

AValiação DO CICLO ESTRAL E TOXICIDADE SISTÊMICA DO EXTRATO DE *Vitex agnus-castus* (VERBENECEAE) EM RATAS WISTAR

Emanuela R. Moura (aluna de iniciação Científica Voluntária), Janylla M. G. de Oliveira, Tatiane N. da Costa (colaboradores, estudantes de Medicina Veterinária UFPI/CCA), Eilika A. F. Vasconcelos (colaboradora, depto. de Bioquímica e Farmacologia-CCS/UFPI) José Arimatéia D. Lopes (colaborador, depto de Química-CCN/UFPI), Prof. Dr. Amilton P. R. Costa (orientador, depto. de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI)

INTRODUÇÃO

Considerando a produção e a crescente comercialização de fitoterápicos como atividade de grande importância econômica e social, faz-se necessário à implantação de políticas que incentivem o cultivo e o beneficiamento de matérias-primas vegetais, bem como o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, pois dessa forma além de contribuir para o surgimento de um setor produtivo, o arsenal terapêutico seria aumentado por produtos com eficácia e segurança comprovadas.

A *Vitex agnus-castus* foi escolhida para o estudo de desenvolvimento de um fitoterápico por tratar-se de uma espécie com atividades farmacológicas comprovadas, como efeitos estimulantes e normalizador das funções da glândula pituitária, especialmente a função progesterona. Esta planta foi considerada mais eficiente que a piridoxina no alívio dos sintomas da Síndrome Pré-Menstrual (LAURITZEN et al, 1997). Outras pesquisas indicam que a referida planta atua sobre a glândula pituitária, estimulando o equilíbrio na produção de estrógeno e progesterona (MILEWICZ et al, 1993), tem também demonstrado inibição da secreção de prolactina e sendo usada no tratamento de mastalgia (KILICDAG et al, 2004).

Neste trabalho foram utilizadas as metodologias para investigação da toxicidade do extrato seco de folhas de *Vitex agnus-castus*, como parâmetros bioquímicos: Ácido úrico, TGO, TGP, e uréia, massa relativa dos órgãos como coração, rins, fígado, ovários e útero, além da análise histopatológica destes órgãos e avaliação do ciclo estral de ratas Wistar.

METODOLOGIA

O extrato hidroalcoólico das folhas secas e trituradas foi preparado por maceração com etanol a 70%, durante cinco dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foi concentrado em rotavapor a 50° C, sendo então acondicionado em frascos de vidro e conservado na geladeira. Foram utilizadas 16 ratas Wistar, pesando entre 140-200g, sendo oito do grupo controle que recebeu solução salina (NaCl a 0,9 %) por via gástrica, na dose de 1mL/100g de peso corporal, e oito do grupo experimental, tratado com extrato de *Vitex agnus-castus*, por via gástrica, 1mL/100g de peso corporal, na concentração de 75 mg/mL, por 30 dias. Concomitantemente, as ratas foram examinadas diariamente, entre 7:00 e 8:00 horas, quanto à fase do ciclo estral. A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica contendo aproximadamente 10µL de salina, depositada sobre uma lâmina de vidro para microscopia e analisada por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x.

Ao final do tratamento, as ratas foram anestesiadas, procedida a coleta de sangue por meio de punção cardíaca, em frascos sem anticoagulante, adicionados de ativador de coágulo (BD-

Vacurette Z serum clot activator – BD-Indústria Cirúrgica LTDA – Juiz de Fora, MG), para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Em seguida, foram eutanaziadas, por excesso de anestésico, para coleta e avaliação dos órgãos internos.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos: As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos e o soro separado. As determinações bioquímicas foram realizadas por química seca (Reflotron, Roche Diagnostics Brasil) e Kits reagentes para proteínas totais e albumina (Labtest, Belo Horizonte). Foram avaliados os seguintes parâmetros séricos: TGO, TGP, creatina, uréia e glicose.

Análise Histopatológica: Foram realizadas, ressecção de coração, fígado, rins, ovários e útero. As secções teciduais dos órgãos excisados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (BACHA; WOOD, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 μM e subseqüentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz. Os dados foram analisados pelo test t de Student, adotando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer do experimento, as ratas foram avaliadas quanto ao ganho de peso semanal, bem como quanto ao consumo diário de água e ração, sendo que cada animal consumiu em média 15 gramas de ração comercial e 30 mL de água clorada.

Tabela 1. Duração média (em horas) do ciclo estral da ratas tratadas com salina (grupo controle) e de ratas tratadas com extrato *Vitex- agnus*

Grupo	Duração média do ciclo estral (horas)
Controle	75,6 \pm 5,96 ^a
Extrato	82,9 \pm 5,00 ^a

^aNão houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

A duração do ciclo estral é representada pelo intervalo entre estros. Na rata, o ciclo estral regular varia de 98 a 106 horas, sendo que o proestro varia de 12 a 14, o estro de 25 a 27, o metaestro de 6 a 8 e o diestro de 55 a 57 horas (FREEMAN, 1994). Neste experimento (Tabela 1), observou-se uma duração média de ciclo estral de 75,56 no grupo controle e 82,9 no grupo extrato, contudo, esses valores não apresentaram diferença estatística significativa.

Em relação ao peso dos órgãos, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os animais do controle e os animais tratados com o extrato em estudo.

A análise histopatológica não revelou sinais de alterações degenerativas, inflamatórias ou necróticas, seja no coração, fígado, baço, adrenal, ovário, útero e pulmão das ratas do grupo submetido ao tratamento com extrato em relação ao grupo controle, mostrando que o extrato não alterou as estruturas morfológicas destes órgãos. No entanto, esta mesma análise apontou alterações do tipo infiltrado inflamatório na região cortico-medular focal perivascular de intensidade mínima nos rins de metade dos animais do grupo tratado com o extrato de *V. agnu- castus*.

Tabela 2. Níveis plasmáticos da uréia, creatinina, glicose, TGO e TGP em ratas não tratadas e tratadas com extrato *Vitex agnus-castus*

Parâmetros Bioquímicos	Controle	Extrato
Uréia (mg/dl)	40,4 ± 1,78 ^a (35,62-63,17)	34 ± 5,99 ^a
Creatinina(mg/dl)	<0,5 ^a (<0,7)	<0,5 ^a
Glicose(mg/dl)	110,9 ± 14,6 ^a (81,81-116,18)	60,9 ± 18,2 ^b
TGO(U/l)	188,2 ± 35,8 ^a (10,01-100,79)	82,2 ± 15,2 ^b
TGP(U/l)	65,8 ± 79,2 ^a (45,19-77,41)	50,5 ± 59,9 ^b

^a Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística significativa (p<0,05)

Os valores de uréia e creatinina dos grupos testados não apresentaram diferença significativa (p<0,05). Diferente do encontrado por Sousa (2008), onde houve redução da creatinina após tratamento subagudo do óleo essencial de *Piper aduncum* L.. Os valores de glicose encontram-se abaixo dos valores de referência para roedores no grupo extrato, denotando alguma patologia de origem renal, o que pode ser confirmado pelas alterações encontradas na análise histopatológica desses órgãos. Os níveis plasmáticos de TGO e TGP foram menores no grupo tratado, denotando possível efeito hepatoprotetor do extrato de *Vitex agnus-castus*.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato da planta *Vitex agnus-castus*, não teve influência sobre os parâmetros de ciclicidade das ratas. Todavia, o mesmo apresentou alterações relativas aos parâmetros bioquímicos, como diminuição sérica de glicose e das enzimas hepáticas TGO e TGP, além de provocar alterações renais relevantes.

APOIO: Programa PIBIC/ PRPPG/UFPI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACHA, W. J.; WOOD, L. M. Color atlas of veterinary histology. Ed: Lea & Febiger, p. 269, 1990.
2. FREEMAN, ME. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E; NEIL, J. (Editors), **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994..
3. KILICDAG, E.B., *et al.* Fructus agni casti and bromocriptine for treatment of hyperprolactinemia and mastalgia. **Int J Obstet Gynecol**. v. 85, p. 292-293, 2004.
4. LAURITZEN, C. *et al.*, Treatment of premenstrual tension syndrome with *Vitex agnus castus*-controlled double-blind study versus pyridoxine. **Phytomedicine**. v. 4, p.183-189, 1997.
5. MILEWICZ A., *et al.* *Vitex agnus castus* extract in the treatment of luteal phase defects due to latent hyperprolactinemia. Results of a randomized placebo-controlled double-blind study. **Drug Res**. v. 43, n. 7, p. 752-756, 1993.
6. SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.. **Rev. Bras. Farmacognosia**. 18(2): Abr./Jun. 2008.

Palavras-chave: Fitoterápico. Toxicidade. Reprodução.