

L-mimosina: Estudo de teratogenicidade em ratos

Vinicius Leon dos Santos Ferreira^{1*}

Elaine Renata Motta de Almeida¹

Silvana Lima Górnaiak¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Departamento de Patologia (VPT), Universidade de São Paulo (USP)

*vlsfleon@usp.br

Objetivos

L-mimosina é um aminoácido não proteico tóxico, principal composto encontrado na leguminosa *Leucena leucocephala*, planta distribuída por diversos países de clima tropical e subtropical. Possui uso na alimentação animal e, em alguns países da Ásia, uso na alimentação humana e na medicina tradicional (Zayed e Samling, 2016). Teoriza-se que, tanto seus efeitos tóxicos como os supostos efeitos terapêuticos, têm como base a propriedade da L-mimosina de quelar metais, assim como sua semelhança estrutural com a tirosina, conferindo a esta molécula a capacidade de atuar em diversos sítios enzimáticos do ciclo celular (Gotardo et al., 2021). Sua toxicidade é bem conhecida e extensamente descrita em ruminantes. No entanto, existe pouca informação acerca de seus efeitos tóxicos na gestação de outros mamíferos. O objetivo deste trabalho é, portanto, avaliar a toxicidade materno-fetal da L-mimosina, quando administrada na dose de 240 mg/kg/dia de peso corporal, durante o período gestacional, em ratas Wistar.

Métodos e Procedimentos

Um total de 13 ratas Wistar, prenhes, com idade aproximada de 90 dias, foram separadas em dois grupos: um grupo controle (n=6) e um grupo experimental (n=7), no qual a L-

mimosina foi administrada oralmente do 6º ao 19º dia de gestação (DG), na dose de 240 mg/kg/dia. A administração da L-mimosina foi feita por sua inserção em tabletes de gelatina palatáveis. Foi monitorado a cada três dias o ganho de peso, o consumo de água e de ração das mães do 6º DG até o 18º DG e, após isso, no 20º DG, quando esses animais foram submetidos à laparotomia exploratória e cesárea. Após abertura da cavidade abdominal e exposição dos cornos uterinos, os fetos foram contados e tiveram suas posições marcadas. Foi contabilizado o número de fetos vivos e mortos, número de implantações e reabsorções e número de corpos lúteos. Os úteros e placentas foram pesados e os fetos individualizados, para que fossem pesados, sexados, medidos os comprimentos corpóreos, occipital-nasal e biparietal. Ainda, foram coletados o timo, baço, fígado e rins das mães. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 6 © (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As médias de cada grupo foram comparadas entre si por meio de testes T integrados a testes F. Para parâmetros reprodutivos e fetais, um procedimento de controle da taxa de falsa descoberta (FDR) foi realizado, com o objetivo de reduzir a ocorrência do erro tipo I, como proposto por Benjamini & Hochberg (1995). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ (CEUA: 2926260219).

Resultados Parciais

A avaliação dos dados obtidos mostrou claramente a diferença no peso dos fetos e das placentas ($p < 0,0001$) e nos comprimentos corpóreo e occipital nasal ($p < 0,05$). Os fetos do grupo experimental nasceram com menor peso, comprimento e circunferência craniana, quando comparado com os fetos do grupo controle. Vale ressaltar que não houve qualquer alteração digna de nota nos parâmetros maternos ($p > 0,05$), exceto a diminuição do peso relativo do timo ($p = 0,001$), do consumo de ração nos últimos dois dias e no ganho de peso do 15^o DG ($p < 0,05$), mostrando, portanto, que a L-mimosina deve promover uma alteração direta no desenvolvimento fetal.

Parâmetro Materno	Grupos		p Valor
	Controle	Experimental ^a	
Ganho de Peso (g)			
0-6 DG	20,83 ± 2,98	25,14 ± 1,14	0,180
6-9 DG	5,83 ± 0,79	3,57 ± 0,78	0,068
9-12 DG	11,83 ± 1,49	13,00 ± 0,81	0,490
12-15 DG	17,83 ± 1,40	10,57 ± 1,46	0,005
15-18 DG	25,33 ± 2,70	23,71 ± 2,79	0,688
18-20 DG	26,67 ± 3,14	21,29 ± 3,17	0,256
Consumo de água (ml)			
6-9 DG	117,5 ± 8,44	109,3 ± 3,16	0,354
9-12 DG	129,2 ± 10,03	159,3 ± 35,35	0,462
12-15 DG	147,5 ± 14,99	164,3 ± 31,91	0,662
15-18 DG	149,2 ± 12,87	161,4 ± 31,50	0,741
18-20 DG	155,8 ± 51,69	130,0 ± 45,07	0,712
Consumo de Ração (g)			
6-9 DG	71,17 ± 2,53	67,57 ± 1,06	0,194
9-12 DG	72,50 ± 2,07	69,14 ± 1,84	0,251
12-15 DG	76,83 ± 2,75	70,14 ± 2,75	0,116
15-18 DG	76,67 ± 3,08	67,29 ± 2,95	0,051
18-20 DG	56,67 ± 2,55	49,29 ± 1,35	0,022
Peso Relativo			
Timo	0,00093 ± 0,00011	0,00047 ± 2,67*	0,001
Baço	0,00174 ± 7,83*	0,001624 ± 6,98*	0,269
Fígado	0,04355 ± 0,00051	0,04429 ± 0,00088	0,503
Rim E	0,00276 ± 4,67*	0,00294 ± 0,00019	0,407
Rim D	0,00292 ± 0,00012	0,00313 ± 0,00012	0,271

^a Experimental: 240 mg/kg/dia de L-mimosina. Teste t

*Multiplicado por 10⁻⁵

Tabela 1: Parâmetros maternos

Parâmetro Fetal	Grupos		p Valor	p Score	Valor Crítico
	Controle	Experimental ^a			
Peso (g)					
Corpóreo	3,56 ± 0,047	3,25 ± 0,051	< 0,0001	1	0,006
Placenta	0,43 ± 0,010	0,38 ± 0,008	< 0,0001	2	0,011
Comprimento (cm)					
Corpóreo	3,53 ± 0,026	2,53 ± 0,125	< 0,0001	3	0,017
Occipital-Nasal	1,33 ± 0,017	1,22 ± 0,018	0,0002	4	0,022
Biparietal	0,66 ± 0,020	0,60 ± 0,021	^b 0,0327	5	0,028

^a Experimental: 240 mg/kg/dia de L-mimosina. Teste t

^bNão Significante após controle de FDR

Tabela 2: Parâmetros Fetais

Conclusões

Com os resultados obtidos até o momento, pouco se pode inferir acerca dos efeitos da L-mimosina nas mães, haja vista que os parâmetros observados se mantiveram constantes entre os grupos, salvo pela possibilidade de alterações imunológicas, que deverá ser elucidada futuramente.

Por outro lado, fica evidente a diferença existente no desenvolvimento fetal dos fetos do grupo experimental, que se apresentaram menos desenvolvidos que os do grupo controle.

Referências Bibliográficas

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

GOTARDO, André Tadeu et al. Potential toxic effects produced by L-mimosine in the thyroid and reproductive systems. Evaluation in male rats. **Toxicol**, v. 203, p. 121-128, 2021.

ZAYED, Mohamed Zaky; SAMLING, Benedict. Phytochemical constituents of the leaves of *Leucaena leucocephala* from Malaysia. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 8, n. 12, p. 174-79, 2016.

L-mimosine: Teratogenicity study in rats

Vinicius Leon dos Santos Ferreira^{1*}

Elaine Renata Motta de Almeida¹

Silvana Lima Górnaiak¹

Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science,
University of São Paulo

*vlsfleon@usp.br

Objectives

L-mimosine is a toxic non-protein amino acid, the main compound found in the legume *Leucena leucocephala*, a plant distributed in several tropical and subtropical countries. It has use in animal feed and, in some Asian countries, use in human food and traditional medicine (Zayed e Samling, 2016). It is theorized that both its toxic effects and its supposed therapeutic effects are based on the property of L-mimosine to chelate metals, as well as its structural similarity to tyrosine, giving this molecule the ability to act in several enzymatic sites of the cell cycle. Its toxicity is well known and has been extensively described in ruminants. However, there is little information about its toxic effects on pregnancy in other mammals. The objective of this study is, therefore, to evaluate the maternal-fetal toxicity of L-mimosine, when administered at a dose of 240 mg/kg of body weight, during the gestational period, in female Wistar rats.

Materials and Methods

A total of 13 pregnant Wistar rats, aged approximately 90 days, were divided into two groups: a control group (n=6) and an experimental group (n=7), in which L-mimosine was administered orally from the 6th to 19th gestational day (GD), at a daily dose of 240 mg/kg. L-mimosine was administered by inserting it into palatable gelatin tablets. The weight gain, water and feed consumption of the

mothers were monitored every three days from the 6th GD to the 18th GD and, after that, at the 20th GD, when they underwent exploratory laparotomy and cesarean section. After opening the abdominal cavity and exposing the uterine horns, the fetuses were counted and their positions marked. The number of live and dead fetuses, number of implantations and resorptions and number of corpora lutea were counted. The uteri and placentas were weighed and the fetuses were individualized so that they were weighed, sexed, and body, occipital-nasal and biparietal lengths were measured. Also, the thymus, spleen, liver and kidneys of the mothers were collected. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6 © software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The means of each group were compared with each other using T tests integrated with F tests. For reproductive and fetal parameters, a false discovery rate (FDR) control procedure was performed, with the objective of reducing the occurrence of type error I, as proposed by Benjamini & Hochberg (1995). The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science - FMVZ (CEUA: 2926260219).

Partial Results

The evaluation of the obtained data clearly showed the difference in fetal and placental weight ($p < 0.0001$) and in body and nasal occipital lengths ($p < 0.05$). The fetuses in the experimental group were born with lower weight, length and head circumference when

compared to the fetuses in the control group. It is worth mentioning that there was no noteworthy change in maternal parameters ($p > 0.05$), except for the decrease in the relative weight of the thymus ($p = 0.001$), in feed consumption in the last two days and in wheight gain at 15° GD ($p < 0.05$), thus showing that L-mimosine should promote a direct change in fetal development.

Maternal Parameter	Group		p Value
	Control	Experimental ^a	
Wheight gain (g)			
0-6 GD	20,83 ± 2,98	25,14 ± 1,14	0,180
6-9 GD	5,83 ± 0,79	3,57 ± 0,78	0,068
9-12 GD	11,83 ± 1,49	13,00 ± 0,81	0,490
12-15 GD	17,83 ± 1,40	10,57 ± 1,46	0,005
15-18 GD	25,33 ± 2,70	23,71 ± 2,79	0,688
18-20 GD	26,67 ± 3,14	21,29 ± 3,17	0,256
Water consumption (ml)			
6-9 GD	117,5 ± 8,44	109,3 ± 3,16	0,354
9-12 GD	129,2 ± 10,03	159,3 ± 35,35	0,462
12-15 GD	147,5 ± 14,99	164,3 ± 31,91	0,662
15-18 GD	149,2 ± 12,87	161,4 ± 31,50	0,741
18-20 GD	155,8 ± 51,69	130,0 ± 45,07	0,712
Feed consumption (g)			
6-9 GD	71,17 ± 2,53	67,57 ± 1,06	0,194
9-12 GD	72,50 ± 2,07	69,14 ± 1,84	0,251
12-15 GD	76,83 ± 2,75	70,14 ± 2,75	0,116
15-18 GD	76,67 ± 3,08	67,29 ± 2,95	0,051
18-20 GD	56,67 ± 2,55	49,29 ± 1,35	0,022
Relative weight			
Thymus	0,00093 ± 0,00011	0,00047 ± 2,67*	0,001
Spleen	0,00174 ± 7,83*	0,001624 ± 6,98*	0,269
Liver	0,04355 ± 0,00051	0,04429 ± 0,00088	0,503
Left kidney	0,00276 ± 4,67*	0,00294 ± 0,00019	0,407
Right kidney	0,00292 ± 0,00012	0,00313 ± 0,00012	0,271

^a Experimental: 240 mg/kg/day of L-mimosine. T test

*Multiplied by 10^{-5}

Table 1: Maternal Parameters

Fetal Parameter	Group		p Value	p Score	Critical Value
	Control	Experimental ^a			
Wheight (g)					
Body	3,56 ± 0,047	3,25 ± 0,051	< 0,0001	1	0,006
Placental	0,43 ± 0,010	0,38 ± 0,008	< 0,0001	2	0,011
Length (cm)					
Body	3,53 ± 0,026	2,53 ± 0,125	< 0,0001	3	0,017
Occipital-Nasal	1,33 ± 0,017	1,22 ± 0,018	0,0002	4	0,022
Biparietal	0,66 ± 0,020	0,60 ± 0,021	^b 0,0327	5	0,028

^a Experimental: 240 mg/kg/day of L-mimosine. T test

^bNot significant after FDR control

Table 2: Fetal parameters

Conclusions

With the results obtained so far, little can be inferred about the effects of L-mimosine on mothers, given that the parameters observed remained constant between the groups, except for the possibility of immunological alterations, which should be elucidated in the future.

On the other hand, the difference in the fetal development of the fetuses in the experimental group, which were less developed than those in the control group, is evident.

References

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

GOTARDO, André Tadeu et al. Potential toxic effects produced by L-mimosine in the thyroid and reproductive systems. Evaluation in male rats. **Toxicon**, v. 203, p. 121-128, 2021..

ZAYED, Mohamed Zaky; SAMLING, Benedict. Phytochemical constituents of the leaves of *Leucaena leucocephala* from Malaysia. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 8, n. 12, p. 174-79, 2016.