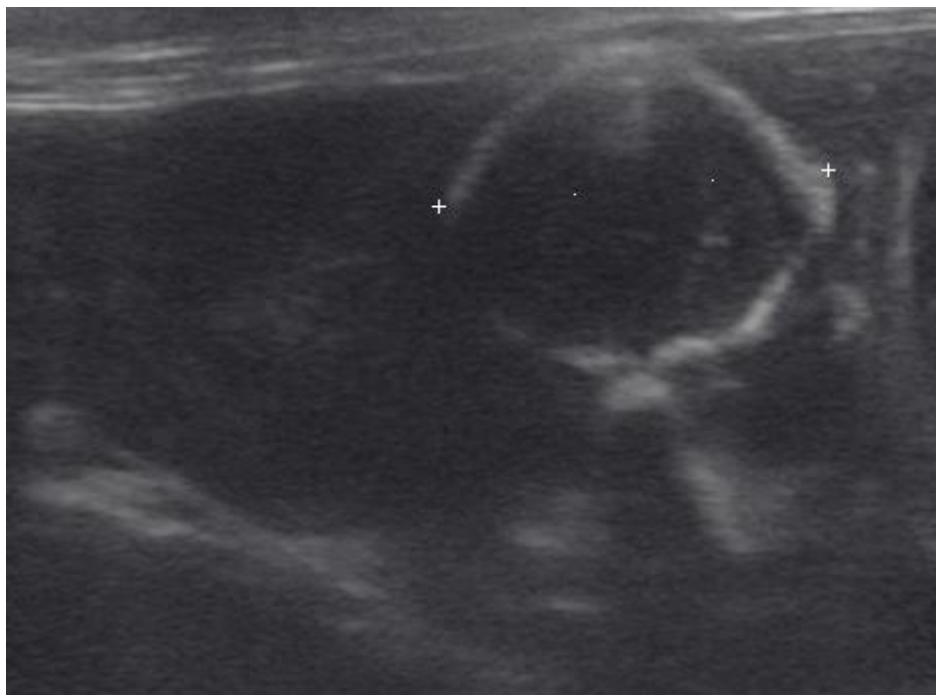


Figura 7. Imagem ultrassonográfica de um crânio de feto de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) de 26 dias de gestação, mostrando a medição do diâmetro biparietal. Corte transversal do crânio medindo 14,2 mm. Frequência utilizada: 10 MHz.

4.2.2. Eutanásia

As coelhas e os láparos foram submetidos à eutanásia após o parto, seguindo as normas do Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia dos Animais e as normativas do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEUA). Desta forma os animais foram eutanasiados com administração de cetamina (20mg/kg/IM) e tiopental sódico em dosagem superior a 90mg/kg, pela via intravenosa (Neto e Santos, 2008).

4.2.3. Avaliação anatomohistopatológica

Foram coletados fragmentos de placenta, útero, tubas uterinas, cérvix, ovários, fígado rins, coração, pulmões, baço e sistema nervoso central (SNC) das coelhas. As amostras foram acondicionadas em frascos contendo solução formalina tamponada 10%, para avaliação anatomohistopatológica.

Dos láparos também foram avaliados, macro e microscopicamente, fragmentos de fígado, coração, rins, pulmões, baço e sistema nervoso central (SNC).

Os fragmentos dos tecidos foram processados por meio da técnica de inclusão em parafina (Prophet, 1992), obtendo-se cortes histológicos de 3µm de espessura que foram corados pela hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica.

4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL *in vitro* (FIV)

4.3.1. Obtenção dos oócitos

Ovários de fêmeas bovinas (abatedouro Hipercarnes, Belo Horizonte-MG) foram coletados e transportados para o laboratório em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida à 37°C no período de, no máximo, quatro horas após o abate. Os ovários foram lavados com solução fisiológica, e os folículos de 2 a 8mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de agulhas (40x12mm) acopladas a seringa de 3mL e colocadas em solução de tampão fosfato-salino Dulbecco's PBS (Wang et al., 2007). Os complexos *cumulus-oophorus* foram rasteados e classificados em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus-oophorus*, com auxílio de microscópio estereoscópico, segundo Viana et al. (2004).

4.3.2. Maturação *in vitro*

Os complexos *cumulus-oophorus* de grau I (mais de três camadas de células) e II (mínimo de uma camada de células) foram selecionados para maturação *in vitro* e, em seguida, lavados duas vezes em meio TALP-Hepes (Gibco, E.U.A.), uma vez em TCM-199 (Gibco, E.U.A.) e colocados em meio de maturação. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em meio TCM-199 (Gibco, E.U.A.) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 0,5µg/mL de FSH, 5µg/mL LH, 22µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina. Os oócitos foram maturados por 24 horas em gotas de 100µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de Petri de 60x16mm (TPP, Suíça), e incubados a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

4.3.3. Fecundação *in vitro*

Após 24 horas de maturação, os oócitos foram inseminados, utilizando-se sêmen convencional de touro da raça Holandesa, testado previamente para FIV. Os espermatozoides foram preparados utilizando-se o método do gradiente descontínuo de Percoll (SIGMA, P-1644). A fecundação (caracterizando o dia 0, D0) foi realizada em gota de 100µL de meio Talp (Parrish et al., 1995) suplementado com gentamicina (50µg/mL), penicilamina (2,7µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina (5µg/mL), piruvato (22µg/mL) e heparina (10µg/mL). As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas nas mesmas condições da MIV por um período de aproximadamente 18 a 20 horas. Foram utilizados 2 milhões de espermatozoides/mL.

4.3.4. Cultivo dos embriões

Após a FIV, os zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para a retirada mecânica das células dos *cumulus-oophorus*, e, então, divididos ao acaso para o cultivo *in vitro* (CIV) em cinco a seis gotas para cada tratamento. Os embriões foram cultivados *in vitro* por nove dias em gotas de 70 µL cobertas por óleo mineral, em ambiente de incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 95% de umidade. Após 48 horas (D2) do início do cultivo, a taxa de clivagem foi avaliada. No D6 foi avaliada a taxa de produção e a viabilidade dos embriões para a fase de avaliação toxicológica.

4.3.5. Exposição dos embriões ao extrato de *N. multiglandulosa*

O extrato foi obtido de 77g da planta, composto por 60% de folhas maduras, 24% de folhas jovens e 16% de brotos, repetindo a mesma proporção fornecida para os animais. A planta foi colhida no Canteiro de Plantas Tóxicas da Escola de Veterinária da UFMG em junho de 2017.

As folhas e brotos foram trituradas em liquidificador com 500mL de álcool absoluto. Esse material foi deixado em descanso, em um recipiente fechado, por quatro dias à temperatura ambiente, com renovação diária do álcool e armazenamento da solução de álcool e extrato vegetal recuperado. A solução de álcool com o extrato (coloração verde escura) foi concentrada no rotavapor a 65°C em 80 rotações por minuto (rpm), à vácuo, formando um extrato seco de 4,216g. Em seguida, foi adicionado 100mL de água destilada ao extrato e levado para o banho ultrassônico, cujo objetivo foi aumentar a extração dos constituintes fitoquímicos da planta.

Após esse período, o material foi filtrado em filtro de papel qualitativo. Adicionou-se 50mL de acetato de etila à solução filtrada e esta foi colocada no funil de separação. O extrato de etila permaneceu na parte superior do funil de separação e o extrato aquoso na parte inferior, onde pôde ser recuperado. Foram adicionados 70mL de acetato de etila, e essa fase foi repetida até o acetato de etila ficar bem claro. O extrato aquoso, recuperado nesse procedimento, foi submetido ao rotavapor a 65°C em 100 rotações por minuto, para remoção total de acetato de etila. Em seguida, foi misturado com 50mL de álcool butanólico e transferido para o funil de separação. Foram realizados os mesmos procedimentos referentes ao acetato de etila, recuperando-se o extrato aquoso e o extrato butanólico. O extrato aquoso foi novamente concentrado no rotavapor a 68°C em 100 rotações por minuto, correspondendo a 1,545g. Foram retirados 27mg do extrato e diluídos em 1mL de água mili-Q para o teste *in vitro*.

Os embriões no primeiro dia (D1) foram agrupados em dois grupos de cinco a seis gotas de meio de cultivo, compostos por 15 a 20 embriões cada. O grupo 1 (controle) não recebeu nenhum tipo de tratamento. No sexto dia (D6), foram retirados 7µL (10%) de meio de cultivo do grupo 2 e substituído por 7µL de extrato aquoso (perfazendo 0,2mg/gota do extrato de *N. multiglandulosa*). Foi feita a avaliação da viabilidade e eclodibilidade dos blastocistos nos sétimo, oitavo e nono dia (D7, D8 e D9) (dias de cultivo) em microscópio estereoscópico, assim como, a ocorrência de subdesenvolvimento. No D7 foram retirados, em média, três blastocistos de cada tratamento, para fixação em solução formalina a 4%.

4.3.6. Fixação dos blastocistos e análise TUNEL

Os blastocistos (BL) foram retirados da gota de cultivo no D7, lavados três vezes em solução de PBS 1% (tampão fosfato-salino), fixados em solução formalina 4% por 25 minutos, e novamente lavados três vezes em solução de PBS 1%. Em seguida, foram armazenados em 500µL de PBS 1%, refrigerados a 4°C para realização do teste de marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*- TUNEL) (Promega).

O índice apoptótico dos blastocistos foi avaliado pelo TUNEL. Os embriões fixados foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,2%) por 5 minutos, lavados em PBS e equilibrados em tampão de equilíbrio por 10 minutos. Em seguida, foram incubados em solução contendo tampão de equilíbrio, *mix* de nucleotídeos e enzima rTdT por 1h a 37°C em atmosfera umidificada. Foi confeccionado um controle negativo para controle da reação, contendo a mesma solução, porém com substituição da enzima rTdT por água Mili-Q, para não ocorrer a

reação. Após o período de incubação, os embriões foram lavados e transferidos para lâmina silanizada, corados com Vectashield e Hoechst 33342, recobertos com lamínula e observados em microscópio de fluorescência. O número total de células foi obtido a partir da observação das células coradas pelo Hoechst e visualizados em azul com filtro de 460nm. Células (blastômeros) em apoptose foram identificadas pela fluoresceína, corando-se de cor verde, observadas com filtro de 520±20nm.

O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células apoptóticas, através do programa IMAGEJ.

4.4. Análise estatística

Todas as variáveis quantitativas (parâmetros vitais, hematologia, bioquímica sérica, valor pixel da ecogenicidade óssea) foram submetidas à avaliação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e da homocedasticidade pelo teste de Bartlett, e as que respeitarem os princípios foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com comparação de médias pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). As variáveis de amostras pareadas (entre tempos) foram analisadas pelo teste t de Student. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Wilcoxon para comparação das médias e os dados de produção de embriões e técnica TUNEL pelo teste Exato de Fisher. Foi considerada a significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho realizado em animais de laboratório gestantes utilizando-se folhas frescas de *Niedenzuella* sp. Estudos em ratas gestantes (*Rattus norvegicus*) já foram realizados, mas usando extrato aquoso de *N. multiglandulosa* (Langeloh et al., 1992) e, também, em ratos, para induzir infarto de miocárdio (Andrade, 2017).

5.1. GESTAÇÃO E NEONATOS

As coelhas apresentaram variação de 30 a 31 dias do período de gestação, corroborando com a literatura (Sirois, 2008; Ferreira et al., 2012). As folhas verdes de *N. multiglandulosa* não causaram abortamento em coelhas na dose de 10g/kg administradas a partir de 12 dias (19 dias de ingestão) ou 21 dias de gestação (10 dias de ingestão).

Não foram observados sinais clínicos de intoxicação, semelhante ao relatado por Leite et al., (2002), que administraram 4g/kg da planta seca *Ateleia glazioviana*, em ração comercial por quatro meses para coelhos, ratos, camundongos e cobaias. Todavia, quando os mesmos pesquisadores administraram à um ovino a planta seca em estufa (total de 10g/kg dividido para 27 dias), o animal apresentou alterações clínicas cardíacas e, na patologia microscópica, observou-se degeneração cardíaca, congestão hepática e degeneração esponjosa no cerebelo e tronco encefálico. Esses resultados diferem de Langeloh et al., (1992) que usaram extrato aquoso e hidroalcoólico por via oral e Marona et al. (1992) que também utilizaram o mesmo extrato, contudo, por via intraperitoneal, em ratas em todo o período gestacional, relatando menor desenvolvimento ponderal das gestantes, reabsorção embrionária e abortamento.

Uma coelha do grupo 2 (21 dias de gestação), com oito neonatos, apresentou um natimorto com 29,68g. No grupo 1 (12 dias de gestação), um neonato morreu logo após o nascimento,

apresentando 37,14g e outra fêmea apresentou antecipação de parto de um lúpulo (1/7), enquanto os outros ainda estavam viáveis no útero. Como esses achados são comuns na cunicultura, possivelmente, não apresentam relação com a *N. multiglandulosa*.

Nenhum dos neonatos apresentou alterações teratogênicas, assim como observado por Melo (1998) e Melo et al., (2001) em caprinos. Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre o peso dos lúpulos dos três grupos avaliados (Figura 8A), mostrando que a planta não interferiu no desenvolvimento e nutrição *in utero* dos lúpulos.

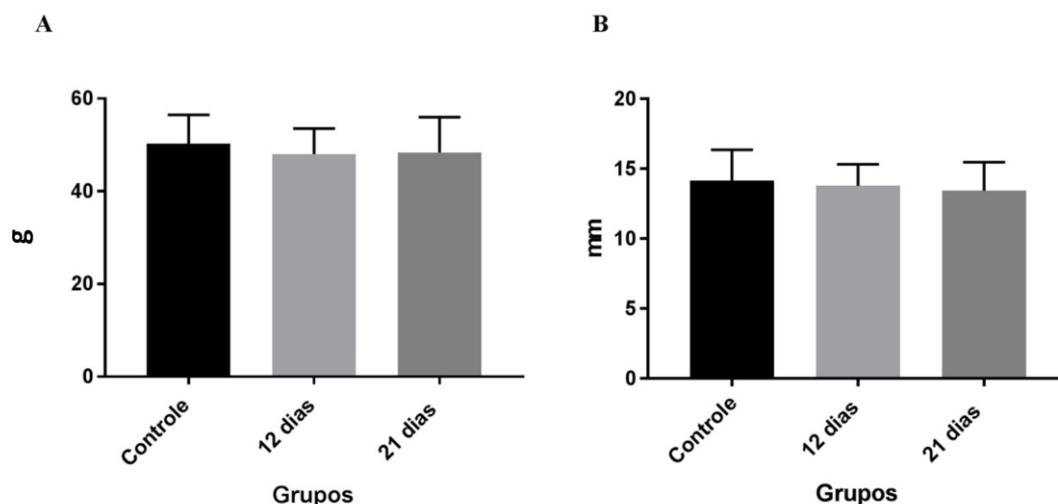


Figura 8. Médias e desvios padrão do peso (g) dos lúpulos ao nascimento (A) e do diâmetro (mm) biparietal do crânio fetal na última semana de gestação (B) dos grupos controle, 12 dias e 21 dias. Análises realizadas com teste *Student Newman Keuls* ($P>0,05$).

5. 2. ULTRASSONOGRAFIA

5.2.1. Diâmetro biparietal

A medição do diâmetro biparietal do crânio fetal é um dado importante no exame ultrassonográfico para avaliar e comparar o desenvolvimento fetal (Figura 8). Essa medida está diretamente relacionada à idade gestacional (Silva et al., 2003; Nyland e Mattoon, 2004) e permite identificar anomalias congênitas (Nyland e Mattoon, 2004; Beltrame et al., 2010). A mensuração foi realizada na última semana de gestação, devido à alteração constante desse parâmetro, e foi avaliado um feto em cada corno uterino. A comparação entre os três grupos não diferiu ($P>0,05$) (Figura 8B).

5.2.2. Ecogenicidade óssea fetal

No exame ultrassonográfico foi observado que, a partir da terceira semana de gestação, as fêmeas dos grupos tratados com *N. multiglandulosa* apresentaram baixa ecogenicidade dos ossos fetais e discreta formação de sombra acústica, artefato que caracteriza a mineralização óssea dos fetos, quando comparados ao controle. As alterações sonográficas mostraram-se mais evidentes nos ossos longos, nas costelas, coluna cervical e no crânio (Figura 9).

A variação de ecogenicidade óssea do crânio dos lúpulos mensurada na última semana de gestação foi convertida em valor pixel pelo software IMAJEJ e está representado na tabela 3.

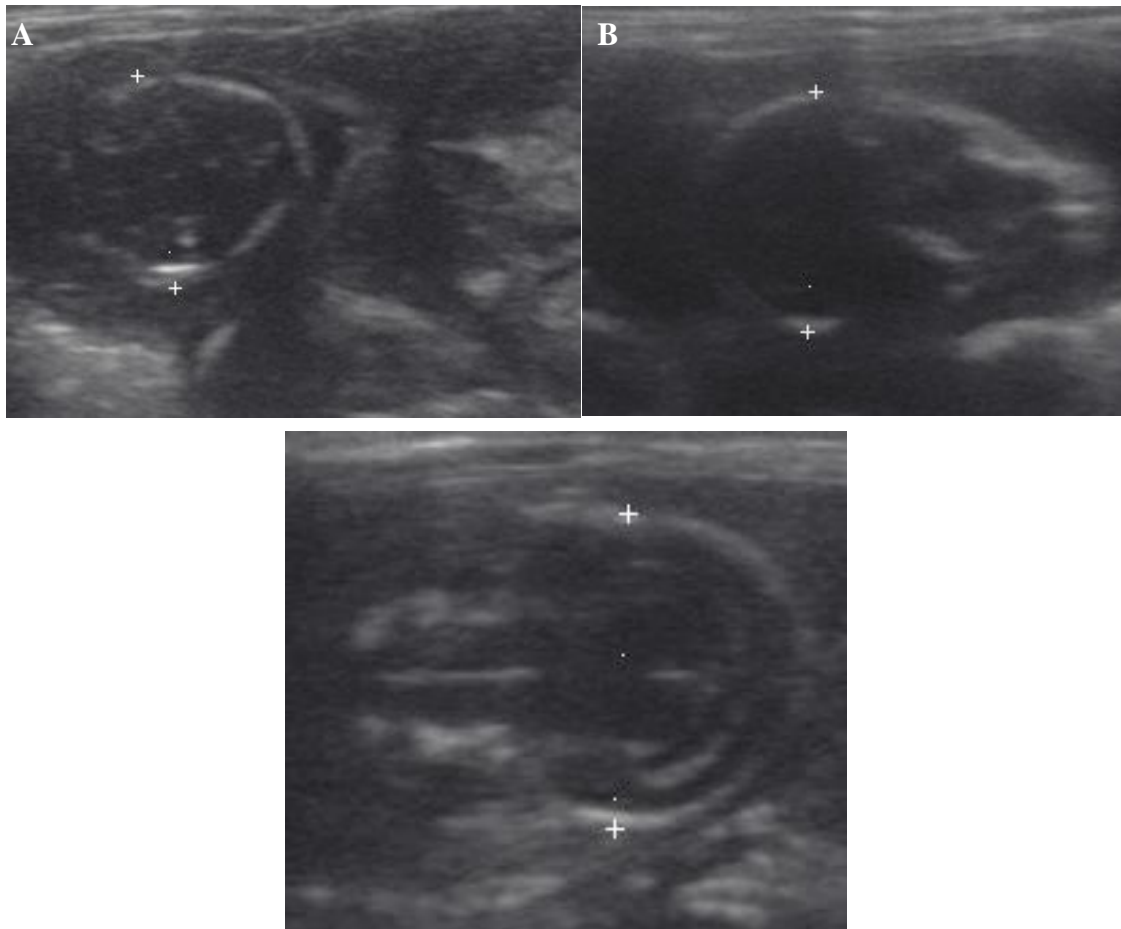


Figura 9. Imagem ultrassonográfica de crânio de feto coelho em corte transversal. A: Controle, 23 dias (de gestação). B: 21 dias (animal 20), 25 dias; C: 21 dias (animal 15), 23 dias. Observa-se uma moderada diferença de ecogenicidade entre A e B. Frequência utilizada: 10 MHz.

Tabela 3. Médias e desvios padrão da ecogenicidade óssea dos fetos na última semana de gestação dos grupos controle, 12 dias e 21 dias em valor pixel mensurado pelo software IMAGEJ.

Parâmetro	Grupos/ desvio padrão		
	Controle	12 dias	21 dias
Ecogenicidade (PIXEL)	118,3 ± 8,7 ^A	81,1 ± 21,5 ^B	94,8 ± 13,8 ^B

As análises foram realizadas para ANOVA e teste Student Newman Keuls. Letras maiúsculas diferentes na linha referem-se a valores com diferença estatística ($P < 0,05$).

O final da gestação é caracterizado pelo pico de velocidade de crescimento do esqueleto fetal e 80% da mineralização óssea ocorre nessa fase (Harvey *et al.*, 2010). A calcificação óssea em fetos da raça Nova Zelândia ocorre entre 16 e 30 dias de gestação. Esse processo se inicia na clavícula (15-16 dias) e ossos da cabeça (18-22 dias), seguida pela escápula, úmero, ulna e rádio (18-19 dias), os metacarpos e falanges (20-21) e a pelve e membros distais seguem o padrão do

esqueleto torácico. As costelas são calcificadas a partir dos dias 18-20 e a coluna vertebral entre os dias 19 (atlas) e 28 (a última vértebra caudal) (Danielson e Kihlström, 1986).

As taxas de cálcio e fósforo no feto, ao contrário do que se imaginava, não são dependentes de 1,25-dihidroxicolecalciferol, sendo que ratas, ovelhas e porcas com deficiência de vitamina D e hipocalcemia apresentaram fetos com mineralização óssea completa (Kovacs, 2003). A mineralização normal do esqueleto fetal é dependente da glândula paratireoide fetal e do adequado transporte de cálcio para a circulação fetal (Kovacs, 2004).

A proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP) regula o transporte de cálcio (Kovacs et al., 1996) e, provavelmente, fósforo (Kovacs, 2004), pela placenta. Ela é produzida por genes de células neuroendócrinas primitivas, como da paratireoide fetal e também do cordão umbilical, amnion e dos trofoblastos da placenta (Kovacs et al., 1996). No entanto, as taxas séricas de cálcio no feto não são determinadas somente pelo gradiente do íon na placenta, mas também pelo fluxo através do esqueleto, pela excreção no rim do feto e pela reabsorção no fluido amniótico. Desse modo o paratormônio, o PTHrP fetal e seus receptores são determinantes na homeostase de cálcio fetal (Kovacs et al., 1996).

Uma das causas da redução óssea é a restrição nutricional intrauterina (Dötsch, 2011). A alteração da ecogenicidade do esqueleto pode estar correlacionada às mudanças de trocas de nutrientes pela placenta que a *Niederzuehlla* sp. poderia causar, inclusive mudanças no aspecto molecular e não necessariamente anatomohistológicas e esse fator pode explicar o nascimento de crias fracas como é citado pela literatura (Carvalho et al., 2006; Riet-Correa et al., 2009; Caldas et al., 2011; Tokarnia, 2012). Além disso, as alterações de mineralização variam entre os fetos de uma mesma fêmea porque as placentas são independentes. Por outro lado, se a planta causar lesão na paratireoide fetal, também poderá resultar em deficiência mineral do concepto. Nesse trabalho não foi possível elucidar a região ou o órgão determinante dessa alteração.

É sugestivo de que alterações da densidade óssea são dependentes do tempo de exposição à *N. multiglandulosa* e a fase de calcificação do esqueleto e, provavelmente, ocorre um efeito cumulativo.

Quando se realizou a imagem radiográfica dos ossos dos láparos (um dia de vida), não foi constatada diferença de radiopacidade porque os ossos são muito pequenos e os raios X não distinguem as diferentes estruturas. Apesar disso, essa é a primeira vez que a planta foi correlacionada com deficiência de mineralização óssea congênita.

5.2.3. Frequência cardíaca fetal

A análise da frequência cardíaca fetal auxilia na identificação de estados fisiológicos ou patológicos da oxigenação fetal e constitui um dos primeiros testes de viabilidade fetal na obstetrícia prática (Turan et al., 2007). Considerando que a *Niederzuehlla* SP causa alterações cardíacas em ruminantes, é de extrema relevância avaliar os batimentos cardíacos fetais.

A frequência cardíaca fetal foi analisada durante todo o tempo experimental. Para efeito de análise estatística foram tabelados os batimentos cardíacos dos fetos na última semana de gestação (figura 9) e avaliou-se um feto de cada corno uterino. Não foi verificada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais, mostrando que a planta não causou dano cardiogênico.

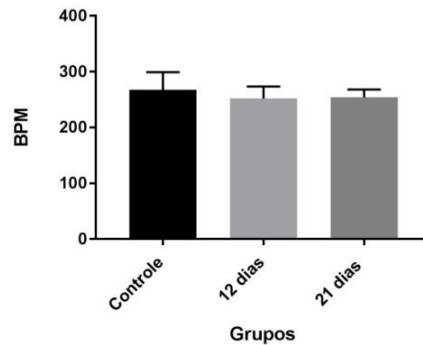


Figura 10. Médias e desvios padrão da frequência cardíaca (batimentos/minuto) dos fetos na última semana de gestação. Análises realizadas com o teste Student Newman Keuls ($P > 0,05$).

5.3. HEMATOLOGIA

O eritrograma dos diferentes grupos experimentais animais e os valores de referência estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Médias e desvios padrão de hemácias, hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) das coelhas dos diferentes grupos experimentais*. Referência: ^aHewitt et al., 1989; ^bCampbell, 2012a.

Parâmetros	Tempos	Grupos/ desvio padrão			Referência
		Controle	12 dias	21 dias	
Hemácias ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	T0	5,94 \pm 0,49	5,57 \pm 0,46	5,58 \pm 0,41	5,2 - 6,8 ^a
	TF	5,85 \pm 0,35	5,91 \pm 0,37	5,72 \pm 0,32	
Hb (g/dL)	T0	11,86 \pm 1,47	11,92 \pm 1,56	12,64 \pm 1,64	11,5 - 15,1 ^b
	TF	12,44 \pm 1,03	11,4 \pm 0,67	11,62 \pm 1,12	
VG (%)	T0	36,62 \pm 2,25	36,66 \pm 1,66	36,12 \pm 0,84	36,6 - 47,4 ^b
	TF	38,90 \pm 2,72	35,6 \pm 2,03	36,60 \pm 2,74	
VGM (fl)	T0	62,62 \pm 2,2	62,1 \pm 2,2	63,28 \pm 3,6	64,6 - 76,2 ^b
	TF	65,56 \pm 2,62	64,08 \pm 4,29	65,58 \pm 1,06	
HGM (pg)	T0	20,34 \pm 2,8	20,12 \pm 1,55	22,08 \pm 2,2	-
	TF	20,94 \pm 0,34	20,52 \pm 1,34	20,8 \pm 0,60	
CHGM (g/dL)	T0	32,44 \pm 3,85	32,42 \pm 2,9	34,96 \pm 4,0	29,5 - 33,9 ^b
	TF	31,98 \pm 1,20	32,02 \pm 0,93	31,7 \pm 0,80	
RDW (fl)	T0	15,86 \pm 2,3 ^A	16,2 \pm 1,2 ^A	17,46 \pm 1,5 ^A	11,5 - 16,2 ^a
	TF	11,10 \pm 0,8 ^B	11,78 \pm 1,21 ^B	11,84 \pm 1,2 ^B	
Plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}$)	T0	194,2 \pm 70,06	231,6 \pm 63,26	217,0 \pm 69,54	-
	TF	201,0 \pm 90,95	236,2 \pm 87,09	203,0 \pm 111,55	

*As análises foram realizadas para ANOVA e teste Student Newman Keuls ($P > 0,05$), exceto Hb e VGM, cujos testes foram Kruskal Wallis ($p > 0,05$). Os valores entre os tempos foram analisados pelo teste T ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferentes na coluna referem-se a valores estatisticamente diferentes. A ausência de letras nas colunas e linhas mostra valores iguais estatisticamente.

A ausência de alterações no eritrograma entre os diferentes grupos mostra que *N. multiglandulosa* não causou mudanças clínico-patológicas porque os achados histopatológicos foram discretos, como serão mostrados adiante, entretanto, os valores se mantiverem dentro dos parâmetros de referência para a espécie. Algumas fitotoxinas, como as saponinas, identificado no estudo fitoquímico de Facco et al. (2016) em baixas concentrações nessa planta, poderiam causar hemólise (Costa, 1978). Porém, não houve alteração eritrocitária significativa nas coelhas, sugerindo que as saponinas têm pouca relevância na intoxicação por *N. multiglandulosa* e essa planta não causa anemia, como a causada pela samambaia do mato (*Pteridium* sp) (Tokarnia et al., 2012).

A diferença entre RDW entre os momentos T0 e TF está correlacionada ao maior número de reticulócitos em animais jovens (2-4%) que declina com a idade até estabilizar aos 12 meses de vida (Jain, 1986; Suckow et al., 2012).

A tabela 5 mostra os valores de leucograma dos três grupos e os valores de referência para a espécie.

Tabela 5. Contagens médias e desvio padrão de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos/heterófilos e eosinófilos das coelhas dos grupos controle, 12 dias e 21 dias. Referência: Campbell, 2012a.

Parâmetros	Tempos	Grupos/médias ± desvios padrão			Referência
		Controle	12 dias	21 dias	
Leucócitos (x10 ³ µL)	T0	9,6 ± 0,54	8,14 ± 1,55	9,22 ± 1,63	6,3 – 10,06
	TF	9,52 ± 2,51	7,92 ± 1,65	8,12 ± 4,1	
Linfócitos (%)	T0	66,76 ± 11,38	63,3 ± 16,45	62,12 ± 6,0	-
	TF	63,14 ± 5,73	58,28 ± 14,81	60,56 ± 17,35	
Linfócitos (x10 ³ µL)	T0	6,38 ± 1,12	5,1 ± 1,69	5,68 ± 0,83	3,36 - 7
	TF	6,02 ± 1,57	4,72 ± 1,86	6,45 ± 3,24	
Heterófilos (%)	T0	26,4 ± 9,16	31,8 ± 17,73	31,26 ± 7,63	-
	TF	31,34 ± 4,87	34,64 ± 14,94	32,58 ± 12,51	
Heterófilos (x10 ³ µL)	T0	2,54 ± 0,9	2,64 ± 1,8	2,9 ± 0,9	1,49 – 3,21
	TF	2,98 ± 1,03	2,62 ± 0,92	2,38 ± 0,98	
Eosinófilos (%)	T0	6,84 ± 4,15	4,9 ± 3,7	6,62 ± 3,65	-
	TF	5,52 ± 1,41	7,08 ± 0,68	6,86 ± 4,91	
Eosinófilos (x10 ³ µL)	T0	0,68 ± 0,4	0,37 ± 0,3	0,64 ± 0,43	0,01 – 0,15
	TF	0,52 ± 0,18	0,58 ± 0,16	0,42 ± 0,16	

*As análises entre grupos foram realizadas para ANOVA e teste Tukey (p>0,05) e entre momentos para teste T pareado (p>0,05).

Como observado na Tabela 5, não houve alteração no leucograma entre os grupos e entre os tempos. Contrariamente, os valores de leucócitos de cabras que receberam *N. multiglandulosa* aumentaram significativamente em relação ao controle, com leucocitose (Melo, 1998) relacionada ao aumento de neutrófilos. No entanto, diferentemente do que ocorre em

ruminantes, coelhas não apresentam abortamento pela planta, portanto, não houve indução de processo inflamatório nesses animais.

5. 4. BIOQUÍMICA SÉRICA

As concentrações de ureia, creatinina e das enzimasalanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), proteína e albumina estão apresentados na Tabela 6 e Figura 11.

Tabela 6. Médias e desvios padrão de ureia, creatinina, ALT, AST, FA, GGT, proteína total, albumina e globulinas de coelhas, no T0 (tempo zero) e no TF (tempo final- pós-parto) dos grupos controle, 12 dias e 21 dias.

Parâmetros	Tempos	Grupos/médias ± desvios padrão			Referência
		Controle	12 dias	21 dias	
Ureia (mg/dL)	T0	29,08 ± 3,11	32,88 ± 2,73	32,25 ± 3,48	13-29 ^a
	TF	33,04 ± 9,71	29,48 ± 6,47	34,94 ± 13,11	
Creatinina (mg/dL)	T0	1,10 ± 0,10	1,20 ± 0,08	1,20 ± 0,17	0,5 – 2,5 ^a
	TF	1,40 ± 0,18	1,35 ± 0,20	1,24 ± 0,23	
ALT (UI/L)	T0	40,65 ± 5,78	62,58 ± 23,67	52,65 ± 14,66	< 100 ^b
	TF	36,36 ± 5,84	41,71 ± 27,27*	24,26 ± 11,10	
AST (UI/L)	T0	82,50 ± 15,56	72,50 ± 16,72	76,80 ± 31,85	< 100 ^b
	TF	55,54 ± 20,96	88,64 ± 82,88	39,48 ± 13,35	
FA (UI/L)	T0	165,60 ± 51,0	190,10 ± 15,94	180,5 ± 29,96	121 -145 ^c
	TF	26,07 ± 9,08	34,48 ± 3,29	21,83 ± 10,40	
GGT (UI/L)	T0	9,21 ± 7,42	10,09 ± 3,97	10,37 ± 4,52	0 - 14 ^d
	TF	3,82 ± 3,64	7,83 ± 1,15	7,45 ± 2,47	
Proteína total (mg/dL)	T0	5,89 ± 0,31	5,94 ± 0,46	5,86 ± 0,53	5 - 8,5 ^b
	TF	4,93 ± 0,63*	4,65 ± 0,40*	4,00 ± 0,72*	
Albumina (mg/dL)	T0	4,14 ± 0,15	4,21 ± 0,26	4,35 ± 0,18	3 - 3,34 ^b
	TF	3,43 ± 0,32* ^A	3,53 ± 0,23* ^A	2,92 ± 0,41* ^B	

Análises entre grupos realizadas com o teste SNK (P<0,05); letras maiúsculas diferentes na linha mostram significância estatística. Análises entre os tempos realizadas com o teste t, sendo P<0,05. Os asteriscos (*) mostram significância entre os tempos (T0 e TF).

Referência: ^a Mader, 1997; ^b Campbell, 2012b; ^c Spinelli et al., 2012; ^d Hewitt et al., 1989.

Somente houve diferença estatística entre os tempos para as variáveis proteína total e albumina. E entre grupos (P>0,05), somente a fosfatase alcalina apresentou relevância estatística (P<0,05) entre os grupos 12 dias e 21 dias.

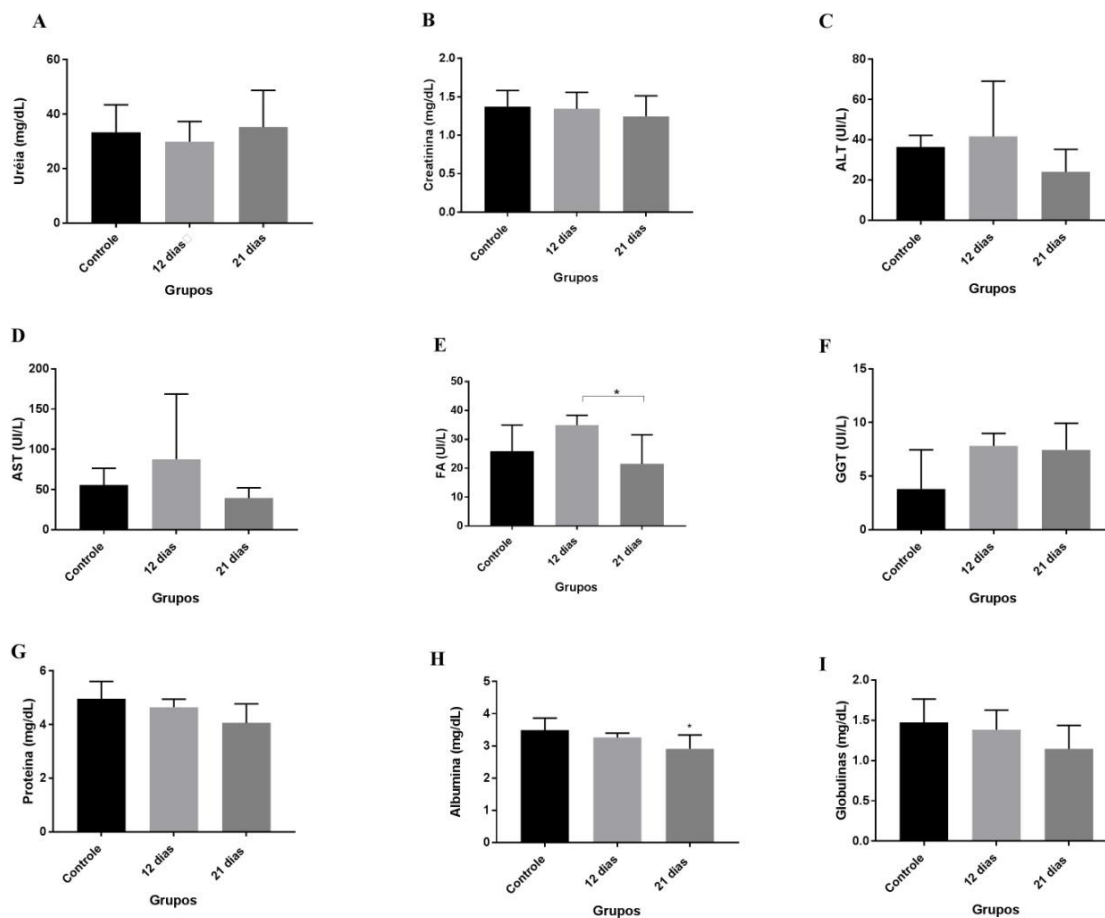


Figura 11. Médias e desvios padrão, de ureia (A) creatinina (B), ALT (C), AST (D), FA (E), GGT (F), proteína total (G), albumina (H) e globulinas (I) das coelhas dos grupos controle, 12 dias e 21 dias após o parto. Análises realizadas com o teste Student Newman Keuls ($P > 0,05$), exceto a FA, submetida ao teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$). (E)* diferença entre os grupos 12 e 21 dias; (H)* diminuição em relação ao controle.

A ureia e a creatinina não são marcadores precoces de doença renal em coelhos; é necessário que exista 50-75% de perda da função renal para que as suas concentrações aumentem no plasma (Campbell, 2012b) e, como será mostrado mais adiante, nenhum animal apresentou alterações renais severas. A enzima ALT reduziu em todos os grupos (entre tempos), com significância estatística no grupo 12 dias. Esses dados estão de acordo com a literatura, em que coelhas gestantes apresentam redução de ALT nos últimos dias de gestação (Wells et al., 1999). Observa-se que não houve alterações das enzimas séricas relacionadas à planta, mostrando que a *Nidenezuella* não causou lesões hepáticas e musculares nas coelhas.

A redução da concentração da proteína é reflexo da redução de albumina nos animais. A proteína e albumina podem reduzir durante a gestação devido ao aumento do volume plasmático e, conseqüentemente hemodiluição em coelhas (Wells et al., 1999; Mizoguchi et al., 2010; Suckow et al., 2012), assim como ocorre na mulher no terceiro trimestre de gestação (Hutter et al., 2010; Soma-Pillay et al., 2016) e na rata (De Rijk et al., 2002). Porém, os animais desta pesquisa não apresentaram redução do valor de volume globular, descartando a hipótese de

hipovolemia. Observa-se que as proteínas reduziram nos três grupos avaliados, e, por isso, a diferença entre os tempos pode estar relacionada ao aumento do catabolismo proteico para favorecer o desenvolvimento dos fetos, principalmente no terço final da gestação (Parigi-Bini et al., 1992).

Doenças hepáticas e renais severas também resultam em hipoproteinemia e hipoalbuminemia (Thrall et al., 2012). Nenhum animal apresentou alterações intensas nesses órgãos, mas houve significância estatística nos valores de albumina entre os grupos controle e 12 dias com o grupo 21 dias. Isso se deve pelo fato de um animal do último grupo ter valores de albumina abaixo da referência e, na histopatologia, apresentou vacuolizações intracitoplasmáticas moderadas nos túbulos contorcidos proximais (degeneração). A albumina é uma das menores proteínas do plasma (65kDa), portanto, uma lesão renal pode causar a perda dessa molécula nos glomérulos ou falha na sua reabsorção pelos túbulos proximais (Birn e Christensen, 2006; Tojo e Kinugasa, 2012), como supostamente é o caso desse animal.

A redução da atividade da FA está relacionada à idade dos animais. As fêmeas utilizadas nesse estudo eram relativamente jovens no momento T0, antes do acasalamento (4-5 meses), e, portanto, animais no final do crescimento ósseo. A isoforma óssea de FA reduz rapidamente em animais maduros (Kramer, 1989) e a isoforma placentária da enzima provavelmente apresenta meia-vida curta no soro e não é detectada nos exames de rotina, similar ao que ocorre em cães em que a meia vida de FA é inferior a seis minutos (Hoffmann e Dorner, 1977; Wells et al., 1999).

Não foi verificada diferença significativa nos valores de creatina quinase (CK) e fração MB (CK-MB), presente principalmente no miocárdio, entre os grupos. Apesar de a *N. multiglandulosa* ser uma planta cardiotóxica, a dose de 10g/kg, não causou alterações de CK e CK-MB nas coelhas (Tabela 7 e Figura 12), corroborando com o estudo de Melo (1998) que usou doses de 10 e 20g/kg em cabras. A lesão cardíaca é a principal lesão relacionada à intoxicação por *Niedenzuella* sp, entretanto, as coelhas não foram sensíveis à planta.

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de CK e CK-MB das coelhas (U/L).

Parâmetros	Tempos	Grupos/médias ± desvios padrão			Referência
		Controle	12 dias	21 dias	
CK	T0	2467,9 ± 3167,9	2006,7 ± 1116,3	1514,8 ± 300,8	218 – 2705
	TF	2578,9 ± 795,3	4429,8 ± 3983,9	1772,9 ± 734,2	
CK-MB	T0	608,4 ± 694,4	659,9 ± 235,4	941,8 ± 469,7	-
	TF	604,9 ± 396,8	513,1 ± 240,0	308,5 ± 303,6	

Referência: Hewitt et al., 1989.

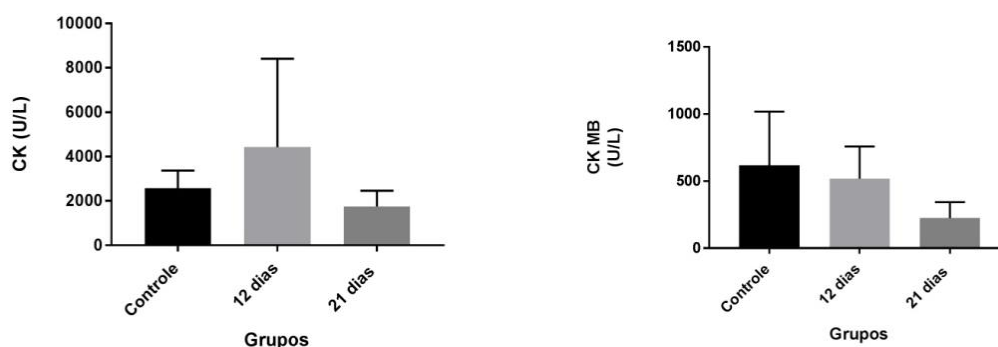


Figura 12. Médias e desvios padrão de CK e CK-MB após o parto. CK: análises realizadas com o teste de Kruskal Wallis ($P>0,05$) e CK-MB com o teste de Student Newman Keuls ($P>0,05$).

A creatina quinase (CK) está presente na mitocôndria e citoplasma do músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e outras vísceras (Cabaniss, 1990; Brewster et al., 2006). Um estudo recente demonstrou que a placenta humana também possui a capacidade de sintetizar CK (Ellery et al., 2017) e fêmeas gestantes possuem valores maiores em relação às não gestantes (Emery e Pascasio, 1965; Dickinson et al., 2014; Ellery et al., 2017). Os valores de CK aumentam na hipóxia e em doenças neuromusculares, injúria cardíaca e lesão renal. (Thrall et al., 2012). Apesar disso, observa-se na figura 12 que não houve diferença estatística de CK e CK-MB entre os grupos ($P>0,05$), mostrando que não houve injúria cardíaca.

Não houve diferença estatística entre os valores de cálcio, fósforo e magnésio entre os grupos experimentais, após o parto, mostrando que a *N. multiglandulosa* não causou deficiência mineral nos animais e, com base nesses dados, supostamente não houve perda desses íons pelos rins durante o período experimental (Tabela 8). Além disso, a calcemia materna não influenciou na mineralização óssea fetal.

Tabela 8. Médias e desvios padrão de cálcio, fósforo e magnésio (mg/dL) nos grupos experimentais após o parto e valores de referência para a espécie.

Parâmetros	Grupos/médias \pm desvios padrão			Referência
	Controle	12 dias	21 dias	
Cálcio	22,04 \pm 9,85	28,74 \pm 7,93	20,04 \pm 9,69	5,8 – 14 ^b
Fósforo	3,74 \pm 0,98	4,28 \pm 2,39	3,29 \pm 0,70	3,70 – 4,62 ^b
Magnésio	2,93 \pm 0,34	2,85 \pm 0,25	2,61 \pm 0,51	2,09 – 2,41 ^a

Análises realizadas com o teste Student Newman Keuls ($P>0,05$).

Referência: ^aMader, 1997; ^bKaneko et al., 2008.

Coelhos apresentam sistema digestivo muito diferente em relação aos ruminantes, e essa pode ser a principal influência na resistência daqueles animais às fitotoxinas de *Niederzuehlla* sp. Em ruminantes, o conteúdo ingerido chega primeiramente no rúmen, em pH de 5,5 a 7, e é degradado pela microbiota rumenal. Nesses animais 50 a 90% da parede celular vegetal é digerida. Contrariamente, em coelhos, o alimento ingerido chega ao estômago, com pH de 1 a 2 (Ferreira et al., 2008), o qual pode destruir parte das fitotoxinas. Além disso, a digestibilidade vegetal em coelhos é cecotrófica e é de somente 16 a 18% (Ferreira et al., 2008). Supõe-se,

portanto, que os coelhos apresentam menor absorção de fitotoxinas e a trituração de plantas tóxicas antes do seu fornecimento, provavelmente, favorece a absorção das toxinas nessa espécie.

5.5. ANATOMOHISTOPATOLOGIA

5.5.1. Achados de necropsia

Os relatos de surtos e casos experimentais de intoxicação por *N. multiglandulosa* descreveram hidrotórax, hidropericárdio, fibrose cardíaca, ascite e fígado com aspecto de noz moscada. (Tokarnia et al., 1989; Melo, Riet-Correa et al., 2005; Melo, 2006; Almeida et al., 2008; Riet-Correa et al., 2009). No sistema reprodutivo os achados são edema e hemorragia petequeial nas mucosas vulvar, vaginal e do endométrio em casos de abortamento (Melo, 1998).

Os animais do grupo controle não apresentaram alterações na necropsia. Também, nenhum dos animais, dos diferentes grupos, apresentou alterações macroscópicas no coração. No grupo 12 dias, um animal apresentou 19 mL de transudato na cavidade abdominal (proteína < 4mg/dL) e três animais apresentaram hiperemia multifocal moderada da superfície cortical dos dois rins que aprofundava ao corte.

No grupo 21 dias, um animal apresentou uma área circular de hemorragia no corno uterino direito (Figura 13), de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro; rins com áreas circulares multifocais deprimidas na superfície cortical e fígado com evidência da lobulação.



Figura 13. Útero, coelha. Área de hemorragia circular no corno uterino direito, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro.

Diferentemente de Tokarnia (1989) e Carvalho et al., (2006) em bovinos; Riet-Correa et al. (2005 e 2009) em ovinos, a *N. multiglandulosa* não causou alterações cardíacas em coelhas

tratadas com 10g/kg de planta, corroborando com Melo (1998) que não observou alterações significativas em cabras.

Líquido na cavidade abdominal geralmente é observado em casos de hipoproteïnemia, no entanto, o animal com ascite não apresentava valores de proteína e albumina baixos. A ascite é relatada como é um dos achados nos casos de intoxicação por *N. multiglandulosa* (Tokarnia, 1989, Carvalho et al., 2006).

Os neonatos não apresentaram alterações macroscópicas, com exceção da congestão generalizada nos láparos natimortos. Contrariamente, em outros estudos, fetos de ruminantes abortados e neonatos com mortalidade neonatal apresentaram edema subcutâneo, hidrotórax e ascite, congestão hepática e palidez de miocárdio (Tokarnia et al., 1989; Riet-Correa et al., 2009), hemorragia difusa ou multifocal e hemorragia petequial nos pulmões (Melo, 1998; Melo et al., 2001).

As plantas podem apresentar diferenças na composição das fitotoxinas por influência da região geográfica, clima, precipitação pluviométrica, época do ano e outros fatores (Spinosa et al., 2008). No estudo fitoquímico da planta do presente estudo feito por Melo e Dantas-Barros (1999) não foram encontrados heterosídeos cardiotônicos, no entanto, Facco et al. (2016) avaliando a composição de *N. mutiglandulosa* coletada em São Paulo, encontrou esses componentes.

Além das características geográficas, a digestão cecotrófica e a digestibilidade vegetal em coelhos (Ferreira et al., 2008) também podem alterar a absorção dos princípios tóxicos e a sua farmacocinética, explicando a provável resistência desses animais à intoxicação. Provavelmente, o tipo de digestão apresenta maior importância na intoxicação do que o tipo de placenta nessa espécie (hemodiorial), considerando a íntima relação entre o sangue materno-fetal (Furukawa et al., 2014) o que poderia favorecer a passagem de toxinas.

5. 5. 2. Microscopia dos diferentes órgãos

Coração

Em relação ao coração, dois animais do grupo controle (2/5) apresentaram congestão multifocal discreta. Nos grupos tratados com *N. multiglandulosa* observou-se congestão (4/10) e hemorragia (2/10) multifocal discreta. A congestão observada nesses animais, inclusive no grupo controle, pode ser correlacionado à overdose do barbitúrico tiopental para a eutanásia; que pode causar congestão passiva (Fry e McGavin, 2012).

Tumefação e eosinofilia dos cardiomiócitos foram relatadas por Carvalho et al. (2006) em bovino intoxicado espontaneamente pela *N. multiglandulosa*. A degeneração vacuolar, observada nesse caso, é especificada pelo acúmulo de água e eletrólitos na célula e representa deficiência da bomba de sódio e potássio e é de difícil diagnóstico macroscópico (Santos e Alessi, 2010). Degeneração do miocárdio também é vista nas intoxicações por *N. acutifolia* (Caldas et al., 2011), *Nerium oleander* (Taheri et al., 2013) e *A. glazioviana* (Gava et al., 2001). No entanto, em coelhas, essa lesão não foi detectada e nenhum dos animais apresentou alterações clínicas de insuficiência cardíaca, mostrando que o período de exposição de 9 e 18 dias, na dose de 10g/kg, não é suficiente para a planta causar lesões em coelhas.

Rins

Animais dos grupos tratados com *N. multiglandulosa* apresentaram os rins com material eosinofílico intratubular multifocal discreto a moderado (5/10), vacuolização do epitélio tubular proximal multifocal moderado (5/10), congestão multifocal discreta a moderada (8/10), e necrose (ausência de núcleos, cariólise, cariorrexia) tubular proximal focal moderada (4/10) e infiltrado linfohistiocitário multifocal discreto (Figura 14).

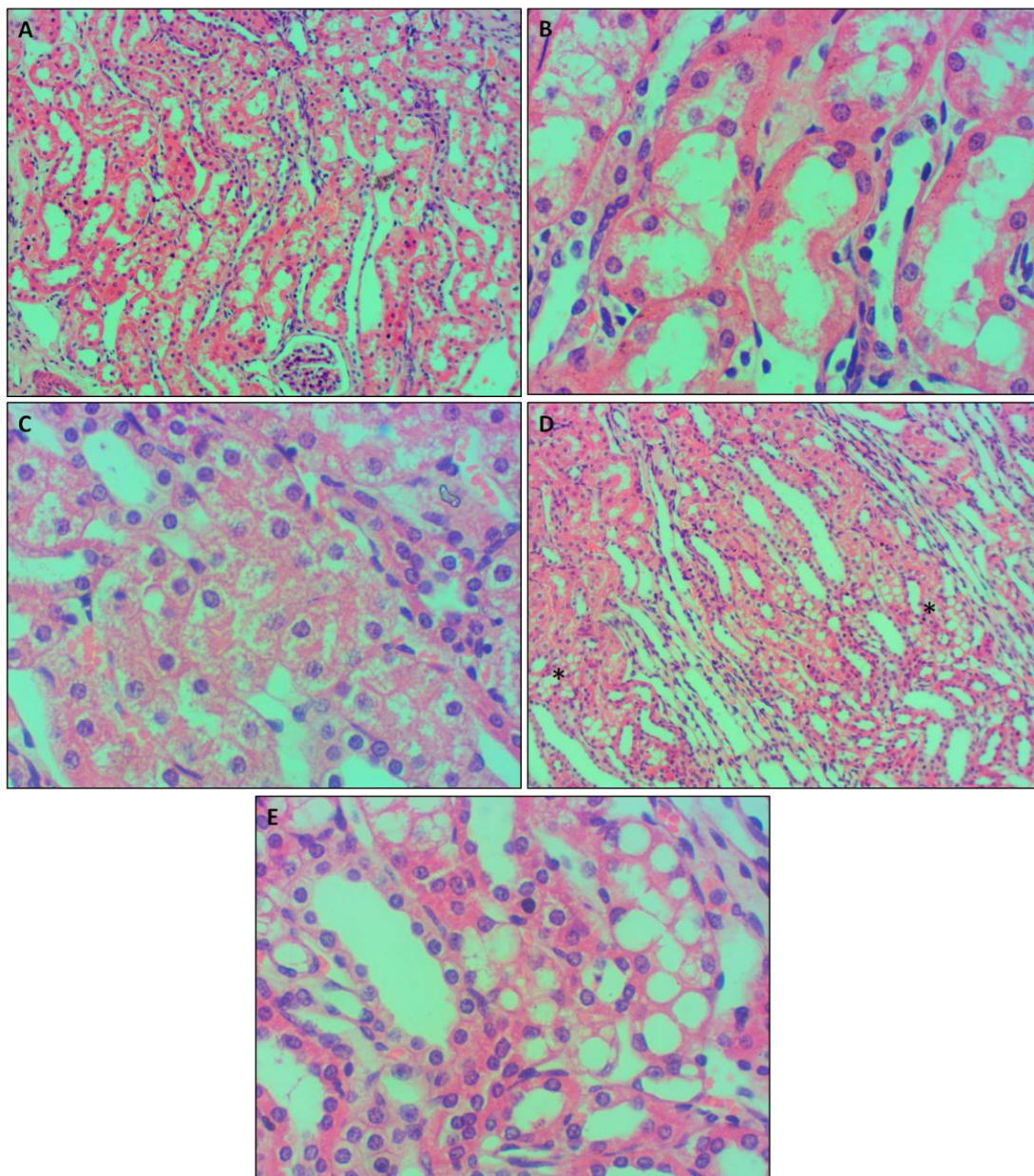


Figura 14. Rim, coelho. A: nefrose tubular aguda focal moderada (200x). B: maior aumento da figura A; células dos túbulos proximais com perda de núcleos (grupo 21 dias) (400x). C: células tubulares proximais com perda da coloração citoplasmática, cariorrexia e ausência de núcleo (grupo 12 dias) (400x). D: (*) vacuolização intracitoplasmática nos túbulos contorcidos proximais multifocal moderada (200x). E: maior aumento da figura D. D: degeneração hidrópica (400x) (grupo 21 dias). H&E.

O insulto tóxico altera a respiração nas células tubulares através de danos nas organelas e no sistema de transporte, causando nefrose tubular aguda. As células epiteliais dos túbulos proximais são mais ativas metabolicamente e reabsorvem maior volume de filtrado glomerular, e, desse modo, são mais sensíveis às nefrotoxinas (Santos e Alessi, 2010).

Por esses fatores e pelo tempo de exposição, a nefrose tubular nas coelhas expostas à *N. multiglandulosa* acometeu somente os túbulos proximais e a lesão foi discreta a moderada, não afetando a filtração glomerular e não causando alterações nos valores de creatinina e ureia. Além disso, não houve acometimento da membrana basal em 18 dias de exposição, mostrando ser um processo reversível (Santos e Alessi, 2010; Basile et al., 2012). Melo (1998) observou aumento significativo de creatinina, ainda que dentro dos valores de referência, em cabras que foram alimentadas com folhas de *N. multiglandulosa*, sem alterações renais microscópicas relevantes. Esta é a primeira vez que a planta foi correlacionada com lesão renal e sugere-se que a planta contém toxinas com efeitos diretos sobre o rim.

A vacuolização citoplasmática, neste caso, degeneração hidrópica, caracteriza degeneração celular decorrente da insuficiência na bomba de sódio e potássio da membrana plasmática e se origina de agressões tóxicas (Santos e Alessi, 2010). É a primeira manifestação de quase todos os tipos de danos celulares e fisiopatologicamente representa o acúmulo intracelular de água decorrente da incapacidade da célula de manter a homeostasia hidroeletrólítica (Kumar et al., 2016).

O rim, além dos intestinos e osso, é responsável pela homeostase de cálcio e fósforo no organismo (Moe, 2008). A lesão tubular não levou à perda desses minerais nas coelhas, como mostrado pelas taxas séricas semelhantes entre os grupos avaliados.

Baço e fígado

O baço dos animais dos grupos tratados com *N. multiglandulosa* apresentou congestão difusa moderada (7/10) e diminuição do número de nódulos linfóides (2/10). No fígado foi observado congestão multifocal difusa a moderada e, em dois animais do grupo 21 dias (2/5), aumento da celularidade periductal. Não houve alterações significativas no grupo controle. Esses dados reiteram a ausência de alterações nas enzimas AST, ALT, GGT e FA e os valores dentro da normalidade da albumina, produzida exclusivamente no fígado.

Apesar de *Niedenzuella* sp, assim como *A. glazioviana*, causar necrose centro-lobular (Garcia y Santos, 2004; Riet-Correa et al., 2005, 2009), essa alteração não ocorreu nesse estudo em coelhas.

A necrose centro-lobular é resultante de um insulto tóxico ou hipóxico, e decorre pela distância dessa região do suprimento de oxigênio (artéria hepática) e pela maior atividade enzimática nos hepatócitos (Santos e Alessi, 2010). A insuficiência cardíaca, como relatada nos casos de intoxicação pela planta, causa congestão passiva crônica e hipóxia na região centro-lobular. Ressalta-se que as coelhas não apresentaram anemia e qualquer alteração significativa no coração. Portanto, a *N. multiglandulosa* não causou cardiotoxicidade e hepatotoxicidade em coelhos.

Sistema Nervoso Central

Não foram encontradas alterações significativas no SNC dos animais, diferindo do estudo em ovelhas de Riet-Correa et al. (2005) e Riet-Correa et al. (2009), os quais observaram vacuolização na substância branca do cérebro (*status spongiosus*) devido à desmielinização axonal.

Sistema reprodutor

No útero, os animais do grupo controle apresentaram endométrio com hemorragia multifocal moderada, perda do epitélio associado à infiltrado misto (linfócitos e heterofílos) e vacúolos intracitoplasmáticos na lâmina própria e muscular. Os animais dos grupos tratados com *N. multiglandulosa* apresentaram miométrio com necrose multifocal a coalescente discreta a moderada, pncnose nuclear e cariólise moderada, vacuolização intracitoplasmática (sugestivo de degeneração) e endométrio com hemorragia multifocal associado a infiltrado linfocítico discreto a moderado (Figura 15).

Na cérvix foi observada hemorragia, congestão e discreta quantidade de vacúolos intracitoplasmáticos na camada muscular. Os outros órgãos reprodutivos (ovários, tubas uterinas vagina) não apresentaram alterações.

Os achados histopatológicos se repetem nos grupos controle e tratamentos e sugerem o *status* morfológico do útero em involução no pós-parto e, espera-se que, quanto mais horas decorrem entre o parto e a eutanásia, mais significativas serão as alterações (Archbald et al., 1972; Martins, T. M.; Borges, 2011). Cabras intoxicadas com *N. multiglandulosa* apresentaram endometrite focal aguda (Melo, 1998), divergindo dos achados nas coelhas, que não tiveram correlação com a planta, mostrando, mais uma vez, que coelhas não são susceptíveis à intoxicação com doses diárias de 10g/kg por 9 e 18 dias.

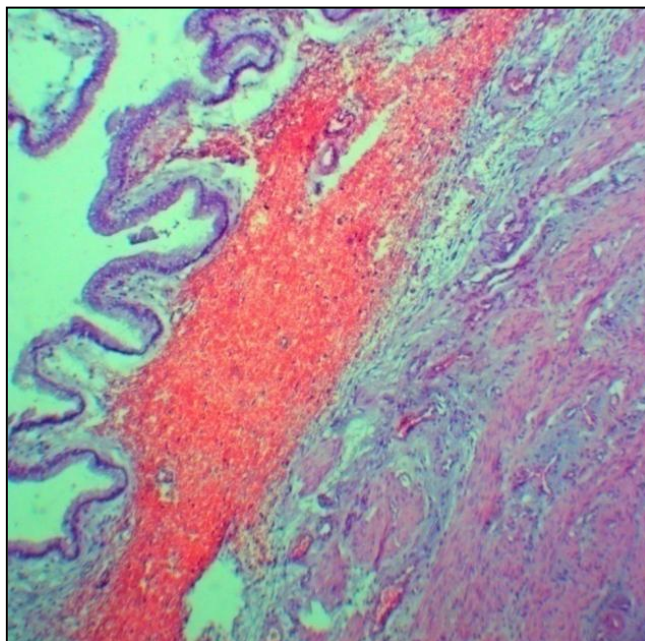


Figura 15. Útero, coelha. Endométrio com hemorragia e perda do epitélio multifocal moderado no pós-parto. H&E, 40x.

A histologia da placenta não mostrou diferenças entre os grupos, se assemelhando aos resultados de Riet-Correa et al., (2009) que também não relataram alterações na placenta de ovelhas. Entretanto, na placenta de cabras, Melo et al. (2001) encontraram placentite focal associada à infiltrado de polimorfonucleares, necrose de coagulação e maior quantidade de células apoptóticas, sugerindo involução precoce. Caracteristicamente, no atual estudo, o órgão apresentou muitas células em apoptose e intensa vascularização em todos os grupos (Figura 16).

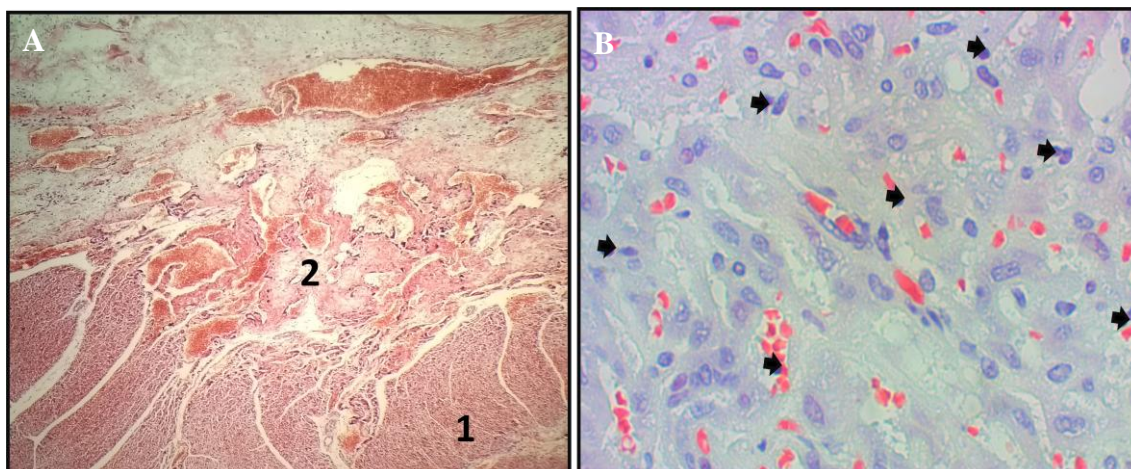


Figura. 16. Placenta, coelha. Placenta no pós-parto. A: Intensa vascularização na zona labiríntica (1) e zona decídua de necrose (2). Shorr, 40x. B: Células em apoptose (setas). Shorr, 200x.

Os presentes dados mostram que a *N. multiglandulosa* não causa alterações reprodutivas em coelhas. Acredita-se que o principal fator envolvido não seja o tipo de placenta, afinal o sangue materno tem um contato mais íntimo com o sangue fetal quando se compara essa espécie com ruminantes. Provavelmente, as características do sistema digestivo de coelhos alteram a absorção dos princípios ativos ou até mesmo a sua integridade, diminuindo sua metabolização.

Neonatos

No coração dos neonatos a única alteração observada foi congestão multifocal discreta nos grupos tratados com *N. multiglandulosa*, mas isso não se repetiu em todos os neonatos, não se mostrando um dado significativo. O lâparos natimorto apresentou autólise em todos os órgãos e a sua morte foi correlacionada às perdas de lâparos que comumente ocorrem na cunicultura. Em abortamentos em bovinos e ovinos, os achados histopatológicos nos fetos foram palidez das fibras do miocárdio, vacuolização citoplasmática e fibrose associado ao infiltrado mononuclear e necrose (Tokarnia et al., 1989; Riet-Correa et al., 2009; Riet-Correa et al., 2012). Todavia, essas alterações não foram observadas nesse estudo.

5.6. ESTUDO DA *N. multiglandulosa* EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Foram realizadas cinco rotinas de cultivo *in vitro* de embriões. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos (avaliado no dia 7 – D7) em relação ao total de oócitos inseminados, de acordo com cada grupo experimental, estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9. Taxas de clivagem, de produção e de eclosão de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados.

Grupos	Número de oócitos inseminados	Taxa de clivagem n (%)	Taxa de produção de embrião/clivados n (%)	Taxa de produção de embrião/total (%)	Taxa de eclosão n (%)
CONTROLE	404	34(57,9%)	142 (60,6%) ^a	35,1% ^a	38 (9,4%) ^a
EXTRATO	427	219 (51,2%)	91 (41,5%) ^b	21,3% ^b	6 (1,4%) ^a

Letras minúsculas diferentes entre colunas apresentam médias com significância estatística pelo teste Exato de Fisher (P <0,05).

A produção embrionária e a taxa de clivagem foi maior significativamente ($P < 0,05$) no grupo controle, mostrando que o extrato da planta causou retardo no desenvolvimento e maior degeneração dos embriões. A eclodibilidade embrionária não apresentou diferença estatística entre os grupos ($P = 0,058$). Esses dados mostram que houve prejuízo na produção embrionária em termos numéricos e percentuais. Além disso, os embriões do grupo extrato eram morfológicamente enegrecidos e de baixa qualidade (Figura 17).

O embrião geralmente é mais susceptível aos agentes tóxicos do que o feto devido à fase de organogênese. O resultado final de um desenvolvimento embrionário anormal é a morte e reabsorção, os quais geralmente passam despercebidos na clínica médica ou se mostram como repetição do estro (Panter e Stegelmeier, 2011). O extrato de *N. multiglandulosa* é tóxico para embriões, sugerindo que a planta tem potencial para induzir reabsorção embrionária em bovinos *in vivo*, como já comprovado em ratas por Langeloh et al., (1992). Esses resultados sustentam a hipótese que, se a planta fosse administrada no início da gestação em coelhas, poderiam ocorrer perdas embrionárias ou fetais, considerando que ratas e coelhas apresentam semelhança no tipo de placenta.

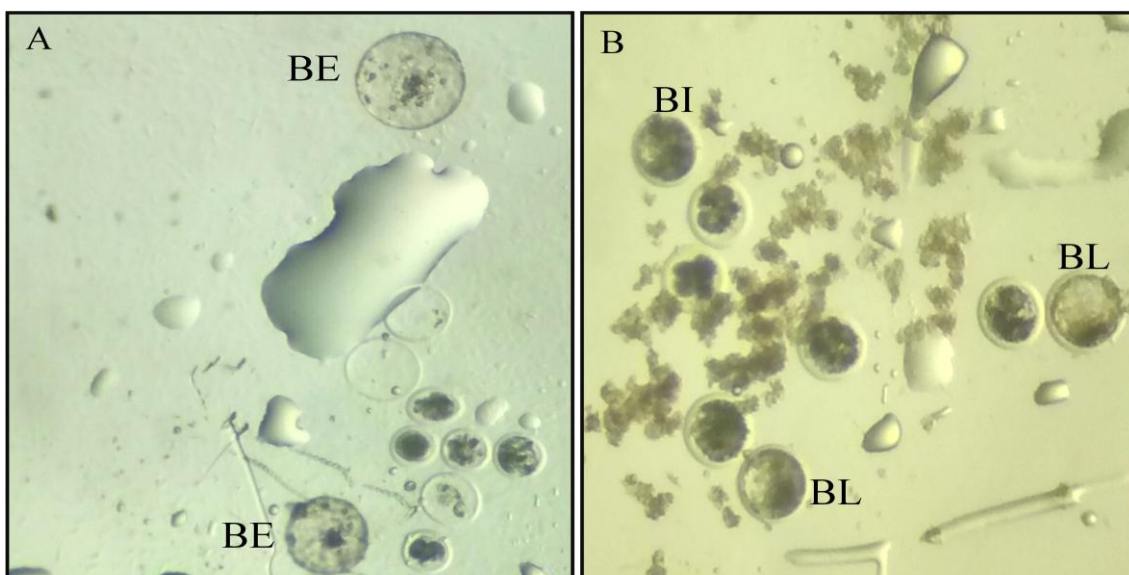


Figura 17. Embriões bovinos no nono dia de CIV. A: Controle. B: Extrato. BE: blastocisto eclodido; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto intermediário. Observa-se um desenvolvimento mais lento dos embriões submetidos ao extrato, ausência de eclosão embrionária e aspecto morfológico enegrecido em relação ao controle. As estruturas de coloração marrom em B são provenientes da solução do próprio extrato.

5. 6. 1. Quantificação de células apoptóticas

A massa celular interna do embrião possui maior índice apoptótico, com baixa proporção no trofoectoderma, regulando a população celular e, na fase de blastocisto, remove células danificadas, em excesso, desnecessárias ou com desenvolvimento comprometido (Byrne et al., 1999). Em embriões morfológicamente normais de bovinos, a apoptose ocorre a partir do estágio de 9-16 células, e, na fase de mórula, 50% dos embriões apresentam pelo menos um núcleo em apoptose na análise TUNEL. Blastocistos com menor de 100 blastômeros contém índice apoptótico de 0-10%, reduzindo para 0-6% naqueles com mais de 100 blastômeros (Byrne et al., 1999).

Na figura 18 são apresentadas as imagens de embriões submetidos à técnica de TUNEL, nos embriões do grupo controle e exposto ao extrato da *N. multiglandulosa* e, a tabela 10 apresenta a contagem numérica e percentual dos blastômeros em apoptose sobre o total de blastômeros dos embriões.

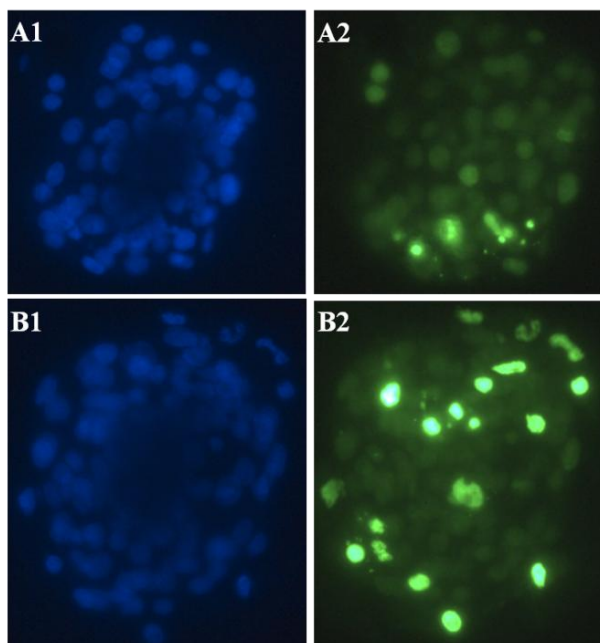


Figura 18. A1 e B1: blastômeros totais de embrião bovino produzido *in vitro* do grupo controle e extrato, respectivamente, corados por Hoechst (azul) (filtro de 460nm). A2 e B2: blastômeros com coloração verde brilhante (Vectashield) estão em apoptose (filtro de 520±20nm). Imagem obtida por microscópio de fluorescência em objetiva de 400x.

Tabela 10. Taxa de apoptose em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* nos grupos controle e extrato.

Grupos	Número de blastômeros totais	Número de blastômeros em apoptose	Taxa de Apoptose
CONTROLE	443	39	9%
EXTRATO	469	65	14%

Não houve diferença estatística significativa do índice apoptótico entre os grupos avaliados ($P > 0,05$), mas analisando-se os dados numéricos, o extrato apresentou maior índice apoptótico e, esse dado, é relevante quando se considera o investimento em produção *in vitro* de embriões e na reprodução bovina. Embriões com maior celularidade apresentam maior chance de implantação no útero (Van Soom et al., 1997). Portanto, a alta incidência de apoptose, pode inviabilizar o sucesso da transferência embrionária.

As fitotoxinas podem ter efeito sobre o desenvolvimento embrionário, causando maior perda de blastômeros e, conseqüentemente, embriões mais frágeis, com menor taxa de desenvolvimento e maior fragmentação nuclear. As toxinas, podem induzir estresse oxidativo nas células e aumentar a taxa de apoptose por causar danos ao DNA ou componentes proteicos e lipídicos (McConkey, 1998; Allen e Tresini, 2000).

Analisando-se a repercussão do presente estudo *in vitro*, a planta *N. multiglandulosa* pode causar prejuízos na reprodução de ruminantes e até mesmo de forma silenciosa, através da

reabsorção embrionária, mostrando ser um importante diagnóstico diferencial de problemas de reprodutivos em animais de produção.

6. CONCLUSÕES

A intoxicação experimental com *Niedenzuella multiglandulosa* não alterou os parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos sanguíneos em coelhas na dose de 10g/kg fornecida a partir de 12 dias de gestação.

N. multiglandulosa, na dose testada, não causou abortamento e nem alterações anatomohistopatológicas nos láparos.

N. multiglandulosa reduziu a mineralização do esqueleto fetal.

N. multiglandulosa causou necrose tubular renal discreta a moderada, sem comprometimento da função renal das coelhas.

N. multiglandulosa não alterou os sistemas cardíaco e reprodutor de coelhas.

O modelo coelho não replicou os resultados da intoxicação pela *N. multiglandulosa* encontrados em ruminantes.

A exposição de embriões ao extrato de 2,7mg/mL de *N. multiglandulosa in vitro* reduziu a taxa de clivagem e de produção embrionária.

O extrato da planta não aumentou o índice de apoptose dos blastocistos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.*, n. 28, p. 463-499, 2000.
- ALMEIDA, M. B.; PRIEBE, A. P. S.; RIET-CORREA, B. et al. Evolução e reversibilidade das lesões neurológicas e cardíacas em ovinos intoxicados experimentalmente por *Ateleia glazioviana* e *Tetrapterys multiglandulosa*. *Pesq. Vet. Bras.*, v.28, p.129-134, 2008.
- AMOROSO, E. C.: Placentation. In: PARKES, A. S. *Marshall's Physiology of Reproduction*. 3. ed. v. II. London: Longmans, Green and Co, 1952. p. 127-311.
- ARCHBALD, L. F.; SCHULTZ, R. H.; FAHNING, M. L. et al. A sequential histological study of the post-partum bovine uterus. *J. Reprod. Fertil.*, v. 29, p. 133-136, 1972.
- BACQ, Y. The liver in normal pregnancy. In: Madame Curie Bioscience Database Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6005>. Acesso em 10 de fevereiro de 2018.
- BARBOSA-FERREIRA, M.; DAGLI, M. L.; MAIORKA, P. C. et al. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 497-503, 2005.
- BASILE, D. P.; ANDERSON, M. D.; SUTTON, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr. Physiol.*, v.2, p.1303-1353.
- BELTRAME, R.T.; FERNANDES, A. R.; QUIRINO, C. R. et al. Aplicações da ultrasonografia na obstetrícia animal. *Pubvet*, v. 4, Art. 894, 2010.
- BIRN, H.; CHRISTENSEN, E. I. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int.*, v.69, p.440-449, 2006.
- BRAME, L. A.; WHITE, K. E.; ECONS, M. J. Renal phosphate wasting disorders: clinical features and pathogenesis. *Semin. Nephrol.*, v. 24, p. 39-47, 2004.
- BREWSTER, L. M.; MAIRUHU, G.; BINDRABAN, N. R. et al. Creatine kinase activity is associated with blood pressure. *Circulation*, v. 114, p. 2034-2039, 2006.
- BYRNE, A. T; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. Fertil.*, v.117, p.97-105, 1999.
- CABANISS, C. D. Creatine Kinase. In: WALKER, H. K.; HALL, W. D.; HURST, J. W. 3. ed. *Clinical Methods: The history, physical, and laboratory examinations*. Boston: Butterworths, 1990. p. 161-163.
- CALDAS, S. A.; PEIXOTO, N. C.; NOGUEIRA, V. A. et al. Aborto em bovinos devido à intoxicação por *Tetrapterys acutifolia* (Malpighiaceae). *Pesq. Vet. Bras.*, v.31, p.737-746, 2011.
- CAMPBELL, T. W. Mammalian hematology: laboratory animals and miscellaneous species. In: THRALL, M. A; WEISER, G.; ALLISON; R. W. et al. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2 ed. Oxford: Wiley, 2012. p. 225-237a.
- CAMPBELL, T. W. Chemical chemistry of mammals: laboratory animals and miscellaneous species. In: THRALL, M. A; WEISER, G.; ALLISON; R. W. et al. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2 ed. Oxford: Wiley, 2012. p.571-581b
- CAMPOS, P. P.; VASCONCELOS, A. C; MELO, M. M. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó-preto - *Tetrapterys multiglandulosa*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.19-24, 2004.

- CARVALHO N. M.; ALONSO L. A.; CUNHA N. G. et al. Intoxicação de bovinos por *Tetraperys multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, p.139-146, 2006.
- CARVALHO, G. D.; NUNES, L. C.; BRAGANÇA, H. B. N. et al. Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos no Estado do Espírito Santo – Brasil. *Arch. Zootec.*, v.58, p.87-98, 2009.
- CASTRO, V. M.; MAMPRIM, M. J.; LOPES, M. D. et al. Acompanhamento da gestação em cadelas pelo exame ultrassonográfico: revisão de literatura. *Vet. Zootec.*, v. 18, p. 9-18, 2011.
- CHALLIS, J. R. G.; DAVIES, I. J.; RYAN, K. J. The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 β in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology.*, v.93, p. 971–976, 1973.
- COUTINHO, L. T.; COSTA, N. A.; MENDONÇA, C. L. et al. Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (solanaceae) no agreste de pernambuco - Brasil. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 14, p. 352–359, 2013.
- CREASY. R. K. *Medicina materno-fetal: princípios e práticas*. 7. ed. Rio de Janeiro:Elsevier. 2016. 1136p.
- DANIELSON, M; KIHLSSTRÖM, I. Calcification of the rabbit fetal skeleton. *Growth*, v. 50, p. 378–384, 1986.
- DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. et al. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do Nordeste brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, p. 807–815, 2010.
- DE RIJK, E. P.; VAN ESCH, E.; FLIK, G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol Pathol*, v. 30, p. 271–282, 2002.
- DINIZ, P. P. V. P.; SCHWARTZ, D. S.; COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: two case reports. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.85-89, 2007.
- DIRECCION DE EDUCACION AGRARIA. (2010). *Manual de cunicultura*. Disponível em <www.easdonboscoribe.edu.ar/files/MANUAL_DE_CUNICULTURA.pdf>. Acesso em 01 de outubro de 2017.
- ELLERY, S. J.; GATTA, P. A. D.; BRUCE, C. R. et al. Creatine biosynthesis and transport by the term human placenta. *Placenta*, v. 52, p. 86–93, 2017.
- EMERY, A. E. H.; PASCASIO, F. M. The effects of pregnancy on the concentration of creatine kinase in serum, skeletal muscle, and myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.91, p. 18–22, 1965.
- FENG, J. Q.; CLINKENBEARD, E. L.; YUAN, B. et al. Osteocyte regulation of phosphate homeostasis and bone mineralization underlies the pathophysiology of the heritable disorders of rickets and osteomalacia. *Bone*, v. 54, p. 213–221, 2013.
- FERREIRA, W. M.; MACHADO, L. C.; JARUCHE, Y. G. et al. Manual prático de cunicultura. Bambuí: Luis Carlos Machado, 2012. 75 f.
- FONSECA, E.; GARCIA-ALONSO, A.; ZÁRATE, A. et al. Elevation of activity of creatine phosphokinase (CK) and its isoenzymes in the newborn is associated with fetal asphyxia and risk at birth. *Clin Biochem*, v. 28, n. 1, p. 91–95, 1995.

- FONTANET, H. L.; TRASK, R. V.; HAAS, R. C. et al. Regulation of expression of M, B, and mitochondrial creatine kinase mRNAs in the left ventricle after pressure overload in rats. *Circ.Res.*, v. 68, p. 1007–1012, 1991.
- FORTES, E. A.; FERRAZ, M. S.; BEZERRA, D. O. et al. Prenatal development of the agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831): External features and growth curves. *Anim. Reprod. Sci.*, v.140, p.195-205, 2013.
- FURLAN, F. H.; LUCIOLI, J.; BORELLI, V. et al. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Acta Sci. Vet.*, v. 36, p. 281–284, 2008.
- GARCÍA Y SANTOS, M. C.; SCHILD, A. L.; DE BARROS, S. S. et al. Lesões perinatais em bovinos na intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg.Papilionoideae). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 24, , p. 178–184, 2004.
- GAVA, A.; BARROS C. S. L. Field observations of *Ateleia glazioviana* poisoning in cattle in southern Brazil. *Vet. Human Toxicol.*, v.4, p.37-41, 2001.
- GAVA, A.; BARROS, C. S. L., PILATI, C. et al. Intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.21, p.49-59, 2001.
- GUTIERREZ, H. E.; ZAMORA, F. M. M. Ultrasonography study of rabbits pregnancy. Proceedings - 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. 2004.
- HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol. Human Reprod.*, v.3, p.919–925, 1997.
- HARVEY, N. C.; MAHON, P. A.; ROBINSON, S. M. et al. Different indices of fetal growth predict bone size and volumetric density at 4 years of age. *J. Bone Miner. Res.*, v. 25, p. 920–927, 2010.
- HAWKINS, I. K.; ILHA, M.; ANIS, E. et al. Septicemia and meningoencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in two neonatal llamas. *J.Vet. Diagn. Invest.*, v. 29, p. 700–703, 2017.
- HEWITT, C. D., INNES, D. J.; SAVORY, J. et al. Normal Biochemical and Hematological Values in New Zealand White Rabbits. *Clin. Chem.*, v.35, p.1777- 1779, 1989.
- HOFFMANN, W.; DORNER, J. Disappearance rates of intravenously injected canine alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.1553-1556, 1977.
- HOLM, M. B . The fetal response to acute perinatal hypoxia and the pathophysiological mechanisms behind hypoxic-ischemic encephalopathy. 2012. 29p. (Revisão). Universidade de Oslo, Oslo.
- HUTTER, DAMIAN; KINGDOM, JOHN; JAEGGI, EDGAR. Causes and mechanisms of intrauterine hypoxia and its impact on the fetal cardiovascular system: a review. *Int. J..Pediatr.*, v. 2010, p. 1–9, 2010.
- JÚNIOR, C. A. O.; RIET-CORREIA, G.; RIET-CORREIA, F. Intoxicação por plantas que contêm swainsonina no Brasil *Ciênc. Rur.*, v. 43, p. 653–661, 2013.
- JÚNIOR, J. A. F.; NASCIMENTO, K. A.; MIGUEL, M. P. Aborto e morte neonatal por listeriose em ruminantes. *Investigação*, v. 14, p. 85–89, 2015.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Blood analyte reference values in some laboratory animals. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animal*. 5.ed. Philadelphia: Academic press. p. 881-887, 2008.

- KOVACS, C. S. Fetal mineral homeostasis. In: GLORIEUX, F. H.; PETTIFOR, J. M.; JÜPPNER, H. *Pediatric bone: biology and diseases*. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2003. p. 271-302.
- KOVACS, C. S. Fetal mineral homeostasis and skeletal mineralization. In: MASSARO, E. J.; ROGERS, J. M. *The skeleton: biochemical, genetic, and molecular interactions in development and homeostasis*. 1. ed. New York: Humana press, 2004. p.293-306.
- KOVACS, C. S.; LANSKE, B.; HUNZELMAN, J. L. et al. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 15233–15238, 1996.
- KRAMER, J. Clinical enzymology. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4. ed. Kaneko, J.J. (ed). Academic Press, San Diego, p. 339-360, 1989.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1440p.
- LANGELOH, A.; LEGUIZANÓN, F.; DALSENTER, P. Potencial abortivo e infertilizante de plantas brasileiras contaminantes ocasionais de pastagens de bovinos e outros herbívoros de interesse econômico. *Pesq. Vet. Bras.* v.12, p.11-18, 1992.
- LARSEN, J. F. Electron microscopy of the chorioallantoic placenta of the rabbit: the placental labyrinth and the multinucleated giant cells of the intermediate zone. *J. Ultrastruct. Res.*, v.7, p.535-549, 1962.
- LARSSON, A.; PALM, M.; HANSSON, L. O. et al. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. *BJOG*, v. 115, p. 874–881, 2008.
- LÉGA, E.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. et al. Determinação da idade fetal por meio da técnica ultra-sonográfica de fetometria e de morfologia fetal em cabras. *Arq. Bras. Med. Vet.*, v. 59, p. 851-856, 2007.
- LEITE, L. G.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. et al. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 22, p. 73–78, 2002.
- LI, Y.; GONZALEZ, P.; ZHANG, L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog. Neurobiol.*, v. 98, p. 145–165, 2012.
- LÓPEZ-TELLO, J.; BARBERO, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Characterization of early changes in fetoplacental hemodynamics in a diet-induced rabbit model of IUGR. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, v.6, p.454-461, 2015.
- LUCENA, RICARDO B.; RISSI, DANIEL R.; MAIA, LISANKA A. et al. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, p. 447–452, 2010.
- MADER, D.R. Rabbits: basic approach to veterinary care. In: HILLYER, E.V.; QUESENBERRY, K.E. *Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders. p.160-168, 1997.
- MARONGIU, M. L.; DIMAURO, C. Preliminary study on factors influencing rabbit doe reproductive efficiency: Effect of parity, day of mating and suckling on ovarian status and estrogen levels at day 6 of pregnancy. *Can. J. Vet. Res.*, v.77, p.126-130, 2013.

- MARTINS, T. M.; BORGES, A. M. Avaliação uterina em vacas durante o puerpério. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 4, p. 433–443, 2011.
- MCARDLE, A.M.; DENTON, K. M.; MADUWEGEDERA, D. et al. Ontogeny of placental structural development and expression of the renin–angiotensin system and 11b-HSD2 genes in the rabbit. *Placenta*, v.30, p.590–598, 2009.
- MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.*, v.99, p. 157-168, 1998.
- MCNEELY, M. D.; BAERRIS, B.; PAPSIN, F. R. et al. Creatine kinase and its isoenzymes in the serum of women during pregnancy and the peripartum period. *Clinical Chemistry*, v. 23, n. 10, p. 1878–1880, 1977.
- MELO, M. M. Plantas que causam aborto e alterações congênitas. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, v.49, p.41-46, 2006.
- MELO, M. M. Estudo fitoquímico e intoxicação experimental pela *Tetrapteryx multiglandulosa* A. JUSS. (*Malpighiaceae*) em cabras gestantes. 1998. 306p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Triagem fitoquímica preliminar da *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (*Malpighiaceae*). *Rev. Bras. Toxicol.*, v.12, n.2, p. 55-62, 1999.
- MELO, M. M.; VASCONCELOS, A. C.; DANTAS, G. C. et al. Experimental intoxication of pregnant goats with *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (*Malpighiaceae*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, p.58-65, 2001.
- MELO, M. M.; VEADO, J. C. C.; ALZAMORA FILHO, F. Aspectos clínicos da intoxicação experimental pela *Tetrapteryx multiglandulosa* em cabras gestantes. *Vet. Not.*, v. 8, n.1, p. 17-26, 2002.
- MENDONÇA, F. S.; NASCIMENTO, N. C. F.; ALMEIDA, V. M. et al. An outbreak of poisoning by *Kalanchoe blossfeldiana* in cattle in northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod*. p. 8–11, 2017.
- MOE, SHARON M. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim. care*, v. 35, p. 215–37, v–vi, 2008.
- NAYLOR, K E; IQBAL, P; FLEDELIUS, C. et al. The effect of pregnancy on bone density and bone turnover. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 15, n. 1, p. 129–137, 2000
- NICHOLLS, P. K.; SUN, Z.; HENG, S. et al. Embryo implantation is closely associated with dynamic expression of proprotein convertase 5/6 in the rabbit uterus. *Reprod. Biol Endocrinol*, v. 9, p. 1-10, 2011.
- NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M. et al. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 24, p. 132–143, 2004.
- NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A.C.; MARTINS, E. et al. Maturação e liberação placentária em bovinos e sua relação com apoptose. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, p.513-525, 2001.
- NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. Ultra-som diagnóstico em pequenos animais. São Paulo, Roca, 2004.

- PANTER, K. E. E; STEGELMEIER, B. L. Effects of xenobiotics and phytotoxins on reproduction in food animals. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 27, p. 429–446, 2011.
- PARIGI-BINI, R.; XICCATO, G.; CINETTO, M. et al. Energy and protein utilization and partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. *Animal Prod.*, v. 55, p. 153–162, 1992.
- PEDROSO, P.M. O.; BANDARRA, P.M.; JÚNIOR, P. B. et al. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, p. 404-408, 2009.
- PESSOA, C. R. M.; MEDEIROS, R. M. N.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p.752-758, 2013.
- QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F; ZERAIK, M. L. et al. Chemical composition of the bark of *Tetrapteryx mucronata* and identification of acetylcholinesterase inhibitory constituents. *J. Nat. Prod.*, v. 77, n. 3, p. 650–656, 2014.
- RADOSTITS O. M.; BLOOD, D.C.; GAY, C. C. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 1737p.
- RAFFI, M. B.; BARROS, R. R.; BRAGANÇA J. F. M. et al. The pathogenesis of reproductive failure induced in sheep by the ingestion of *Ateleia glazioviana*. *Vet. Human Toxicol.*, v.46, p.233-238, 2004.
- RIET-CORREA F.; MEDEIROS R. M. N. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, p.38-42, 2001.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T; SCHILD, A. L. A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. *J. Appl. Toxicol.*, v. 32, p.245-254, 2012.
- RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. et al. Abortion and neonatal mortality in sheep poisoned with *Tetrapteryx multiglandulosa*. *Vet. Pathol.*, v.46, p.960-965, 2009.
- RIET-CORREA, G.; TERRA, F. F.; SCHILD, A. L. et al. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.25, p.91-96, 2005.
- SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. *Patologia veterinária*. 1. ed. São Paulo: Roca. 2010. 892p.
- SANTOS, R. L.; MELO, M. M.; SERAKIDES, R. et al. Experimental pathological study of female rats treated with *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.50, p. 375-379, 1998.
- SCHWARZ, A.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. et al. Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. *Neurotoxicol. Teratol.*, v. 25, p. 615–626, 2003.
- SENGER, P. L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2. ed. Washington: Pullman, 2003. 373p.
- SILVA, C. M. Uso do diâmetro biparietal para estimar a idade gestacional em cadelas (Dissertação mestrado). 2013. Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes.

- SILVA, M. R. C.; STERMAN, F.A.; ALMEIDA, A. H. Mensuração ultra-sonográfica das dimensões da placenta em gestações normais em cadelas da raça Boxer e sua relação com a idade gestacional. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v. 40, p. 136–140, 2003.
- SILVA, M. R. C.; STERMAN, F. A.; ALMEIDA, A. H. Mensuração ultra-sonográfica das dimensões do crânio fetal em gestações normais em cadelas da raça boxer e sua relação com a idade gestacional. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 44, p. 25-29, 2007
- SIROIS, M. *Medicina de animais de produção: princípios e procedimentos*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2008. 332p.
- SOMA-PILLAY, P; NELSON-PIERCY, C; TOLPPANEN, H. et al. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc. J. Afr.*, v. 27, p. 89–94, 2016.
- SÖMJEN, D; WEISMAN, Y; HARELL, A. et al. Direct and sex-specific stimulation by sex steroids of creatine kinase activity and DNA synthesis in rat bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, n. 9, p. 3361–5, 1989.
- SPINELLI, M. O.; MOTTA, M. C.; CRUZ, R. J. et al. Estudo dos Analitos Bioquímicos no Plasma de Coelhos (Nova Zelândia) Mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v.1, n.2, p.163-168, 2012.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. 1. ed. Barueri: Manole. 2008. 960p.
- STEGELMEIER, B. L.; GARDNER, D. R.; JAMES, L. F. et al. The toxic and abortifacient effects of ponderosa pine. *Vet. Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 22–28, 1996.
- STIGGER A. L.; BARROS C. S. L.; LANGOHR I. M. et al. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.21, p.98-108, 2001.
- STUART, L. D, JAMES, L. F, PANTER, K. E. et al. Pine needle abortion in cattle: pathological observations. *Cornell Vet.*, v.79, p.61-69, 1989.
- SUCKOW, M. A; STEVENS, K. A.; P. WILSON, R. P. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. 1. ed. London: Elsevier, 2012. 1288p.
- TAHERI, S.; SOLATI, A.; MORADI, P. et al. Toxic effects of *Nerium oleander* aqueous leaf extract on haematological parameters and histopathological changes of the lungs and heart in rabbits. *Comp. Clin. Pathol.*, v. 22, p. 1189-1193, 2013.
- TASAKA, A. C.; WEG, R.; CALORE, E. E. et al. Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. *Vet. Res. Commun.*, v. 24, p. 573–582, 2000.
- TEXEIRA, M. J.; SOUZA, D. M. B.; MELO, K. C. M. et al. Estimativa da data de parto em cadelas Rottweiler através de biometria fetal realizada por ultrassonografia. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 10, p. 853-861, 2009.
- THRALL, M.A; WEISER, G.; ALLISON; R. W. et al. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2 ed. Oxford: Wiley, 2012. 776p.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. *Plantas tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro: Helianthus. 2000. 310p.

- TOJO, A.; KINUGASA, S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int. J. Nephrol.*, v. 2012, p.1-9, 2012.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*, v.40, p.1635-1660, 2002.
- TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. et al. *Tetrapteryx* spp. (*Malpighiaceae*), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. *Pesq. Vet.Bras.*, v.9, p.23-44, 1989.
- VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to the inner cell mass and trophectoderm in in vitro produced embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 47, p. 47-56, 1997.
- VASHISHTHA, V. M; JOHN, T. J; KUMAR, A. Clinical e pathological features of acute toxicity due to *Cassia occidentalis* in vertebrates. *Indian J. Med. Res.*, v. 130, p. 23–30, 2009.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KRYPTOTOU, E.; SCORTTI, M.. Listeria placental infection. *mBio*, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2017.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but not prevent establishment of dominant follicle in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *An. Reprod. Sci.* v. 84, p. 1-12, 2004.
- WANG, S.; PANTER, K. E.; GARDNER, D. R. et al. Effects of the pine needle abortifacient, isocupressic acid, on bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 81, p. 237–244, 2004.
- WANG, S.; TANG. X.; NIU, Y. et al. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, v.25, p.481–489, 2007.
- WELLS, M. Y.; DECOBECQ, C. P-M; DECOUVELAERE, D. M. et al. Changes in Clinical Pathology Parameters During Gestation in the New Zealand White Rabbit. *Toxicol. Pathol.*, v. 27, p. 370–379, 1999.
- YPSILANTIS, P.; SARATSI, P. H. Early pregnancy diagnosis in the rabbit by real time ultrasonography. *World Rabbit Sci.* v.7, p.95-99, 1999.