

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LUCAS ROBERTO PESSATTO

EFEITOS DAS FRAÇÕES DICLOROMETANO E BUTANÓLICA DE *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO, DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL E INTEGRIDADE DO DNA

Campo Grande - MS

2017

LUCAS ROBERTO PESSATTO

EFEITOS DAS FRAÇÕES DICLOROMETANO E BUTANÓLICA DE *Gochnatia Polymorpha* ssp. *floccosa* SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO, DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL E INTEGRIDADE DO DNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Campo Grande

2017

LUCAS ROBERTO PESSATTO

EFEITOS DAS FRAÇÕES DICLOROMETANO E BUTANÓLICA DE *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO, DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL E INTEGRIDADE DO DNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho
Universidade Católica Dom Bosco-UCDB

Campo Grande

2017

“E conhecereis a verdade, e a verdade vos libertará”

João, 8:32

*Aos meus pais, **Hélio** e **Otília** e aos meus
avós **Vivaldino** (in memoriam), **Teresinha**, **José** e
Zaira pelo amor e incentivo a mim sempre dados.*

Agradecimentos

***Deus** obrigado por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou.*

*Aos meus pais **Otília** e **Hélio**, pelas palavras de apoio, sempre confiando em mim e na minha capacidade. Não existem palavras que expressem a minha gratidão por tudo o que fizeram por mim.*

*Ao meu grande orientador, Professor **Dr. Rodrigo Juliano Oliveira** que, mesmo sabendo das minhas limitações, me recebeu de forma fraternal, sempre prestativo e de prontidão para repassar seu grandioso conhecimento. Pessoa pela qual possuo uma grande admiração e tomo com exemplo para a vida.
Sempre serei grato pelos auxílios, gentileza e amizade.*

*À minha namorada **Carol** por todo incentivo, palavras de apoio e por ter dado ouvido aos meus desabafos e lamentações.*

*Ao meu amigo **João** pela amizade sólida que cultivamos e pelas grandiosas ajudas durante todo o mestrado.*

*Ao amigo **Michel** pela grande amizade que formamos, onde desde o início da caminhada dividimos momentos de alegria e de apoio.*

*À amiga **Andreza** pela ajuda, preocupação, confiança e pelos momentos de alegria compartilhados.*

*Ao amigo e grande Professor **Alexandre Nick** o primeiro e grande incentivador a iniciar esse mestrado. Agradeço pelo estímulo, conselhos, palavras de apoio e pelo compartilhamento de experiências.*

Agradecimentos

*Aos colegas, **Ana Paula, Bruna, Bruno, Edwin, Indiara, Juliana, Larissa, Laynna, Leal, Raíssa, Sara, Sílvia, Yasmin e Natan** que me ajudaram de alguma maneira durante o mestrado.*

*À **Caroline** mesmo não conhecendo pessoalmente, foi fundamental para a realização deste trabalho.*

*Às técnicas de laboratório, em especial a **Ana** pelo apoio.*

*Ao professor **Dr. Jeandre** pelas excelentes aulas ministradas e por contribuir na correção deste trabalho e pelas participações nas bancas.*

*Ao professor **Dr. Cristiano** por nos receber de forma solícita na UCDB, contribuir na correção deste trabalho e pelas participações nas bancas.*

*À professora **Dr^a. Sarah** pelo apoio na tradução e pela ajuda no artigo.*

*À professora **Dr^a. Andrea Laura** pelas considerações e correções da dissertação.*

A todos os professores que ministraram aulas durante o mestrado.

*Ao **Luiz** secretário do programa, pela disposição, pelas palavras de apoio e pela amizade.*

*A **CAPES** pela ajuda financeira.*

Meus mais profundos e sinceros agradecimentos a todos.

RESUMO

PESSATTO, Lucas Roberto. Efeitos das frações diclorometano e butanólica de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* sobre o desempenho reprodutivo, desenvolvimento embriofetal e integridade do DNA. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Gochnatia polymorpha ssp. *floccosa* (Asteraceae), também conhecida como Cambará, é usada na medicina popular para tratar inflamações e infecções. Estudos prévios demonstraram que o extrato etanólico é indicado para a bioprospecção de um novo anti-inflamatório fitoterápico seguro durante a gravidez. Este trabalho teve como objetivo avaliar as frações diclorometano (DCM) e butanólica (BT) de *G. polymorpha* no desempenho reprodutivo, desenvolvimento embriofetal e integridade do DNA. Para tal estudo, fêmeas prenhes de camundongos Swiss foram tratadas com 50 e 20 mg/kg das frações DCM e BT, respectivamente, durante os períodos de organogênese e gestacional. Os resultados demonstram que as frações DCM e BT de *G. polymorpha* possuem atividade mutagênica, mas não apresentam atividade teratogênica e não alteram o desempenho reprodutivo. Com base na semelhança dos índices reprodutivos entre os animais dos grupos controles e tratados, pode-se inferir também que o efeito mutagênico teve ocorrência em células somáticas e não em células germinativas. Diante do exposto considera-se que a bioprospecção de um anti-inflamatório seguro, a partir da *G. polymorpha*, requer cuidados se consideradas as frações estudadas.

Palavras-chave: etnofarmacologia, teratogenicidade, malformação, mutagênese, medicina tradicional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Plantas medicinais.....	12
2.1.1. <i>Gochnatia polymorpha</i>	13
2.2. Toxicologia da reprodução	14
2.2.1. Desenvolvimento embrionário em camundongos	15
2.2.2. Teratogênese	17
2.3. Mutagênese	19
2.3.1. Micronúcleo.....	20
3. REFERÊNCIAS	21
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo geral	29
4.2 Objetivos específicos	29
4. MANUSCRITO – Artigo publicado no periódico <i>Journal of Ethnopharmacology</i>	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
6. ANEXO – Certificado da comissão de ética de animais / CEUA.....	42

1. INTRODUÇÃO

Muitas gestantes fazem uso de plantas com propriedades medicinais para o tratamento de doenças sem saber os potenciais riscos para sua saúde e de seus descendentes (PINN; PALLET, 2002; WEIER; BEAL, 2004). Apesar das propriedades benéficas que muitas plantas medicinais apresentam, compostos que fazem parte de sua constituição podem alterar o desenvolvimento embrionário ou fetal por possuir ação mutagênica, carcinogênica (LAPA, et al. 2004), citotóxica (MALPATHAK; KEDARI, 2016), apoptótica (TAECHAKULWANIYA et al., 2016) e por interferir no processo de diferenciação celular.

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, encontra-se a *Gochnatia polymorpha* ssp. *Floccosa* conhecida popularmente por Cambará. Essa espécie pode ser localizada em diversas regiões do Brasil e em outros países sul-americanos (SANCHO; FUNK; ROQUE, 2013; SANCHO; ROQUE, 2013), sendo muito utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças, principalmente do trato respiratório (GARLET; IRGANG, 2001; BUENO et al., 2005; ARAMBARRI et al., 2008). Estas propriedades benéficas estão associadas à presença de diversos compostos como as lactonas sesquiterpênicas, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, cumarinas, compostos fenólicos e óleo essencial (FARIAS et al., 1984; BOHLMANN et al., 1986; MOREIRA et al., 2000; CATALAN et al., 2003; STEFANELLO et al., 2006; PIORNEDO et al., 2011. SILVA et al., 2011; STRAPASSON et al., 2011).

Estes compostos biossintéticos presentes na *G. polymorpha* também são produzidos por outras espécies da família Asteraceae (STEFANELLO et al., 2006). Segundo Maggi et al. (2005), alguns desses metabólitos tem como principal função conferir proteção a planta, principalmente, por meio de ação inseticida ou contra outras ações parasitárias. Para tais funções, essas substâncias apresentam diferentes mecanismos de ação. Dentre eles a atividade genotóxica que, de forma randômica, pode interferir em genes importantes, como por exemplo, os relacionados ao desenvolvimento fetal ou genes responsáveis pela regulação de ciclo celular, reparo e apoptose. Alteração na expressão desses genes pode desencadear processos teratogênicos e carcinogênicos (ALMEIDA, 1993; FONSECA et al., 1994; VERSCHAEVE et al., 2004; VILAR et al., 2008; VILAR et al., 2011).

Na análise química sobre o óleo essencial de *G. polymorpha* apresentada por Stefanello et al. (2006), foram identificados 30 componentes, sendo que na família Astarcea a formação de terpenos, especialmente lactonas sesquiterpênicas é predominante. Em outro estudo do grupo, foram avaliados o extrato etanólico de *G. polymorpha* (EEGP) e as frações diclorometano (DCM) e butanólica (BT) quanto ao seu potencial citotóxico. Os resultados mostraram que tanto o EEGP quanto as frações possuem atividade citotóxica nas nove linhagens celulares tumorais testadas, com a atividade preponderada da fração DCM. Atividades estas que podem relacionar-se a mecanismos genotóxicos (STRAPASSON, et al., 2011, DAVID et al., 2014).

Foram também isolados seis componentes da fração DCM, sendo eles: 11a,13-dihydrozalanin C, 10-desoxygochnatiolide A, gochnatiolide A, 8-hydroxi-10-desoxygochnatiolide A e isolados 8-hydroxigochnatiolide, entre os quais apresentaram atividade citotóxica relevante os compostos 10-desoxygochnatiolide A e gochnatiolide A (STRAPASSON, et al., 2011).

Além dos dados acima citados, a literatura ainda indica que o EEGP possui eficiente ação anti-inflamatória com uso seguro durante o período gestacional (DAVID et al., 2014). No entanto, este autor não descreveu os efeitos das frações obtidas a partir desse extrato. Diante disso, esta pesquisa deu continuidade aos estudos de David et al. (2014), e de forma pioneira descreverá o potencial genotóxico e/ou teratogênico das frações diclorometano (DCM) e butanólica (BT). Somente dessa forma será possível inferir segurança de uso em humanos e, principalmente, para mulheres em períodos gestacionais, que estão susceptíveis a efeitos prejudiciais a sua prole.

Frente ao exposto, a avaliação das frações DCM e BT provenientes do EEGP, em modelos de desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal também se torna uma prioridade, visto que são importantes pontos de partida para a bioprospecção de um medicamento anti-inflamatório seguro para gestantes. Reforça essa relevância o fato dos anti-inflamatórios não esteroidais, drogas muito prescritas no primeiro trimestre da gestação (OLESEN et al., 1999), estarem relacionados ao desenvolvimento de malformações cardíacas, vasculares e gastrosquise (MARTÍNEZ; RODRÍGUEZ; PRIETO, 1997; SUAREZ et al., 2002; CAPPON; COOK; HURTT, 2003; OFORI et al., 2006; DAVID et al., 2014).

Este estudo baseou-se em metodologias clássicas para avaliar a ação das frações DCM e BT, sobre o DNA, o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento embriofetal em fêmeas prenhes de camundongos *Swiss* (AUHAREK et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013a; GONÇALVES et al., 2013b).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas medicinais

A utilização das plantas medicinais para cura e prevenção de doenças é uma prática que remete ao início da civilização humana e tem se perpetuado ao longo das gerações por meio de uma dinâmica própria, com base no empirismo (VEIGA et al., 2005). Mesmo com os avanços farmacológicos e a fácil acessibilidade da aquisição de medicamentos, diversas comunidades tradicionais ainda veem nas plantas medicinais e seus produtos uma excelente alternativa para a cura e prevenção de suas doenças (AZEVEDO; SILVA, 2006; MUKUNGU et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população, principalmente em países emergentes, são dependentes da medicina tradicional para suprir as demandas relacionadas à saúde e 85% da medicina tradicional utilizam plantas, números que denotam aproximadamente 3,5 a 4,0 bilhões de pessoas ao redor do mundo fazendo uso de plantas medicinais com frequência (HERSCH-MARTÍNEZ, 1995; FARNSWORTH, 1997). Além disso, segundo Yune e Calixto (2001), 14% dos medicamentos industriais comercializados são provenientes de produtos naturais. Sendo que desse total, 25% são de origem vegetal, 13% de microorganismos e 3% de origem animal.

Esse conhecimento empírico sobre as propriedades benéficas das espécies vegetais muitas vezes não tem validação farmacológica comprovada. No entanto, indicam o potencial etnofarmacológico e vias de pesquisas para a descoberta de novas substâncias bioativas que são fontes de recursos terapêuticos e base para a indústria farmacêutica (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Neste cenário botânico global, o Brasil se destaca por possuir mais de 55.000 espécies catalogadas e outras 350.000 a 550.000 que ainda precisam ser identificadas (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010).

Nessa premissa, é de suma importância a investigação científica para caracterizar, identificar, comprovar a ação terapêutica e, acima de tudo, demonstrar segurança no uso (ARCOLINE, 2003), descartando como, por exemplo, ações mutagênicas, teratogênicas e/ou que possam alterar o desenvolvimento embriofetal de seres humanos (OLIVEIRA et al., 2009).

2.1.1. *Gochnatia polymorpha*

G. polymorpha, uma das 21 espécies do gênero *Gochnatia* (Cabrera) G. Sancho, é uma planta que possui vasta distribuição na América do Sul e pode ser encontrada em diversos biomas do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (SANCHO; FUNK; ROQUE, 2013; SANCHO; ROQUE, 2016).

G. polymorpha quando adulta é uma árvore de porte médio, com tamanho que varia de 3,5 a 10 m de altura. Seu tronco é tortuoso, com cerca de 20 a 50 cm de diâmetro, possui casca profundamente sulcada e estrias largas. Suas folhas são simples, alternadas, oval-lanceolada, com base e ápice agudos. As flores são de cor branco-amareladas, destacando-se por suas densas inflorescências nas axilas das folhas terminais. Os frutos são de porte pequeno, aquênios, com tamanho de 2 a 5 mm de comprimento, brancos e densamente pilosos (LORENZI, 1992; MARQUES, 2007).

Além da subespécie *floccosa* também é conhecida à subespécie *ceanothifolia* que possuem diferentes distribuições territoriais. A subespécie *ceanothifolia* ocorre no estado do Rio Grande do Sul e em países próximos como Uruguai, Paraguai e no nordeste da Argentina. Por sua vez, a subespécie *floccosa* apresenta-se somente no Brasil, podendo ser encontrada em Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SANCHO; ROQUE, 2016).

O Cambará, como a espécie é conhecida popularmente, é utilizada na medicina popular, na forma de infusão de suas folhas, flores e cascas, para o tratamento de

enfermidades do trato respiratório como asma, bronquite, gripes e resfriados (GARLET; IRGANG, 2001; BUENO et al., 2005; ARAMBARRI et al., 2008) também estão relacionadas atividades antiespasmódica (SCHLEMPER; FREITAS; SCHLEMPER, 2011) e antineoplásica (MARTINS et al., 2015) e anti-inflamatória (PIORNEDO et al., 2011).

Segundo estudo realizado por Piornedo et al. (2011), o EEGP, as frações DCM e BT, e o composto isolado, 11; 13-dihydrozaluzanin C, possuem atividade anti-inflamatória em modelo pré-clínico. Resultados estes que também foram corroborados por David et al. (2014), os quais, além do potencial anti-inflamatório, foi confirmado que o EEGP não é mutagênico e nem teratogênico em fêmeas prenhes o que indica o seu uso seguro também para gestantes.

Essas propriedades terapêuticas anteriormente citadas são atribuídas à presença de diferentes compostos como as lactonas sesquiterpênicas, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, cumarinas, compostos fenólicos e óleo essencial (FARIAS et al., 1984; BOHLMANN et al., 1986; MOREIRA et al., 2000; CATALAN et al., 2003; STEFANELLO et al., 2006; PIORNEDO et al., 2011; SILVA et al., 2011; STRAPASSON et al., 2011).

2.2. Toxicologia da reprodução

De forma geral, refere-se à toxicologia da reprodução a análise, observação e compreensão dos agentes que possuam o potencial de interferência na capacidade de reprodução de organismos de ambos os sexos, que vão desde o desenvolvimento pré-natal, passando pelo pós-natal e chegando até a puberdade, além de englobar os processos teratogênicos (BARROS; SOLANGE, 1996).

A toxicologia da reprodução está intrinsicamente ligada à teratologia, sendo uma área ampla e complexa da toxicologia preditiva se considerado o grande número de fenômenos biológicos e duração dos processos. Os estudos relacionados a esta área buscam sobremaneira avaliar os problemas na organogênese, morfogênese, diferenciação celular, crescimento, prejuízos no desenvolvimento cognitivo, neurológico em geral e a morte do organismo. Além disso, estuda os mecanismos de ação das substâncias ou agentes, as patogenias surgidas e as consequências gerais dos agentes que levam aos problemas congênitos (ROGERS; KAVLOCK, 2001).

A reprodução é o fator crucial para assegurar a continuidade das espécies, possibilitando que a herança e a variabilidade genética seja passada às gerações seguintes (SNUSTAD, et AL., 2001). Porém, no que tange à toxicologia da reprodução, o ciclo reprodutivo não se limita apenas à concepção, gestação e o nascimento. Existem fatores muito antes da concepção que devem ser levados em consideração, como por exemplo, a formação dos gametas que pode sofrer alterações que, futuramente, pode interferir no desenvolvimento da prole (MOORE; PERSUAD, 1995). Além disso, não se encerra no momento do nascimento, já que todo o processo de desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual deve ser considerado (BERNARDI, 1996), porque somente após o desenvolvimento correto esses indivíduos estarão aptos a procriar.

As recomendações da *Food and Drug Administration (FDA)* e *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)* indicam que os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser divididos em três partes, sendo elas modificadas pelas normas da *Environmental Protection Agency (US. EPA)*. A primeira refere-se à toxicidade crônica que avalia a fertilidade, a formação dos gametas, o acasalamento e a fertilização. A segunda trata da toxicidade pré-natal que tem como objeto de estudo a teratogenicidade, ou seja, o desenvolvimento do organismo, em especial o período de organogênese quando os diferentes órgãos e sistemas são formados; e por último, a toxicidade peri e pós-natal que avalia o desenvolvimento pré- e pós-natal de progênes expostas durante a fase de desenvolvimento fetal e/ou lactação.

2.2.1. Desenvolvimento embrionário em camundongos

Os quimiotáticos são responsáveis pelo direcionamento do espermatozoide até o ovócito II, estes sinais são emitidos pelo próprio ovócito II e pelas células foliculares circundantes e tem papel crucial para que ocorra a fecundação. Após o contato do espermatozoide com a coroa radiata do ovócito II, o acrossoma do espermatozoide segrega enzimas, como a hialuronidase, que tem como função dispersar a células foliculares permitindo que o espermatozoide entre em contato com a zona pelúcia. Dessa forma os receptores na membrana do acrossoma identificam a glicoproteína ZP3 (AVELLA et al., 2013) e liberam enzimas, como as esterases, acrosina e neuraminidase, que degradam as

glicoproteínas da zona pelúcida permitindo que material genético adentre o gameta feminino (MOORE; PERSUAD, 1995).

Após ocorrer a entrada do espermatozoide na zona pelúcida, ocorre a liberação de grânulos corticais que promovem a reação zonal evitando assim a poliespermia. Além disso, a segunda divisão meiótica do ovócito II é completada formando um ovócito maduro e o segundo corpúsculo polar. Após esse processo ocorre a fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, formando o óvulo e o zigoto (MOORE; PERSUAD, 1995). Em seguida, a fecundação do ovócito II pelo espermatozoide dá início a complexas modificações, transformando uma única célula (zigoto), em um ser multicelular. Nessa premissa, o desenvolvimento embrionário se inicia e essas etapas ocorrem de forma semelhante em diversos mamíferos (MOORE; PERSUAD, 1995). Como o modelo experimental desse estudo envolve o uso de camundongos, o mesmo será utilizado para as descrições a seguir:

a) Pré-implantacional:

Nos camundongos esse período tem início a partir da ovocitação, seguido pela fecundação do ovócito II (WIMSATT, 1975). Com a formação do zigoto inicia-se o processo de clivagem até formar o primeiro conjunto de dezesseis células, denominado de mórula. A partir do estágio de mórula, a massa celular se torna mais compactada pela ativação de mecanismos celulares associados a microfilamentos e microtúbulos. Essa compactação promove a abertura da cavidade blastocística, tendo um papel muito importante para armazenar fluidos e prover a condução de substâncias para as células circundantes (BRINSTER, 1974). Após a cavitação aberta, a mórula se transforma em blastocisto (WIMSATT, 1975; MOORE; PERSUAD, 1995; PRATHER; FIRST, 1988).

A camada circundante do blastocisto é denominada de trofoblasto, esta camada dará origem aos tecidos extraembrionários. Já o embrioblasto, que é a massa celular mais interna do blastocisto, dará origem ao embrião. Em sequência ocorre a degeneração da camada glicoproteica da zona pelúcida, dando fim ao período pré-implantacional (AGOSTINI; 1993)

b) Implantacional:

Este período inicia-se aproximadamente no quinto dia gestacional em camundongos após a fecundação (BRINSTER, 1974). Diversos mecanismos complexos moleculares são ativados nas células do embrioblasto e do trofoblasto, fazendo com que, após o contato do blastocisto com o endométrio, ocorra a nidação na parede uterina da fêmea (JOHNSON et al.,

1984). Por sua vez, o conjunto celular interno começa a se diferenciar formando o próprio embrião por processos de gastrulação, formação da notocorda e, posteriormente, a neurulação (ALBERTS et al., 2004).

c) Organogênese:

De maneira geral, nos pequenos roedores o período de organogênese se inicia do sexto ao oitavo dia e termina por volta do décimo quinto dia após a fecundação. É neste período que ocorre formação dos órgãos e sistemas (CARVALHO, 2006). Para outros autores a organogênese inicia-se no quinto dia pós fecundação se o dia de detecção da rolha for considerado dia zero (DAVID et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Seguindo a respectiva ordem de formação em dias após o coito considera-se que no 8º dia se dá a diferenciação dos folhetos embrionários, formação do exoceloma, do primórdio do coração e da placa notocordal. No 9º-10º dia gestacional ocorre o aparecimento dos somitos. No 10,5º dia gestacional ocorre o fechamento da notocorda. No 10º-11º ocorre o fechamento do neuroporo anterior que é a evidência do segundo e do terceiro arcos branquiais. No 11º-12º dia de gestação se dará o desenvolvimento do cérebro primitivo dividido em telencéfalo e diencéfalo, e o fechamento do neuroporo (CARMO et al., 2004).

d) Fetogênese:

É a última etapa da gestação e nos camundongos ocorre entre o 17º e o 18º dia gestacional e entre o 19º e o 22º dia gestacional ocorrerá o nascimento do feto. Esse período compreende basicamente no amadurecimento de todas as estruturas formadas na organogênese e que se estende até o nascimento (CARMO et al., 2004).

2.2.2. Teratogênese

Segundo livros clássicos como o de Moore e Persaud (1995), um teratogênio é qualquer agente, que quando em contato com uma gestante ou uma fêmea prenhe, possui capacidade de produzir anomalias no desenvolvimento embrionário e/ou gerar malformações congênitas. Define-se como malformação congênita a anomalia funcional ou estrutural (morfológica) do desenvolvimento do feto presente no nascimento, sendo essas mudanças

permanentes, prejudiciais ao desenvolvimento e crescimento, ou mesmo incompatível com a sobrevivência do indivíduo (SANSEVERINO et al., 2001; HOROVITZ et al., 2005).

Os teratógenos podem ser de origem biológica, química ou física e, em geral, atuam de forma similar aos agentes mutagênicos, ou seja, provocando modificações no material genético, onde por sua vez podem promover modificações na biossíntese de enzimas, alterações da expressão gênica, no balanço osmótico, nos processos mitóticos, meióticos, de diferenciação e de morte celular programada; onde por sua vez gera-se modificações complexas do desenvolvimento embrionário (OPITZ, 2000; OLIVEIRA et al., 2009; KUPSCO; SCHLENK, 2015; SINGH et al., 2015). Destaca-se ainda que os eventos teratogênicos, bem como os mutagênicos, podem acontecer de forma espontânea derivados de processos endógenos, por exemplo (MARLEEN et al., 2010).

Schuler-Faccini et al. (2002) destacam que existem fatores cruciais entre o processo teratogênico e a atuação do teratógeno. Segundo o autor, essas ações estão diretamente ligadas ao estágio de desenvolvimento fetal que o organismo se encontra, da dose/resposta do teratógeno, genótipo materno-fetal, bem como o mecanismo patogênico de cada substância. Além disso, os agentes teratogênicos podem atuar nos quatro períodos gestacionais, trazendo problemas específicos relacionados a cada etapa. No primeiro e no segundo período, referentes à fertilização e implantação (períodos anteriormente referidos como pré-implantacional e implancional), eles podem provocar ações embrioletais, ou como, por exemplo, os efeitos dos contraceptivos emergenciais tornando a fecundação ou a continuação do desenvolvimento a partir do zigoto inviável (GEMZELL-DANIELSSON et al., 2014). No segundo período, momento da diferenciação de tecidos e formação dos órgãos (anteriormente referido como Organogênese), o teratógeno pode acarretar a interrupção do desenvolvimento dos tecidos e órgãos comprometendo o funcionamento de um órgão ou de todo o sistema (BALDASSO, 2002). E, por último, no crescimento celular e maturação (período anteriormente referido como fetogênese), podem ocorrer adulterações funcionais nos tecidos promovendo disfunções no sistema nervoso central, principalmente (RABELO-GAY et al., 1991).

Diante do exposto observa-se o quão necessário os estudos referentes à teratogênese são. De fato, eles são cruciais para identificar ou descartar as possíveis substâncias teratógenas em mamíferos (RODRIGUES et al., 2011). Além disso, os estudos de teratogênese experimental permitem ao pesquisador avaliar minuciosamente todos os períodos

de desenvolvimento fetal, avaliar a toxicidade materna, a segurança das concentrações e do tempo de exposição às substâncias (SANSEVERINO et al., 2001; MOORE; PERSUAD, 1995).

2.3. Mutagênese

Em cada ser vivo existem sequências específicas de nucleotídeos em seu DNA que confere a cada organismo suas próprias características. Não obstante, essa estrutura primordial da vida comumente está exposta aos mais variados fatores químicos, físicos, ambientais e biológicos que podem causar alterações em sua estrutura e composição química, denominadas mutações (RIBEIRO et al., 2003; KANG et al., 2013; TORRES-BUGARÍN et al., 2015).

As mutações tem papel crucial na evolução dos seres vivos. É através dessas modificações moleculares nas células que existe uma grande variabilidade e diversidade de organismos, nos mais diversos ambientes (SNIEGOWSKI et al., 2000). Na evolução, essas modificações gênicas são, em geral, benéficas e podem estar associadas a processos endógenos ou mesmo à exposição a diferentes fatores mutagênicos ambientais que os organismos estão sujeitos comumente (MARTIN, 1996). Por outro lado, desordens genéticas nessas mesmas células também podem apresentar efeitos adversos como síndromes, fertilidade reduzida, malformações, abortos (RABELO-GAY et al., 1991) e câncer (EGGER et al., 2004).

Quando as alterações genômicas ocorrem em células somáticas, provocam uma etapa crítica para o início do processo de carcinogênese, haja vista que o acúmulo de mutações randômicas no DNA pode causar instabilidade genética e, por consequência, erros na expressão de proteínas importantes para o funcionamento celular (KANG et al., 2013; TORRES-BUGARÍN et al., 2015). Segundo Ribeiro et al. (2003), os processos que estão envolvidos na mutagênese estão intrinsicamente ligados aos carcinogênicos, sendo basicamente os mesmos processos para a promoção da carcinogênese.

As mutações podem ser divididas em gênicas e cromossômicas. Sendo as gênicas aquelas que ocorrem pela substituição, adição ou deleção de nucleotídeos e as cromossômicas, são subdivididas em euploidias e aneuploidias, ou seja, envolvendo cromossomos inteiros ou apenas partes dele, respectivamente (MATEUCA et al., 2006).

Além das mutações gênicas anteriormente referidas, os agentes mutagênicos podem gerar diversos tipos de danos no material genético, como por exemplo, sítios alcali-lábeis, aductos de DNA e quebras de fitas duplas e simples.

2.3.1. Micronúcleo

Os micronúcleos em sangue periférico são estruturas de característica arredondadas, com aproximadamente 1/20 a 1/5 do tamanho do eritrócito (RABELO-GAY et al., 1991). Sua formação advém de fragmentos cromossômicos (danos clastogênicos) e/ou até mesmo cromossomos inteiros (danos aneugênicos) que foram perdidos durante o processo de divisão celular, mais especificamente na anáfase durante a migração das cromátides para os polos da célula (TORRES-BUGARÍN et al., 2015).

A quantificação dessas estruturas nos eritrócitos é de fundamental importância para analisar o nível de danos mutagênicos que os organismos possuem. Um dos ensaios mais utilizados, que tem resultados precisos e é amplamente reconhecido pela comunidade científica para análise desses eventos é o ensaio de micronúcleo (MN). Esta técnica possibilita quantificar os danos cromossômicos e as falhas existentes nas fibras dos fusos de células de organismos expostos aos mais variados tipos de agentes físicos, químicos e biológicos (OLIVEIRA et al., 2009; BARROS et al., 2013; TWEATS et al., 2015). Além disso, ele também é utilizado no biomonitoramento para quantificar a frequência de micronúcleos em populações humanas (FENECH et al., 1999).

Devido à sua grande confiabilidade, a técnica tem colaborado para a análise não só de biomarcadores importantes *in vivo* e *in vitro* de danos genéticos, mas também de marcadores precoces relevantes nos processos de carcinogênese (BONASSI et al., 2006). Além disso eles são reconhecidos por agências internacionais como um dos testes necessários para garantir a segurança e a liberação de novos fármacos (HAYASHI et al., 1994; CHOY, 2001).

Nos mamíferos, os eritroblastos se transformam em eritrócitos, a partir do momento que ocorre a expulsão do seu núcleo. Dessa forma, qualquer resíduo genético que permanecer no citoplasma será reconhecido pelo ensaio MN de sangue periférico. Para uma análise correta em humanos é importante que o ensaio seja realizado 10 horas após a exposição, pois todo o processo de expulsão do material genético dos

eritroblastos tem uma duração de 8 a 12 horas (RABELO-GAY et al., 1991). Já nos pequenos roedores esse tempo entre o tratamento e o aparecimento do micronúcleo é reduzido, ficando em torno de 5 horas (MACGREGOR et al., 1987). No entanto, muitos pesquisadores fazem uma cinética da frequência de micronúcleo e para isso os mesmos usam coletas em 24, 48 e 72 horas, principalmente quando os controles positivos são agentes mutagênicos de ação indireta como é o caso da ciclofosfamida (LINDBERG et al., 2009; CARVALHO et al., 2015)

A maioria dos protocolos envolvendo ensaios de micronúcleo em sangue periférico utiliza o Alaranjado de Acridina como corante. Apesar dos riscos na manipulação por sua capacidade intercalante e, por consequência, mutagênicas, esse corante apresenta vantagens pelo seu baixo custo, bem como a capacidade de não corar contaminantes existentes nas amostras. Este colorante metacromático tem a capacidade de intercalar-se com o DNA (MOLONEY; KELLY; MACK, 2001) e ao ser irradiado por ondas ultravioletas, seus átomos são excitados emitindo sinais quimioluminescentes de coloração amarelo esverdeada que são captados pelo filtro óptico do microscópio. Destaca-se ainda que o Alaranjado de Acridina quando unido somente a moléculas de RNA emite outra frequência luminosa de tonalidade avermelhada. Essas características permitem ao analisador diferenciar facilmente, no caso do sangue, células com ou sem a presença de DNA em seu interior (HAYASHI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2009; KANG et al., 2013).

Neste ensaio a contagem de células geralmente baseia-se em 2.000 eritrócitos por animal, pois como o processo de transformações dos eritroblastos em eritrócitos é constante e não síncrono, a contagem feita com essa quantidade de células diminui possíveis erros amostrais (RABELO-GAY et al., 1991).

3. REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, E. Preimplantation development of the mammalian embryo. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.29, n.1, p. 15-25, 1993.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula**, 4 Ed. Artmed, 2004. 1584p.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993. 341 p.

ARAMBARRI, A. M. et al. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Misiones forest of the Paranaense Province. **Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires, v. 43, n. 1-2, p.31-60, fev. 2008.

ARCOLINE, T. Plantas Medicinais, saúde e cura pelas plantas. **Fitoterapia**. São Paulo: On line, n. 1, p. 34, 2003.

AVELLA, M. A.; XIONG, B.; DEAN, J. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 5, p. 279-289, 2013.

AUHAREK, S. A. et al. Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p.341-343, jun. 2013.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 1, p.185-194, mar. 2006.

BALDASSO, E. Dismorfologia: termos e conceitos. In: LEITE, J.C.L, COMUNELLO, L.N, GIULIANI, R. (org). **Tópicos em defeitos congênitos**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, p. 15-21, 2002.

BARROS, S. B. M.; SOLANGE, C. D. Avaliação da toxicidade. In: SEIZE, O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu editora LTDA, 1996. p.59-70.

BARROS, A. L. de et al. Genotoxic and Mutagenic Effects of Diflubenzuron, an Insect Growth Regulator, on Mice. **Journal Of Toxicology And Environmental Health., Part A**, v. 76, n. 17, p. 1003-1006, 2 set. 2013.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.

BOHLMANN, F. et al. Dimeric sesquiterpene lactones and kolavane derivatives from *Gochnatia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p.191-195, jan. 1986.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p.625-631, 18 ago. 2006.

BRINSTER, R. L. Embryo development. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 1003-1012, 1974.

BUENO, N. R. et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato. **Acta Botânica Brasilica**, v. 19, n. 1, p.39-44, mar. 2005.

CAPPON, G. D.; COOK, J. C.; HURTT, M. E. Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the

sensitive periods for heart development and midline closure. **Birth Defect Research part B**, v. 68, n. 1, p.47-56, fev. 2003.

CARMO, J. C.; PETER, V. M.; GUERRA, M. O. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos conforme a datação do início da prenhez. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 23, p. 5-16, 2004.

CARVALHO, C. R. **Biologia do Desenvolvimento Embrionário**. Minas Gerais: UFMG, 2006. p. 71.

CARVALHO, P. C. et al. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 715-721, nov. 2015.

CATALAN, C. A. N. et al. Coumarins and a kaurane from *Gochnatia polymorpha* ssp. *polymorpha* from Paraguay. **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 31, n. 4, p.417-422, abr. 2003.

CHOY, W. N. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. In: Choy WN (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1st edition. New York: MarcelDekker, 47-72, 2001.

DAVID, N. de et al. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154 (2): 370-9, 2014.

EGGER, Gerda et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p.457-463, 27 maio 2004.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Endocrine disruptor screening program - report to congress (2000) - DC: U.S.EPA, Washington, 2000

FARIAS, A. C. M. de; SILVA, A. J. R. da; TOMASSINI, Therezinha C. B.. Constituents of *Mochinea polymorpha*. **Journal Of Natural Products**, v. 47, n. 2, p.363-364, mar. 1984.

FARNSWORTH, N. R. Testando plantas para novos remédios. In: Wilson E. O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1997. p. 107-125

FENECH, M. et al. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 428, n. 1-2, p.271-283, jul. 1999.

FONSECA, C. A.; LEAL, J.; COSTA, S. S.; LEITÃO, A. C. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 321, n. 3, p. 165-173. 1994.

GARLET, T. M. B; IRGANG, B. E.. Medicinal plants used by rural women workers in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p.9-18, set. 2001.

GEMZELL-DANIELSSON, K.; BERGER, C.; LALITKUMAR, P. G.. Mechanisms of action of oral emergency contraception. **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 10, p.685-687, 12 ago. 2014.

GONÇALVES, C. A. et al. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, n. 3, p.843-850, dez. 2013a.

GONÇALVES, C. A. et al. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetics And Molecular Research**, v. 13, n. 2, p.4392-4405, 2014b.

HAYASHI, M. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, v. 245, n. 4, p.245-249, dez. 1990.

HAYASHI, M. et al. In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. **Mutation Research**, 312: 293-304, 1994.

HERSCH-MARTÍNEZ, P. Commercialization of Wild Medicinal Plants from Southwest Puebla, Mexico. **Economic Botany**, v.49, n.2, p.197-206, 1995.

HOROVITZ, D. D. G., et al. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p.1055-1064, ago. 2005.

JOHNSON, M. H.; McCONNEL, J.; VAN BLERKOM, J. Programed development in the mouse embryo. **Journal of embryology & experimental morphology**, v. 83, p. 197-231, 1984

KANG, S. H. et al. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. **Journal Of Cancer Prevention**, v. 18, n. 4, p.277-288, 30 dez. 2013.

KUPSCO, A.; SCHLENK, D. Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. **International Review Of Cell And Molecular Biology**, p.1-66, 2015.

LAPA, A. J.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R.O. & NOGUEIRA, T. C. M. L. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA and Petrovick PR (org) 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 247-262.

LINDBERG, H. K. et al. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 186, n. 3, p.166-173, maio 2009.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 1ª edição. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum Ltda. Vol 1. 1992. P. 352.

MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, n. 2, p.103-112, out. 1987.

MAGGI, M. E. et al. Laboratory Evaluation of Artemisia annua L. Extract and Artemisinin Activity against Epilachna paenulata and Spodoptera eridania. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p.1527-1536, jul. 2005.

MALPATHAK, N.; KEDARI, P. Screening of Chonemorpha fragrans bioactive extracts for cytotoxicity potential and inhibition studies of key enzymes involved in replication. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 46, p.297-302, 2016.

MARLEEN, M. H. J. et al. Teratogenic mechanisms of medical drugs. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 4, p.378-394, jan. 2010.

MARTIN, G. M. Somatic mutagenesis and antimutagenesis in aging research. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p.35-41, fev. 1996.

MARTÍNEZ-FRÍAS, M. L.; RODRÍGUEZ-PINILLA, E.; PRIETO, L.. Prenatal exposure to salicylates and gastroschisis: A case-control study. **Teratology**, v. 56, n. 4, p.241-243, out. 1997.

MARTINS, G. G. et al. Sesquiterpene lactones of Moquiniastrum polymorphum subsp. floccosum have antineoplastic effects in. **Chemico-biological Interactions**, v. 228, p.46-56, fev. 2015.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, set. 2010.

MARQUES, T. P. **Subsídios à Recuperação de Formações Florestais Ripárias da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná, a Partir do Uso Espécies Fontes de Produtos Florestais Não-madeiráveis**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007. 244p. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/14027/1/disserta%C3%A7%C3%A3o%20Themis%20Piazzetta%20Marques%20PDF.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2016.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p.1515-1531, nov. 2006.

MOLONEY, G. P.; KELLY, D. P.; MACK, P.. Synthesis of Acridine-based DNA Bis-intercalating Agents. **Molecules**, v. 6, n. 3, p.230-243, 28 fev. 2001.

MOORE, B.A.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **The developing human: clinically oriented embryology**. 7^a ed. Elsevier. USA, 2003.

MOREIRA, A. S. et al. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p.638-640, 2000.

MUKUNGU, N et al. Medicinal plants used for management of malaria among the Luhya community of Kakamega East sub-County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**. In press.

OFORI, Benjamin et al. Risk of congenital anomalies in pregnant users of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a nested case-control study. **Birth Defect Res B**, v. 77, n. 4, p. 268-279, 2006.

OLESEN, C. et al. Drug use in first pregnancy and lactation: a population-based survey among Danish women. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p.139-144, 13 abr. 1999.

OLIVEIRA, R. J. et al. Effects of the polysaccharide- β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p.164-173, abr. 2009.

OLIVEIRA, R. J. et al. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p.834-849, 2015.

OPITZ, John M.. Heterogeneity and minor anomalies. **American Journal of Medical Genetics**, v. 92, n. 5, p.373-375, 2000.

PRATHER, R. S.; FIRST, N. L. A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 2626-2635, 1988.

PINN, G.; PALLET, L. Herbal Medicine in pregnancy. Complement ther in nurs. Midwifery. v. 8, p. 77-80, 2002.

PIORNEDO, Rene dos Reis et al. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p.1077-1084, fev. 2011.

RABELO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO R. **Mutagênese, teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Sociedade Brasileira de Genética. 1991. 241 p.

RIBEIRO, L. R. et al (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. 356 p.

RODRIGUES, H.g. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

ROGERS, J. M.; KALVLOCK, R. J. **Developmental toxicology**. In: KLAASEN, C. D. (Ed.) Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 107-132.

SACILOTTO, Ana C.; VICHNEWSKI, Walter; HERZ, Werner. Ent-kaurene diterpenes from *Gochnatia polymorpha* var. *polymorpha*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 4, p. 659-661, fev. 1997.

SANCHO, G.; ROQUE, N.. **Gochnatia**. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5317>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

SANCHO, G.; FUNK, V.. A.; ROQUE, N. Moquiniastrium (Gochnatieae, Asteraceae): disentangling the paraphyletic *Gochnatia*. **Phytotaxa**, Auckland, v. 147, n. 1, p. 26-34, 20 nov. 2013.

SANSEVERINO, M. T. V.; SPRITZER, D. T.; SCHULER-FACCINI, L. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: Editora da Universidade. Ed. UFRGS, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SCHLEMPER, V.; FREITAS, S.A.; SCHLEMPER, S.R.M.. Antispasmodic Effects of Hydroalcoholic Extract from *Gochnatia polymorpha* sp. *floccosa* in the Guinea. **Research J. of Medicinal Plant**, v. 5, n. 3, p.288-294, 1 mar. 2011.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciência e Saúde Coletiva**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SILVA, L. B. et al. Triterpenes from the flowers of *Gochnatia polymorpha* subsp. *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p.556-559, jun. 2011.

SINGH, G. et al. Role of apoptosis in mediating diclofenac-induced teratogenesis: An in vitro approach. **Toxicology And Industrial Health**, v. 31, n. 7, p.614-623, 1 mar. 2015.

SNIEGOWSKI, P. D. et al. The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. **Bioessays**, v. 22, n. 12, p.1057-1066, 10 nov. 2000. Wiley-Blackwell.

SNUSTAD, D. PETER; SIMMONS, MICHAEL J. **Fundamentos de Genética**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 756 p.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (Less) Cabr. ssp. *floccosa* Cabr. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 999-1002, out. 2006.

STRAPASSON, R. L. B. et al. Bioactivity-guided Isolation of Cytotoxic Sesquiterpene Lactones of *Gochnatia polymorpha* ssp. *flocco*. **Phytotherapy Research.**, v. 26, n. 7, p. 1053-1056, 22 dez. 2011.

SUAREZ, V. R. et al. The effect of in utero exposure to indomethacin on the need for surgical closure of a patent ductus arteriosus in the neonate. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 187, n. 4, p. 886-888, out. 2002.

TAECHAKULWANIYA, N. et al. Apoptosis-inducing effects of jujube (Zǎo) seed extracts on human Jurkat leukemia T cells. **Chinese Medicine**, v. 11, n. 1, p.11-15, 1 abr. 2016.

TORRES-BUGARÍN, O. et al. Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience and Literature Review. **Biomed Research International**, v. 2015, p.1-11, 2015.

TWEATS, D. J. et al. Genotoxicity of flubendazole and its metabolites in vitro and the impact of a new formulation on in vivo aneugenicity. **Mutage**, v. 31, n. 3, p.309-321, 6 out. 2015.

WIMSATT, W. A. Some comparative aspects of implantation. **Biology Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 1-40. 1975.

WEIER, K. M.; BEAL, M. Complementary therapies as adjuncts in the treatment of postpartum depression. **Journal of Midwifery & Womens Health**. v. 49, n.2, p. 96- 104, 2004.

VEIGA J., V. F.; PINTO, A. C. e MACIEL, Maria Aparecida M.. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. v. 28, n.3, p. 519- 528, 2005.

VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.

VILAR, J. P. et al. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 197-202, 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**, Ed. Argos: Chapecó, 2001.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos teratogênicos e mutagênicos das frações diclorometano e butanólica de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* em fêmeas prenhes de camundongos Swiss.

4.2 Objetivos específicos

Investigar a atividade mutagênica das frações diclorometano e butanólica de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* por meio do ensaio de micronúcleo em sangue periférico;

Avaliar a toxicidade materna e o desempenho reprodutivo de fêmeas Swiss tratadas em diferentes períodos com as frações diclorometano e butanólica de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*;

Investigar o potencial teratogênico das frações diclorometano e butanólica de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* sobre os embriões/fetos expostos *in útero*, por meio de análises de malformações externas, viscerais e esqueléticas.

4. MANUSCRITO – Artigo publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology*

Journal of Ethnopharmacology 200 (2017) 205–208



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Effects of dichloromethane and butanol fractions of *Gochnatia polymorpha* subsp. *floccosa* in maternal reproductive outcome, embryo-fetal development and DNA integrity in mice



Lucas Roberto Pessatto^{a,b}, Sarah Alves Auharek^c, Caroline Amélia Gonçalves^{a,b}, Natan de David^{a,b}, Antônio Carlos Duenhas Monreal^b, Cândida Aparecida Leite Kassuya^d, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva^{a,e}, Maria Élide Alves Stefanello^f, Rodrigo Juliano Oliveira^{a,b,e,*}

^a Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Faculdade de Medicina do Mucuri (FAMMUC), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Teófilo Otoni, Minas Gerais, Brazil

^d Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^e Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina "Dr. Hélio Mandetta" (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^f Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Gochnatia polymorpha
Medicinal herbs
Teratogenesis
Mutagenesis

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* (Asteraceae) also known as “Cambará” is used as medicinal plant in Brazil to treat infections and inflammation. Previous studies showed that its ethanolic extract could be bioprospecting of a new anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. This work aimed to evaluate dichloromethane (DCM) and butanolic (BT) fractions from *G. polymorpha* on embryo-fetal development and DNA integrity in mice.

Materials and methods: Female mice were treated with 50 and 20 mg/kg of the DCM and BT fractions, respectively, during organogenesis and gestational period.

Results and conclusion: The present study shows that DCM and BT fractions from *G. polymorpha* possess mutagenic activity but are not teratogenic. Based on the fact that the reproductive indices are similar in control and treated animals, we may infer that the mutagenic effect was in somatic cell, at least in part, because the reabsorption number and reabsorption rates did not change in DCM and BT exposed groups.

1. Introduction

Gochnatia polymorpha subsp. *floccosa* (Asteraceae), popularly known as *Cambará*, is commonly found in Brazil, along with Paraguay, Uruguay, and Argentina (Sancho et al., 2013). The infusion of its leaves, flowers and bark is used in popular medicine to treat respiratory diseases such as asthma, bronchitis, cough and cold (Garlet and Irgang, 2001; Bueno et al., 2005; Arambarri et al., 2008). Previous ethnopharmacology studies addressing *G. polymorpha* have report anti-inflammatory activity of an ethanolic extract (GPPE), dichloromethane (DCM) and butanolic (BT) fractions. In addition, both DCM and BT fractions inhibited oedema formation and protein extravasation in-

duced by carrageenan. However, DCM fraction showed an inhibitory effect on leukocyte migration, an important supplementary activity which certainly contributes to its anti-inflammatory activity (Piornedo et al., 2011). Moreover, our research group described that *G. polymorpha* ethanolic extract is an effective anti-inflammatory drug that can be safely used during pregnancy (David et al., 2014).

These therapeutic properties of *G. polymorpha* may be associated with the presence of different compounds such as sesquiterpenes, sesquiterpene lactones, bisabolones, dimeric guaianolides, diterpenes, triterpenoids, flavonoids, coumarins and phenolic compounds (Farias et al., 1984; Stefanello et al., 2006; Strapasson et al., 2012, 2014; Martins et al., 2015).

* Correspondence to: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, S/N. Campo Grande/MS, CEP: 79070-900, Brazil.

E-mail address: rodrigo.oliveira@ufms.br (R.J. Oliveira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.042>

Received 11 September 2016; Received in revised form 14 February 2017; Accepted 25 February 2017

Available online 27 February 2017

0378-8741/ © 2017 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Taken into account that we provided the first report in the scientific literature showing the use of *G. polymorpha* as an anti-inflammatory able to be used for pregnant female (David et al., 2014), in order to continue the process of bioprospection of a medication this study aimed to investigate the effect of the DCM and BT fractions from *G. polymorpha* on DNA, maternal reproductive outcome, and embryo-fetal development, in mice.

2. Material and methods

2.1. Collection and identification of plant material

The trunk bark from specimens of *G. polymorpha* subsp. *floccosa* (Cabrera) G. Sancho naturally occurring in Curitiba, PR, Brazil, were collected in May 2011. The plant was identified by Prof. Dr. Armando Carlos Cervi of the Department of Botany at the Federal University of Paraná (UFPR). A voucher specimen was deposited in the herbarium of the same institution (UPCB) under the number #30100.

2.2. Preparation of extracts, fractions and isolation of compounds

The extracts, fractions, and isolating compounds were prepared according to Pionero et al., 2011. Dried and powdered trunk bark (129 g) was extracted at room temperature with n-hexane and ethanol 95%, successively. The solvents were removed under vacuum, yielding the crude extracts in hexane (0.2%) and ethanol of *G. polymorpha* (EEGP, 1.8% or 2.322 g). EEGP was suspended in EtOH–H₂O (1:1) and partitioned with dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA) and 1-butanol (BT), successively. The organic layers were separated and the solvents evaporated to give the respective residues (DCM 46.5% or 1.07973 g; EA 11.8% or 0.2739 g; BT 25% or 0.2739 g).

2.3. Experimental procedure

The females Swiss mice were mated with males and the gestational day 0 (GD) was determined by the presence of the vaginal plug. The mated females were randomly assigned to 5 experimental groups (n=10/group).

The control group was treated with saline solution supplemented with DMSO (1%) in a proportion of 0.1 ml/10 g of body weight (bw) by gavage from the 1st to the 18th gestational day (GD). The experimental groups were treated with 50 and 20 mg/kg of the DCM and BT fractions, respectively, during two periods: (I) organogenesis (ORG), from the 5th to the 15th GD (groups DCM-ORG and BT-ORG); and (II) gestational (GES), from the 1st to the 18th GD (groups DCM-GES and BT-GES). At the 18th GD, the females were euthanized and subjected to laparotomy, hysterectomy, collection of biological samples, fetus processing, and calculation of reproductive indices and embryo-fetal development parameters (analysis of external, visceral, and skeletal malformations), performed according to Gonçalves et al. (2013). The micronucleus assay was performed to investigate DNA integrity as described by Hayashi et al. (1990) and Oliveira et al. (2009).

All procedures and protocols followed approved guidelines for the ethical treatment of animals, according to the Ethics Committee in Animals Experimentation from the Federal University of Mato Grosso do Sul under protocol # 401/2012.

2.4. Statistical analysis

Parametric (ANOVA/Tukey) and non-parametric (Kruskal-Wallis/Dunn) tests were used according to the distribution of the data. The analysis was performed using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Previous studies from our group demonstrated that *Gochnatia polymorpha* ethanol extract exhibit effective anti-inflammatory activity and does not interfere with reproductive performance or embryo-fetal development but (David et al., 2014). Furthermore, BT and DCM fractions from *G. polymorpha* possess anti-inflammatory-activity and probably the compound 11,13-dihydrozalanin C was responsible, at least in part, for this action (Piornedo et al., 2011). These facts lead us to investigate the potential effects of BT and DCM fractions on reproductive toxicity. Only the study of David et al. (2014) has been published to support the bioprospecting of a new anti-inflammatory phytotherapy from *G. polymorpha* for use during pregnancy. Our study extended and corroborated the study of David et al. (2014) showing the absence of reproductive toxicity of the BT and DCM fractions from *G. polymorpha* in mice.

Our results showed that treatment of mice with BT and DCM fractions from *G. polymorpha* did not interfere in maternal weight, except for the group DCM-GES, that presented a reduced ($p < 0.05$) initial, final and weight gain in comparison to the control group. However, it is a consequence of the weight difference in the beginning of the experiment (Table 1). Supporting the lack of toxicity to the BT and DCM fractions on the pregnant mice, only the liver weight was reduced in both groups treated with DCM fraction, but this difference was not observed for the relative weight (Table 1). Given the above-mentioned results and based on biometric data, it is suggested that treatment with fractions does not cause toxicity because no clinical manifestations (fur bristling, mucosal dryness, diarrhea, vomiting, and reduced water and food intake), behavioral changes, or excessive weight loss were observed. According to Raza et al. (2002) and Teo et al. (2002), reduction in body weight gain and food and water intake are simple and sensitive indices of toxicity after exposure to toxic substances.

In general, the effects of chemicals or drugs during gestation could be manifested as abortions, anomalies or retarded development (Sullivan, 1993). Moreover, administration of plants during pregnancy may result in fetal disorders (Lemonica and Alvarenga, 1994). The number of implants, number of resorptions, resorption rate, number of live fetuses, number of dead fetuses, post-implantation loss rate, and fetal viability were similar ($p > 0.05$) in all groups analyzed (Table 2). These data suggest that neither fraction alter reproductive performance.

The BT fraction caused an increase in fetal weight ($p < 0.05$) during organogenesis and gestational periods, in comparison to the control group. However, fetuses in all fractions exposed groups, even those that did not show significant differences in the fetal weight, were overweight for the age of pregnancy (Table 2) according to the evaluation proposed by David et al. (2014). Regarding the placental index, an increased ($p < 0.05$) in the DCM-ORG and BT-GES groups were observed in comparison to the control (Table 2). The findings may be explained because the number of fetuses in each litter was highly variable among different groups and these variations may not be related to toxicity but to the adaptations of the maternal organism that provide increased nutrition and oxygen supply to the offspring. According to Eriksson and Jansson (1984), the increased placental weight is an attempt to increase blood circulation, which consequently promotes greater oxygen and nutrient supply to the fetus.

The data on external, visceral, and skeletal malformations did not present variations from normality, since the malformations observed were mainly due to interruption of pregnancy on the 18th GD and not to the effect of the treatments, as described by Taylor (1986). Thus, our results show that the DCM and BT fractions are not teratogenic (Table 2).

The pregnant mice exposed to the BT and DCM fractions from *G. polymorpha* presented an increase ($p < 0.05$) in the frequency of micronuclei. This finding suggests mutagenic activity, which would

Table 1

Maternal weight, absolute weight and relative organ weight of pregnant mice.

Biometric parameters					
Maternal weight (g)					
Experimental Group	Initial weight	Final weight	Weight gain	Uterus weight	Net weight gain
Control	30.39 ± 0.49 ^{b,c}	46.30 ± 2.05 ^b	15.89 ± 1.68 ^b	13.94 ± 1.5 ^a	1.43 ± 2.59 ^a
DCM-ORG	27.92 ± 0.59 ^{a,b}	35.52 ± 3.36 ^{a,b}	8.54 ± 3.64 ^{a,b}	4.90 ± 4.90 ^a	2.79 ± 2.67 ^a
DCM-GES	26.55 ± 1.17 ^a	30.87 ± 2.88 ^a	3.93 ± 2.25 ^a	3.74 ± 2.44 ^a	0.57 ± 0.60 ^a
BT-ORG	29.84 ± 0.46 ^{b,c}	44.80 ± 3.03 ^b	16.2 ± 3.09 ^b	11.40 ± 1.97 ^a	4.79 ± 1.29 ^a
BT-GES	30.08 ± 0.6 ^{b,c}	46.78 ± 2.10 ^b	17.5 ± 1.79 ^b	14.61 ± 1.54 ^a	2.89 ± 0.85 ^a
Absolute organ weight (g)					
	Heart	Lung	Spleen	Kidneys	Liver
Control	0.15 ± 0.005 ^a	0.20 ± 0.009 ^a	0.10 ± 0.005 ^a	0.34 ± 0.015 ^a	2.07 ± 1.570 ^b
DCM-ORG	0.14 ± 0.007 ^a	0.17 ± 0.007 ^a	0.14 ± 0.017 ^a	0.27 ± 0.013 ^a	1.48 ± 0.125 ^a
DCM-GES	0.14 ± 0.005 ^a	0.17 ± 0.008 ^a	0.18 ± 0.047 ^a	0.26 ± 0.011 ^a	1.30 ± 0.099 ^a
BT-ORG	0.16 ± 0.011 ^a	0.19 ± 0.009 ^a	0.16 ± 0.010 ^a	0.51 ± 0.020 ^a	2.07 ± 0.099 ^b
BT-GES	0.17 ± 0.008 ^a	0.19 ± 0.014 ^a	0.14 ± 0.012 ^a	0.31 ± 0.012 ^a	1.99 ± 0.118 ^b
Relative organ weight (g)					
	Heart	Lung	Spleen	Kidneys	Liver
Control	0.003 ± 0.0002 ^a	0.004 ± 0.0002 ^{a,b}	0.002 ± 0.0001 ^a	0.007 ± 0.0003 ^{a,b}	0.045 ± 0.0018 ^a
DCM-ORG	0.005 ± 0.0004 ^a	0.005 ± 0.0005 ^a	0.004 ± 0.0003 ^a	0.008 ± 0.0006 ^{a,b,c}	0.043 ± 0.0026 ^a
DCM-GES	0.005 ± 0.0002 ^a	0.006 ± 0.0004 ^b	0.006 ± 0.0001 ^a	0.009 ± 0.0005 ^b	0.042 ± 0.0009 ^a
BT-ORG	0.003 ± 0.0002 ^a	0.004 ± 0.0004 ^{a,b}	0.004 ± 0.0005 ^a	0.006 ± 0.0010 ^a	0.048 ± 0.0033 ^a
BT-GES	0.004 ± 0.0002 ^a	0.004 ± 0.0003 ^a	0.003 ± 0.0004 ^a	0.007 ± 0.0004 ^a	0.043 ± 0.0023 ^a

DCM: Dichloromethane fraction. BT: Butanol fraction. ORG: Animals treated in the organogenesis period (5th to the 15th gestational day). GES: Animals treated in the gestational period (1st to the 18th gestational day). Different letters indicate statistically significant differences (¹ANOVA/Tukey; ²Kruskal-Wallis/Dunn; $p < 0.05$).

contraindicate the use of these fractions since the DNA damage may be related to cancer development (Lord and Ashworth, 2012). However, based on the fact that the reproductive indices are similar in control and treated animals, it could lead as to formulate a hypothesis that the mutagenic effect was in somatic cell, at least in part, because the reabsorption number and reabsorption rates did not change in DCM and BT exposed groups (Table 2). The sporadic frequency of micronuclei observed would not be associated with cancer development, as

organisms have efficient repair systems (Helleday et al., 2008). In addition, according to Oliveira et al. (2009), it is not necessary that somatic mutagenic damage (and prevention) be related to the damage of the (anti) mutagenic germ cells or the embryo/ fetal development.

4. Conclusion

This is the first study showing that preparations (DCM and BT

Table 2

Reproductive performance, embryo-fetal development and DNA damage.

Reproductive performance					
	Control	DCM-ORG	DCM-GES	BT-ORG	BT-GES
Analyzed fetuses (no.)	99	34	122	71	116
Implants ² (no.)	10.20 ± 1.53 ^a	11.33 ± 0.88 ^a	11.54 ± 0.76 ^a	8.75 ± 1.65 ^a	11.60 ± 0.48 ^a
Resorption ² (no.)	0.30 ± 0.21 ^a	0 ^a	0.33 ± 0.14 ^a	0.30 ± 0.15 ^a	0.27 ± 0.14 ^a
Resorption rate ² (%)	2.43 ± 1.75 ^a	0 ^a	3.75 ± 1.18 ^a	2.68 ± 1.40 ^a	2.21 ± 1.14 ^a
Live fetuses ² (no.)	9.90 ± 1.11 ^a	11.33 ± 0.88 ^a	10.16 ± 1.19 ^a	8.50 ± 1.57 ^a	11.3 ± 0.45 ^a
Dead fetuses ¹ (no.)	0.00 ± 0.00 ^a	0 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
Post-implantation loss rate ² (%)	1.62 ± 1.06 ^a	0 ^a	4.34 ± 2.04 ^a	2.68 ± 1.40 ^a	2.21 ± 1.14 ^a
Fetal viability ² (%)	97.56 ± 1.76 ^a	100 ^a	95.26 ± 2.20 ^a	96.64 ± 1.69 ^a	96.52 ± 1.64 ^a
Embryo-fetal development					
Fetal weight ¹ (g)	1.10 ± 0.01 ^a	1.12 ± 0.01 ^a	1.17 ± 0.03 ^{a,b}	1.31 ± 0.01 ^c	1.22 ± 0.01 ^b
Gestational age (weight)	–	OFGA	OFGA	OFGA	OFGA
Fetal length ² (cm)	2.47 ± 0.02 ^c	2.22 ± 0.02 ^a	2.34 ± 0.03 ^{a,b}	2.48 ± 0.02 ^c	2.40 ± 0.01 ^{a,b}
Placental weight ² (g)	0.081 ± 0.001 ^a	0.095 ± 0.002 ^b	0.090 ± 0.003 ^{a,b}	0.118 ± 0.009 ^b	0.098 ± 0.001 ^b
Placental index ² (g)	0.074 ± 0.001 ^a	0.084 ± 0.002 ^c	0.079 ± 0.002 ^{a,b,c}	0.085 ± 0.008 ^{a,b,c}	0.080 ± 0.001 ^{b,c}
External malformation ¹ (no.)	0 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Visceral malformation ² (no.)	0 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^a	4 ^a
Skeletal malformation ¹ (no.)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
DNA damage					
Frequency of micronuclei ¹	0.4 ± 0.22 ^a	17.5 ± 4.13 ^{b,c}	14.6 ± 1.02 ^b	16.2 ± 1.60 ^{b,c}	23.4 ± 1.87 ^c

DCM: Dichloromethane fraction. BT: Butanol fraction. ORG: Animals treated in the organogenesis period (5th to the 15th gestational day). GEST: Animals treated in the gestational period (4st to the 18th gestational day). NDP: No data presented. OFGA: Fetuses were overweight for their gestational age. Different letters indicate statistically significant differences (¹ANOVA/Tukey; ²Kruskal-Wallis/Dunn; $p < 0.05$).

fractions) obtained from *G. polymorpha* possess mutagenic activity but are not teratogenic. Based on the fact that the reproductive indices are similar in control and treated animals, we suggest that the mutagenic effect was in somatic cell, since the reabsorption number and reabsorption rates did not change in DCM and BT exposed groups. These results do not exclude their use in the bioprospection of anti-inflammatory drugs and could lead to therapeutic applications in pregnancy.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was funded by FUNDECT/CNPq (Grant number: 023/200.702/2012 - 0207/12).

References

- Arambarri, M., Freire, S.E., Colares, M.N., Bayon, N.D., Novoa, M.C., Monti, C., Sten-Glein, S.A., 2008. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from misiones forest of the Paranaense Province (Argentina). Part2. Bol. Soc. Argent. Bot. 43, 31–36.
- Bueno, N.R., Castilho, R.O., Costa, R.B., Pott, A., Pott, V.J., Scheidt, G.N., Batista, M.S., 2005. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guaraní indigenous populations in the Caarapó reserve. Mato Acta Bot. Bras. 19, 39–44.
- David, N., Mauro, M.O., Gonçalves, C.A., Pesarini, J.R., Strapasson, R.L.B., Kassuya, C.A.L., Stefanello, M.E.A., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Oliveira, R.J., 2014. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. J. Ethnopharmacol. 133, 1077–1084.
- Eriksson, U.J., Jansson, L., 1984. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat. Pediatr. Res. 18, 735–738.
- Farias, A.C.M., DaSilva, J.R., Tomassini, T.C.B., 1984. Constituents of *Mochinea polymorpha*. J. Nat. Prod. 47, 363–364.
- Garlet, T.M.B., Irgang, B.E., 2001. Medicinal plants used by rural women workers in Cruz Alta, Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Plantas Med. 4, 9–18.
- Gonçalves, C.A., Siqueira, J.M., Carollo, C.A., Mauro, M.O., David, N., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Castro, A.H., Fernandes, L., Chagas, R.R., Auharek, S.A., Oliveira, R.J., 2013. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. J. Ethnopharmacol. 150, 843–850.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr, M., 1990. The micro-nucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat. Res. 245, 245–249.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., Sharma, R.A., 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat. Rev. Cancer 8, 192–204.
- Lemonica, I.P., Alvarenga, C.M., 1994. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC. and *Cajanus cajan* (L.) Millsp. in pregnant rats. J. Ethnopharmacol. 43, 39–44.
- Lord, C.J., Ashworth, A., 2012. The DNA damage response and cancer therapy. Nature 481, 287–294.
- Martins, G.G., Livero, F.A., Stolf, A.M., Kopruszinski, C.M., Cardoso, C.C., Beltrame, O.C., Queiroz-Telles, J.E., Strapasson, R.L., Stefanello, M.E., Oude-Elferink, R., Acco, A., 2015. Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. Chem. Biol. Interact. 25, 228–246.
- Oliveira, R.J., Salles, M.J.S., Silva, A.F., Kanno, T.Y.N., Lourenço, A.C.S., Freiria, G.A., Mariazi, H.J., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., 2009. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. Regul. Toxicol. Pharmacol. 53, 164–173.
- Piornedo, R.R., Souza, P., Stefanello, M.E.A., Strapasson, R.L.B., Zampronio, A.R., Kassuya, C.A.L., 2011. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorphassp. floccosa* trunk bark in mice. J. Ethnopharmacol. 133, 1077–1084.
- Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyeh, T.M., Al-Majed, A.A., 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. Sci. Pharmacol. 70, 135–145.
- Sancho, G., Funk, A.V., Roque, N., 2013. *Moquiniastrum* (Gochnatiaceae, Asteraceae): disentangling the paraphyletic *Gochnatia*. Phytotaxa 147, 26–34.
- Stefanello, M.E.A., Cervi, A.C., Júnior, W.A., Simionatto, E.D., 2006. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (less) Cabr. ssp. *floccosa* Cabr. Quim. Nova 29, 999–1002.
- Strapasson, R.L.B., Cervi, A.C., Carvalho, J.E., Ruiz, A.L.T.G., Salvador, M.J., Stefanello, M.E.A., 2012. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpene lactones of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. Phytother. Res. 26, 1053–1056.
- Strapasson, R.L.B., Rüdiger, A.L., Burrow, R.A., Barison, A., Stefanello, M.E., 2014. A new sesquiterpene lactone and other constituents of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* (Asteraceae). Nat. Prod. Commun. 9, 1541–1543.
- Sullivan, F.M., 1993. Impact of the environment on reproduction from conception to parturition. Environ. Health Perspect. 101, 13–18.
- Taylor, P., 1986. Practical Teratology. Academic Press, New York.
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Iorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. Toxicology 174, 183–196.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados, considera-se que as frações diclorometano e butanólica de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*:

- ✓ Não promovem toxicidade materna;
- ✓ Não alteram o desempenho reprodutivo das fêmeas prenhes *Swiss*;
- ✓ Não apresentam efeitos teratogênicos;
- ✓ São mutagênicas.

Os resultados apresentados nesta pesquisa não excluem a utilização destas frações na bioprospecção de medicamentos anti-inflamatórios. No entanto, para uso no período gestacional requerem atenção.

6. ANEXO – Certificado da comissão de ética de animais / CEUA



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais / CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 401/2012 do Pesquisador Rodrigo Juliano Oliveira, referente ao projeto de pesquisa “Avaliação dos efeitos do extrato, frações e compostos isolados de *Gochnatia polymorpha* em modelos de teratogênese, carcinogênese e inflamação *in vivo* e *in vitro*”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 19 de abril de 2012 .

Campo Grande, 19 de abril de 2012

Joice Stein
Coordenadora da CEUA

2ª via emitida em 19/02/2013

Joice Stein
Vide-coordenadora da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184