

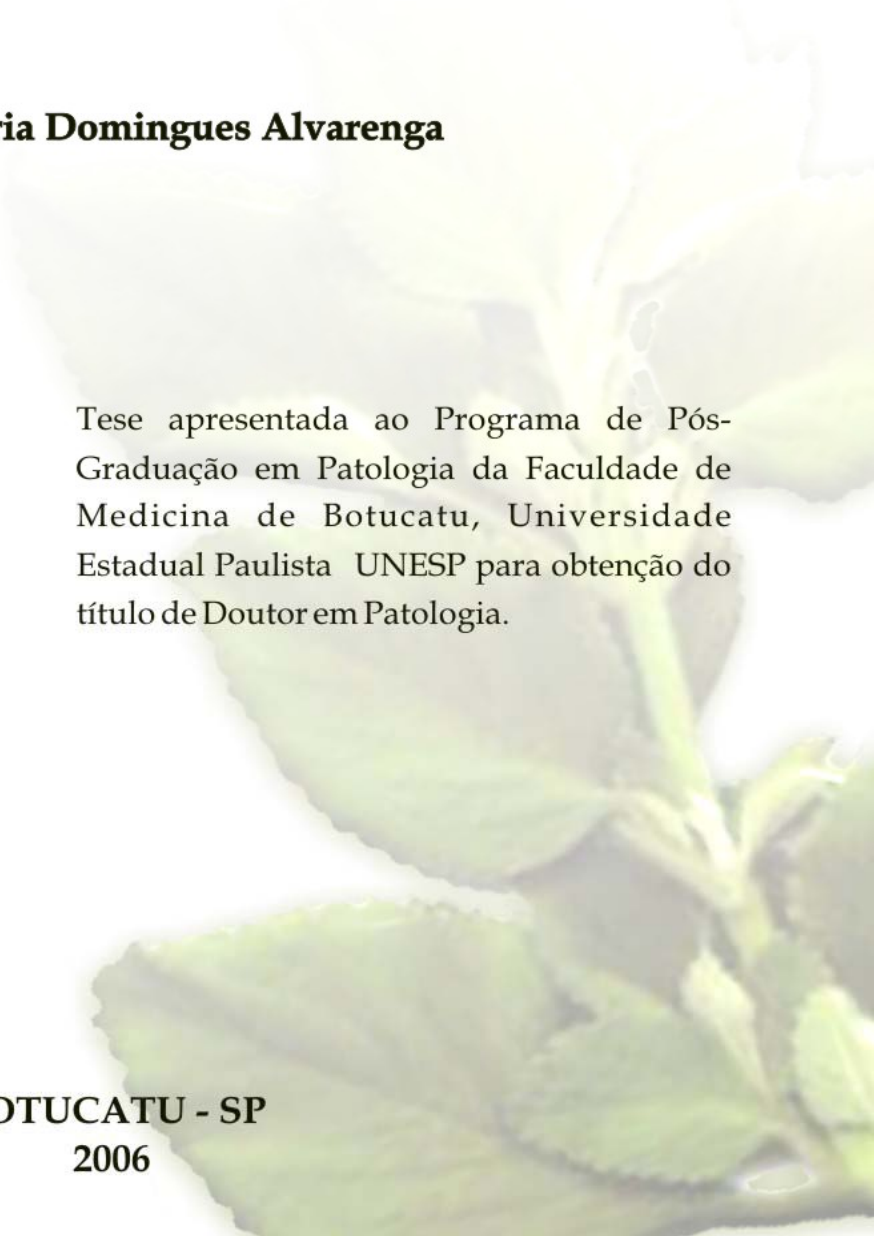


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**"AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO INTERCEPTIVA
E/OU EMBRIOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO DE
PLECTRANTHUS BARBATUS ANDR. (BOLDO-BRASILEIRO)
ADMINISTRADO A RATAS PRENHES NO
PERÍODO DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO"**

Cláudia Maria Domingues Alvarenga

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista UNESP para obtenção do título de Doutor em Patologia.



**BOTUCATU - SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Alvarenga, Cláudia Maria Domingues.

Avaliação dos mecanismos de ação interceptiva e/ou embriotóxica do extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* Andr. (boldo-brasileiro) administrado a ratas prenhes no período de pré-implantação / Cláudia Maria Domingues Alvarenga. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2006

Orientador: Ione Pellegatti Lemonica

Assunto CAPES: 40303004

1. Reprodução humana - Toxicologia - Estudos experimentais

CDD 616.65

Palavras-chave: Embriotoxicidade; Implantação embrionária; Plantas medicinais; *Plectranthus barbatus*; Toxicologia reprodutiva

*“Sonhos não são desejos superficiais.
Sonhos são projetos de vida.
Desejos não suportam o calor das dificuldades.
Sonhos resistem às mais altas temperaturas dos problemas.
Sem sonhos, a coragem se dissipa, a inventividade se esgota, o
sorriso vira um disfarce, a emoção envelhece.
Por isso . . .
Nunca Desista dos Seus Sonhos !”*

Augusto Cury



Dedicatória

*A Deus por me dar forças
para não desistir deste meu
sonho.*

*Ao meu marido Marcos por
ser meu companheiro de tudo e
de todas as horas.*

*Aos meus filhos, Rodrigo e
Guilherme, com quem eu tenho
aprendido as mais ricas lições de
vida.*

*Aos meus pais, Carlos e
Vera, pela presença constante
em minha vida.*



Agradecimento Especial

A minha orientadora, Profa. Dra. Done Pellegatti Lemonica, pelos seus ensinamentos, sempre de profundo conhecimento e rigor científico, e principalmente pela constante demonstração de confiança.

*“Sozinho talvez passamos chegar mais rápido.
Mas acompanhados podemos ir muito mais longe...”*



Agradecimientos

À Agência de Fomento CAPES e ao Toxican (Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – Depto. de Patologia, FMB/UNESP) pelo auxílio financeiro;

À Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e ao Departamento de Patologia que possibilitaram o cumprimento de mais uma etapa em minha formação;

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia pela acolhida;

Aos Profs. Drs. Daisy Maria Salvadori, Denise Fecchio e João Lauro V. Camargo pelo respeito profissional com que sempre me receberam;

Às Profas. Dras. Márcia Guimarães Silva e Ana Lúcia Barbisan, não somente pela importante colaboração no exame geral de qualificação, mas pelo inestimável carinho e atenção demonstrados durante esses anos;

Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno (Depto. de Imunologia, IBB/UNESP) pelo empréstimo do evaporador rotativo utilizado para obtenção do extrato deste experimento;

À Profa. Dra. Eunice Oba (Departamento de Reprodução – FMVZB/UNESP) por sua receptividade e dedicação na realização das dosagens hormonais;

Ao Prof. Dr. Viciany Fabris (Depto de Patologia, FMB/UNESP) e à Dra. Débora Cristina Damasceno (Depto. de Ginecologia e Obstetrícia, FMB/UNESP) pelo auxílio na análise das placentas;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani (Depto. de Bioestatística, IBB/UNESP) pela atenciosa assessoria na análise estatística dos dados;

Ao funcionário Clemente José Campos (Depto. de Botânica, IBB/UNESP) pela identificação da planta utilizada neste trabalho;

Aos funcionários do Biotério de Patologia, Glória e PE, pela amizade e grande auxílio na realização dos experimentos;

Ao Sr. José Carlos Georgete, supervisor técnico experimental do Depto. de Clínica Médica – FMB/UNESP, pelo consentimento na utilização do esteriomicroscópio necessária na análise esquelética e visceral dos fetos;

À Tânia, secretária da Pós-Graduação do Depto. de Patologia, pelos auxílios prestados;

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela disponibilidade e atenção que sempre demonstraram;

Aos funcionários da Biblioteca pela assessoria na revisão da literatura e correção das referências bibliográficas;

À minha amiga Maria Luíza Fascineli pelo auxílio espontâneo, apoio e companheirismo;

Aos colegas de Pós-Graduação pelo bom convívio.

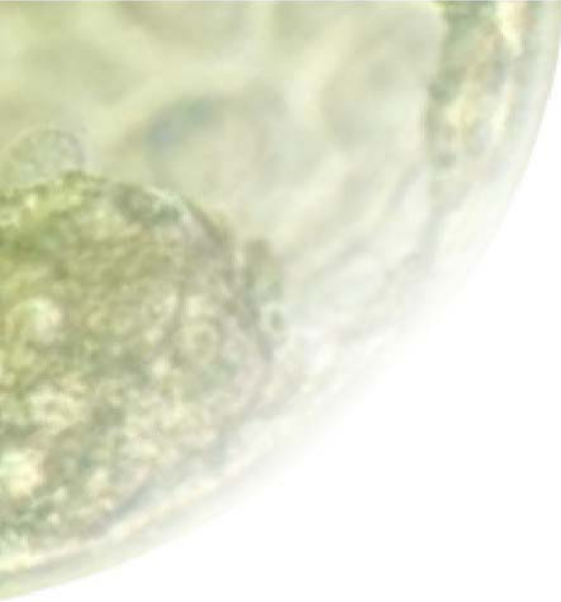
A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.



Sumário

Capítulo I	14
Introdução e Revisão da Literatura _____	15
Referências Bibliográficas	28
Capítulo II	35
Efeito tóxico do extrato aquoso de <i>Plectranthus barbatus</i> Andr. sobre embriões de ratos _____	35
Resumo	36
Abstract	37
1. Introdução	38
2. Material e Método	40
2.1. Extrato aquoso	40
2.2. Animais	40
2.3. Procedimento experimental	41
2.4. Avaliação Hormonal	41
2.5. Avaliação morfológica dos embriões antes da implantação	42
2.6. Análise do número de blastômeros	42
2.7. Análise estatística	43
3. Resultados	44
4. Discussão	48
Referências	54
Capítulo III	58
Efeito tóxico da exposição pré-natal ao <i>Plectranthus barbatus</i> Andr. sobre o desenvolvimento de embriões de ratos pós-implantados _____	58
Resumo	59
Abstract	60
1. Introduction	61
2. Material e Método	63
2.1. Extrato aquoso	63
2.2. Animais	63
2.3. Procedimento experimental	64
2.4. Avaliação fetal	64
2.5. Análise estatística	65
3. Resultados	66

3.1. Avaliação da toxicidade maternal	66
3.2. Avaliação do desempenho reprodutivo materno	70
3.3. Avaliação fetal	72
4. Discussão	74
Referências	80
Conclusão _____	85
Apêndice _____	86
Anexos _____	97



Capítulo I
Introdução e Revisão da Literatura



O conhecimento sobre a utilização de plantas com finalidade medicinal tem origem em épocas remotas. Acredita-se que essa utilização advenha da vasta variedade da flora mundial, estimada, hoje, em torno de meio milhão de espécies. O Brasil contribui com 120 mil espécies, das quais o saber popular selecionou cerca de 2 mil como medicinais (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002). Dessas, apenas 10% foram, até o momento, cientificamente investigadas do ponto de vista farmacológico.

Segundo Di Stasi (1996), 80% da população brasileira encontra nos produtos de origem natural, principalmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico. De fato, o alto custo dos medicamentos, o número insuficiente de profissionais na área de saúde em algumas regiões do país e a dificuldade de acesso de grande parcela da população à assistência médica, torna essa terapia alternativa muito difundida. Além disso, no Brasil a utilização de plantas para diversas finalidades é enriquecida pela tradição cultural indígena.

No entanto, apesar de seu uso, observa-se uma grande disparidade entre a quantidade e diversidade da flora medicinal e o número de pesquisas desenvolvidas nesta área. A carência de estudos e a falta de rigor científico levam a resultados muitas vezes conflitantes sobre um mesmo princípio ativo natural, podendo, dessa forma, acarretar no uso inadequado da planta. Por outro lado, o uso indiscriminado desse tipo de terapia pode resultar na incidência de efeitos tóxicos.

A busca de esclarecimentos adicionais sobre a toxicidade de plantas utilizadas com finalidade medicinal, bem como do desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, devem aliar o conhecimento popular, resgatando e preservando a cultura, com conhecimento científico rigoroso. Faz-se necessário, também, que as pesquisas sejam conduzidas seguindo protocolos de segurança nacionais e internacionais fornecendo informações adequadas em termos de eficácia, toxicologia e segurança farmacológica dos princípios ativos naturais estudados.

Algumas plantas têm sido utilizadas por diversas populações no intuito de alterar a reprodução, tanto com finalidade contraceptiva como abortiva (Farnsworth *et al*, 1975). Entenda-se por agentes contraceptivos aqueles que previnem a ovulação e/ou a fertilização, enquanto aqueles que atuam após a implantação embrionária, impedindo assim o desenvolvimento do concepto são denominados abortivos (Morris & Van Wagenen, 1973). O termo interceptivo refere-se a compostos que atuam após a fertilização do óvulo, mas impedem a implantação do embrião, promovendo, portanto, efeito anti-implantação.

Tendo em vista a vulnerabilidade do processo reprodutivo frente a substâncias químicas e a ampla utilização de plantas pela população no intuito de prevenir ou interromper gestações indesejadas, pesquisas com fitoterápicos que possam afetar a reprodução humana despertam grande interesse científico.

No entanto, alguns princípios ativos naturais utilizados com essa finalidade não têm seus efeitos confirmados em animais de laboratório (Damasceno *et al*, 2002). Este fato pode estar relacionado a diversos fatores, como diferença de sensibilidade entre as espécies testadas, dose, período de exposição, dentre outros.

Os compostos químicos contidos nos extratos de plantas podem comprometer a manutenção da gestação, atuando tanto sobre o organismo materno, alvo primário, como sobre o organismo embrionário, alvo secundário (Lemonica, 2001). Dependendo do período de gestação no qual os agentes entram em contato com o organismo materno, essa exposição pode resultar em diferentes respostas que variam desde um efeito anti-implantação, alterações funcionais ou morfológicas, retardo geral de desenvolvimento, incidência de malformações até letalidade.

Após a fecundação, três períodos gestacionais se sucedem, tendo cada qual características e sensibilidade diferentes aos agentes químicos externos.

Antes da implantação, as células embrionárias têm como característica a pluripotência na formação dos tecidos, assim sendo, o efeito observado irá depender do número de células atingidas pelo agente químico podendo ter como produto final embriofetalidade ou, devido a capacidade de reposição das mesmas, o desenvolvimento normal do conceito (Wilson, 1977). Apesar de nesse período não ocorrerem alterações que possam levar ao aparecimento de malformações, pode vir a ocorrer aumento no número de variações morfológicas nos recém-nascidos, comprometendo seu desenvolvimento pós-natal (Giavini *et al*, 1984, 1990).

Após a implantação, inicia-se o chamado período organogênico, fase mais suscetível à ação de agentes teratogênicos e único período considerado potencialmente teratogênico, pois exposições a agentes químicos podem resultar em importantes alterações na formação de órgãos ou tecidos embrionários.

O último período é o fetal, caracterizado pela diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e sistemas, além do crescimento ponderal do concepto. A exposição a agentes tóxicos nesse período da gestação pode resultar em alterações funcionais, retardo geral de desenvolvimento e alterações comportamentais nos recém-nascidos (Lemonica, 2003).

Uma das etapas mais importantes no estabelecimento e manutenção de uma gestação normal diz respeito à implantação do embrião, a qual ocorre ao final do 1º período gestacional. Dados epidemiológicos indicam que 50% de todas as perdas gestacionais ocorrem antes ou no momento da implantação do embrião (Wilcox *et al*, 1988), o que torna necessária uma avaliação mais detalhada a respeito dos mecanismos envolvidos nesse processo, principalmente frente à exposição a agentes químicos.

Os eventos básicos da implantação embrionária são bastante similares em várias espécies de mamíferos, possibilitando a utilização de modelos animais nesse tipo de estudo (Lee & DeMayo, 2004). Cronologicamente, o processo de implantação também varia muito pouco

entre as espécies: em ratos e camundongos, o blastocisto está pronto para se implantar em torno do 5º dia de prenhez (Phychoyos, 1986), enquanto que no homem, o desenvolvimento do blastocisto se completa ao 7º dia de gestação (Aplin, 2003).

O desenvolvimento adequado do embrião depende de sua íntima associação com os tecidos maternos, os quais proverão todas suas necessidades, o que acontece quando da implantação do blastocisto no endométrio. O êxito dessa associação envolve uma série integrada de eventos: preparo do endométrio, transporte e desenvolvimento dos embriões, além do suporte hormonal e da sinalização celular realizada por diversos fatores químicos.

Portanto, as possíveis falhas que possam ocorrer no processo de implantação embrionária, resultantes da exposição materna a agentes químicos tóxicos, podem estar associadas a uma ação indireta desses agentes sobre a secreção hormonal, preparação do endométrio uterino ou motilidade do oviduto, ou ainda a uma ação direta sobre o conceito promovendo alterações morfológicas e/ou inibição do crescimento embrionário (Cummings, 1990).

Com relação à participação hormonal no estabelecimento e manutenção da gestação, sabe-se que os hormônios desempenham papel fundamental (Aplin & Kimber, 2004). O preparo da decídua, bem como o transporte e desenvolvimento do embrião, ocorrem em resposta ao nível de estrogênio e progesterona circulantes, secretados, a princípio, pelo corpo

lúteo materno. Por sua vez, o embrião contribui para esse processo produzindo a gonadotrofina coriônica (hCG), hormônio que mantém o corpo lúteo funcionando até que a placenta seja capaz de assumir completamente a secreção de progesterona e estrogênio. Outros hormônios também são necessários no período gestacional, como gonadotrofinas hipofisárias e prostaglandinas ovarianas e uterinas. Portanto, substâncias capazes de interferir nas funções hormonais podem acarretar conseqüências adversas para a gestação.

Alguns princípios ativos naturais contidos em plantas medicinais têm sido relacionados com alterações em diferentes hormônios que participam do processo de gestação. A exposição de ratas ao extrato de *Mallotus philippinensis* (kamala), por exemplo, reduziu significativamente os níveis séricos de FSH, LH e estradiol, com conseqüente alteração no desenvolvimento folicular, ciclo estral, ovulação, formação de corpos lúteos, interferindo no estabelecimento e manutenção da prenhez (Thakur *et al*, 2005). Por sua vez, o extrato aquoso de *Inula viscosa* administrado a ratas prenhes do dia 1 ao 6 de gestação, diminuiu a taxa de implantação embrionária com redução nos níveis de progesterona (Al-Dissi *et al*, 2001).

Com a fecundação, desencadeia-se no endométrio uma série de modificações morfofuncionais. Essas modificações, conhecidas no seu conjunto como reação decidual, são essenciais para o sucesso da gestação. Sendo assim, a ausência da decídua implica obrigatoriamente na falência da implantação. Algumas plantas de uso popular, como o *Hibiscus rosa-sinensis*, apresentam efeitos sobre a implantação do blastocisto

associadas com a falta de receptividade endometrial, caracterizada por alterações bioquímicas e biofísicas da decídua (Nivsarkar *et al*, 2005).

Algumas vezes a interferência do extrato com a receptividade uterina está associada à sua atividade estrogênica, como foi constatado em estudo experimental com camundongos expostos ao extrato hidroalcoólico liofilizado de *Maytenus ilicifolia* (Montanari & Bevilacqua, 2002).

Além de interferir com os níveis hormonais e preparo do endométrio, os princípios ativos contidos nas plantas podem atuar sobre o oviduto. Uma vez que o tempo correto de permanência dos embriões nos ovidutos constitui-se em pré-requisito para desenvolvimento completo dos mesmos, alterações na motilidade desse órgão, atrasando ou adiantando a chegada dos embriões ao útero, podem estar associadas a fracassos no processo de implantação embrionária (Emmens, 1970). De fato, o extrato de *Ixora finlaysoniana* administrado a ratas no 1º dia de prenhez promoveu aceleração no transporte do embrião, impedindo o processo normal de implantação devido à imaturidade dos embriões, bem como a falta de receptividade adequada do endométrio para acolhê-los (Singh *et al*, 1993). O extrato também apresentou uma potente ação estrogênica, o que deve ter influenciado no transporte do conceito, uma vez que o número de receptores responsáveis pela contração e relaxamento da musculatura do oviduto é modulada por hormônios (Melo, 1994). Efeito semelhante foi observado em camundongos expostos ao extrato aquoso de *Ruta graveolens*, cuja ingestão também resultou em interferência no transporte

dos embriões (Gutierrez-Pajares *et al*, 2003).

Outro aspecto a ser avaliado na exposição química durante o período de pré-implantação é a ação direta de agentes tóxicos sobre o concepto, alterando sua morfologia e/ou número de blastômeros.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), planta largamente utilizada quer em culinária ou com fins terapêuticos, quando administrado como extrato aquoso a ratas prenhes do 1º ao 4º dia de gestação na dose de 52 mg/kg/dia, aumentou o número de blastocistos anômalos coletados na luz uterina, evidenciando um efeito embriotóxico (Damasceno & Lemonica, 1999). Da mesma forma, a exposição de camundongos a *Ruta graveolens* acarretou elevada proporção de embriões anômalos associada com redução no número de blastômeros (Gutierrez-Pajares *et al*, 2003).

Efeitos mais severos, como embriofetalidade e teratogenicidade, foram observados por Nath *et al* (1997) na prole de ratas tratadas com extrato das sementes de *Gossypium herbaceum*, porém, nesse caso, o tratamento foi realizado durante período mais prolongado e sensível (1º ao 10º dias da prenhez).

Entre as plantas amplamente utilizadas com finalidade medicinal pela população podemos citar o ***Plectranthus barbatus*** Andrews (*Coleus barbatus* B.), planta da família Lamiaceae (Teske & Trentini, 1997), conhecida popularmente como boldo nacional ou brasileiro, falso-boldo, também chamado de malva-santa no Nordeste, de tapete de Oxalá na Bahia e de Boldo do reino e sete dores em outras regiões (Costa *et al*, 1992).

O gênero *Plectranthus* consta de cerca de 300 espécies de arbustos e subarbustos perenes, sendo nativa principalmente nas regiões temperadas e tropicais da África, Ásia e Austrália. Várias espécies desse gênero têm fins culinários por crescerem facilmente, e serem propagadas em recintos fechados nas regiões temperadas e frias (Corrêa *et al*, 1991).

O boldo brasileiro é um subarbusto perene, de 60-80 cm de altura, com ramos decumbentes e retos, semi-suculentos e aromáticos. As folhas são opostas, ovado-oblongas, grossas, de até 12 cm de comprimento por 8 cm de largura, de margem serrada, pilosas em ambas as faces, curto-pecioladas. Suas flores são hermafroditas, pentâmeras, fortemente zigomorfas, azulvioláceas ou lavanda, agrupadas em longas inflorescências eretas, do tipo racemo. Pode ser encontrado em todo Brasil, não se desenvolvendo bem em locais muito sombreados (Corrêa *et al*, 1991).

No Brasil, o falso-boldo é largamente utilizado no tratamento de distúrbios hepáticos e estomacais (Guarim, 1987; Ribeiro & Motter, 1992; Panizza, 1997; Moreira, 1996). O chá obtido de suas folhas é tônico, amargo, e utilizado como diurético, e quando tomado antes das refeições ajuda na digestão. Um dos componentes ativos mais importantes do *P. barbatus* é o forskolin (Dubey *et al*, 1981), alcalóide associado à estimulação da adenil ciclase (Seamon *et al*, 1981). Cabe ressaltar que não deve-se confundir o boldo nacional, cujo princípio ativo é o Forskolín, com o Boldo do Chile (*Peumus boldus*) também utilizado na medicina alternativa e cujo princípio ativo é a boldina (Korbes, 1995).

Vários compostos de importância medicinal vêm sendo identificados qualitativamente em plantas do gênero *Plectranthus*. De fato, testes histoquímicos, corroborados por testes fitoquímicos, identificaram substâncias que confirmam a utilização terapêutica do *P. barbatus* na fitoterapia popular (Mauro *et al*, 2002). Nesses testes, realizados utilizando material fresco de caule, folha e raiz dessa espécie, foram detectados presença intensa de alcalóides, saponinas, glicosídeos cardioativos, além de óleos essenciais, em pequenas quantidades.

Embora o extrato seja empregado popularmente visando aumentar a produção e eliminação de sais biliares, não existe, até o momento, confirmação científica dessa propriedade medicinal.

Por outro lado, atividade antidispéptica e proteção contra úlcera gástrica foram observadas em animais tratados com extrato aquoso de caule e folhas do boldo, comprovando seu uso no tratamento de problemas estomacais (Fischman *et al*, 1991).

Outra atividade estudada, diz respeito ao efeito da planta sobre a musculatura lisa. Shah *et al* (1980) verificaram que a concentração de componentes químicos responsáveis por essa atividade da planta varia dependendo da parte estudada, sendo essa concentração menor nas partes aéreas. De fato, estudos experimentais realizados por Dubey *et al* (1981) utilizando o coleonol, diterpeno isolado previamente das raízes do boldo, demonstraram que esta substância exibe uma atividade espasmolítica não específica sobre a musculatura lisa do trato gastrointestinal de várias

espécies animais, bem como promove um relaxamento da musculatura uterina de gato “in vivo”. Além disso, Kasonia (1995) verificou que o extrato metanólico do boldo produziu forte efeito relaxante em preparações de músculo liso traqueal de cobaia, sugerindo que o uso popular para tratamento da asma seja justificado pela presença de um diterpeno com atividade broncodilatadora que foi isolado das raízes da planta.

Assim como outras substâncias químicas de uso terapêutico, os princípios ativos naturais também são utilizados de forma inadequada, sendo a mais freqüente a que visa à interrupção da gestação. O boldo brasileiro também vem sendo relatado na literatura científica como utilizado popularmente objetivando um efeito abortivo ou emenagogo (Farnsworth *et al*, 1975; Valdés *et al*, 1987). Estudo experimental, em ratas, observou que a exposição crônica ao boldo não resultou em alterações hematológicas ou anatomopatológicas, não interferindo também com a fertilidade e a capacidade reprodutiva desses animais (Silva *et al*, 1992). Por outro lado, durante a gestação, o extrato aquoso do boldo administrado a ratas antes da implantação embrionária, em doses 40 vezes maiores que as utilizadas terapêuticamente, diminuiu a implantação embrionária, aumentou a taxa de perda pré-implantação e aumentou o número de fetos com retardo de desenvolvimento ao nascimento (Almeida & Lemonica, 2000). No entanto, quando a exposição, a mesma dose, foi realizada após a implantação não foram observadas alterações embriofetais que pudessem ser atribuídas ao tratamento.

Frente a essas constatações experimentais, que justificam o uso popular da planta visando interromper a gestação, bem como a observação de atividade relaxante sobre musculatura lisa de diterpenos isolados dessa planta citadas anteriormente, foi aventada a hipótese de que o efeito estivesse associado a uma ação do extrato sobre a musculatura do oviduto, interferindo com sua motilidade e, conseqüentemente, com o transporte embrionário.

Há evidências que substâncias químicas comumente encontradas em extratos de plantas medicinais, como os alcalóides, podem alterar a taxa de implantação e o desenvolvimento embrionário pré e pós-implantação (Panter & James, 1995; Srivastava *et al*, 2001). Muitos desses alcalóides, observados em diferentes espécies de plantas, têm apresentado uma ampla variedade de atividades que devem interferir com a embriogênese, como inibição do crescimento celular *in vitro* (Trovato *et al*, 1996), atividade mutagênica (Paulini *et al*, 1991), atividade estrogênica (Chawla *et al*, 1988; James, 1999), entre outras.

Neste contexto, o objetivo dessa pesquisa foi estabelecer, experimentalmente, o mecanismo pelo qual o extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* atua no organismo materno e sobre o desenvolvimento do concepto, levando ao efeito anti-implantação observado anteriormente por Almeida & Lemonica (2000).

Com a finalidade de esclarecer essa possível interferência do boldo brasileiro no processo de implantação embrionária, foram testadas 3 hipóteses:

- ✓ efeito embriotóxico, promovendo alterações morfológicas no embrião que impossibilitariam sua implantação;
- ✓ distúrbio na motilidade do oviduto, alterando o transporte embrionário e
- ✓ alteração hormonal, modificando as condições ideais do organismo materno para o processo de implantação.

A avaliação do desenvolvimento e transporte embrionário durante o período de pré-implantação foi realizada através de método proposto por Giavini *et al* (1979), o qual permite a contagem e análise morfológica dos embriões, bem como classificação quanto o estágio de desenvolvimento e determinação do número de blastômeros por embrião.

Como alterações no processo de implantação podem estar relacionadas a alterações morfofuncionais no organismo embriofetal, foram avaliadas também, ao final da gestação, as repercussões do tratamento no desenvolvimento do conceito, seguindo protocolo proposto pelas agências normativas para estudo de toxicidade pré-natal ou do desenvolvimento (OECD, 2001).

Portanto, frente à importância do conhecimento das alterações reprodutivas promovidas por plantas medicinais necessário para a avaliação de riscos para saúde humana, pretendeu-se, no presente estudo, verificar os reais efeitos do boldo brasileiro sobre a gestação, especificamente no período de pré-implantação embrionária.

REFERÊNCIAS*

Al-Dissi NM, Salhab AS, Al-Hajj HA. Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 77:117-21.

Almeida FCG, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 73:53-60.

Aplin JD. Implantation. In: Simpson E, editor *Encyclopedia of Hormones*. San Diego:Academic Press; 2003. p.289-97.

Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004; 2(1):48.

Chawla AS, Krishnan TR, Jackson AH, Scalabrin DA. Alkaloidal constituents of *Erythrina variegata* bark. *Planta Med* 1988; 54: 526-8.

Costa MA, Andrade CLL, Vieira RF, Sampaio FC *Plantas & Saúde: guia introdutório à fitoterapia*. Brasília: Governo do Distrito Federal; 1992. p.53-5.

Corrêa J, Ming LC, Scheffer MC. *Cultivo das plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. Paraná: Emater; 1991. p.162.

Cummings AM. Toxicological mechanisms of implantation failure. *Fundam Appl Toxicol* 1990; 15: 571-9.

* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *J Pediatr* 1997; 73: 213-24.
National Library Of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

Damasceno DC, Lemonica IP. Embryotoxicity and anti-implantation effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. *Rev Bras Toxicol* 1999; 12: 47-54.

Damasceno DC, Volpato GT, Lemonica IP. A review of antifertility folkloric tested in laboratory animals. *Rev Bras PI Med* 2002; 5(1): 19-26.

Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP; 1996.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica. São Paulo: UNESP; 2002.

Dubey MP, Srimal RC, Nityanand S, Dhawan BN. Pharmacological studies on coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. *J Ethnopharmacol* 1981; 3: 1-13.

Emmens CW. Antifertility agents. *Annu Rev Pharmacol* 1970; 10: 237-54.

Farnsworth RN, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA.. Potencial value of plants as source of new antifertility agents. *J Pharm Sci* 1975; 64: 535-98.

Fischman LA, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ. The water extract of *Coleus barbatus* Benth decreases gastric secretion in rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 141-3.

Giavini E, Prati M, Vismara C. The effects of actinomycin D and chloramphenicol on the rat preimplantation embryo. *Experientia* 1979; 35: 1949-50.

Giavini E, Bonanomi L, Ornaghi F. Developmental toxicity during the preimplantation period: embryotoxicity and clastogenic effects of chlorambucil in the rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 1984; 4: 341-8.

Giavini E, Lemonica IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: Cyclophosphamide, Cis-Platinum, Adriamycin. *Teratog Carcinog Mutagen* 1990; 10: 417-26.

Guarim NG. Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso. Brasília: CNPq; 1987. p.58.

Gutiérrez-Pajares JL, Zúñiga L, Pino J. *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 667-72.

James LF. Teratological research at the USDA-ARS poisonous plant research laboratory. *J Nat Toxins* 1999; 8: 63-80.

Kasonia K. Screening préliminaire d'extraits de plantes utilisées dans les maladies respiratoires au Kivu (Zaire) sur tracheé isolée de cobaye. *Belg J Bot* 1995; 128:165-75.

Korbes IRCV. Plantas medicinais. Fco Beltrão: Ed. Grafit; 1995. p.119.

Lee YK & DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128: 679-95.

Lemonica IP. Embriofetotoxicidade. In: Oga S, editor. *Fundamentos de Toxicologia*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 91-9.

Lemonica IP. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: Sanseverino MTV, Sprintzer DT, Shüler-Faccini L, editors. *Manual de Teratogênese*. Porto Alegre: Ed Universidade/UFRGS; 2001. p.19-39.

Mauro C, Cardoso CMZ, Silva CP, Missima J, Ohnuki T, Rinaldi RB *et al.* Comparação fitoquímica e histoquímica de flasco boldo (*Plectranthus barbatus* (Benth) Andr.), boldo miúdo (*Plectranthus ornatus* Codd.) e malvariço (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. *Anais do V Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu*. Botucatu: UNESP; 2002. p.23.

Melo RCN. Inervação autonôma do útero de mamíferos. *Bol Cent Biol Reprod* 1994; 13: 37-48.

Montanari T, Beilacqua E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. *Contraception* 2002; 65(2):171-75.

Moreira F. *Plantas que curam: Cuide de sua saúde através da natureza*. 5.ed. São Paulo: Hemus; 1996. 256p.

Morris J.M., Van Wagenen G. Interception: The use of postovulatory estrogens to prevent implantation. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115: 101-6.

Nath D, Sethi N, Srivastava S, Jain AK, Onwughalu J. Teratogenic evaluation of an indigenous antifertility medicinal plant *Gossypium herbaceum* in rat. *Fitoterapia* 1997; 68: 137-9.

Nivsarkar M, Patel M, Padh H, Bapu C, Shrivastava N. Blastocyst implantation failure in mice due to “nonreceptive endometrium”: endometrial alterations by *Hibiscus rosa-sinensis* leaf extract. *Contraception* 2005; 71(3): 227-30.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD 414 Guideline for testing of chemicals: Prenatal developmental toxicity study. Paris: OECD, 2001.

Panizza S. Plantas que curam: Cheiro de Mato. São Paulo: Ibrasa; 1997. p.50-1.

Panter KE, James LF. Alkaloid toxicant and teratogens of plant origin. In: Gustine DL, Flores HE, editors. *Phytochemicals and health*. American Society of Plant Physiologists; 1995. p. 145-54.

Paulini H, Popp R, Schimmer O, Ratka O, Róder E. Isogravacridonchlorine: a potent and direct acting frameshift mutagen from the roots of *Ruta graveolens*. *Planta Med* 1991; 57: 59-61.

Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann NY Acad Sci* 1986; 476:36-9.

Ribeiro PGF, Motter AA. Plantas medicinais utilizadas e demandadas por funcionários do Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1992; Curitiba. Curitiba: UFPR; 1992. p.270.

Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 3363-7.

Shah V, Bhat SV, Bajwa BS, Dornawer H, de Souza NJ. The occurrence of forskolin in the Labiatae. Planta Med 1980; 39: 183-5.

Silva EA, Sheu H, Lima – Lardman HTR, Souccar C, Lapa AJ. Efeitos do tratamento crônico do extrato da *Coleus barbatus* Benth na fertilidade e na capacidade reprodutora de ratas. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1992, Curitiba. Curitiba: UFPR; 1992. p.58.

Singh MM, Chowdhury SR, Kulshreshtha DK, Kamboj VP. Antigestagenic activity of *Ixora finlaysoniana* in rat. Contraception 1993; 48: 178-91.

Srivastava S, Singh MM, Kulshreshtha DK. A new alkaloid and other anti-implantation principles from *Tabernaemontana heyneana*. Planta Med 2001; 67: 577-9.

Teske M, Trentini MM. Herbarium. Compêndio de Fitoterapia. 3.ed. Ed. Herbarium; 1997. p.60-2.

Thakur SC, Thakur SS, Chaube SK, Singh SP. An ethereal extract of Kamala (*Mallotus philippinensis* (Moll.Arg) Lam.) seed induce adverse effects on reproductive parameters of female rats. Reprod Toxicol 2005; 20:149-56.

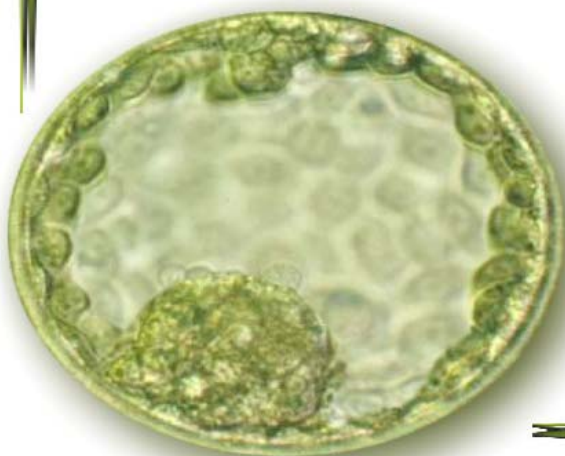
Trovato A, Monforte MT, Rossitto A, Forestieri AM. In vitro cytotoxic effect of some medicinal plants containing flavonoids. *Boll Chim Farm* 1996; 135: 263-6.

Valdés LJ, Mislankar SG, Paul AG. *Coleus barbatus* (*C. forskohlii*) (Lamiaceae) and the potential new drug forskolin (coleonol). *Econ Bot* 1987; 41: 474-83.

Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Conner JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, *et al.* Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; 319: 189-94.

Wilson JG. Current Status of Teratology. In: Wilson JG, Fraser FC, editors. *Handbook of Teratology*. New York: Plenum Press; 1977. p.47-74.

Capítulo II
Efeito tóxico do extrato aquoso de
Plectranthus barbatus Andr.
sobre embriões de ratos



* Padronizado de acordo com as normas para
publicação na Revista *Reproductive Toxicology*

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar, experimentalmente, o possível mecanismo pelo qual o extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* (boldo-brasileiro), planta utilizada popularmente como abortiva, atua sobre o organismo materno ou sobre o desenvolvimento do conceito durante o período de pré-implantação, correlacionando sua ingestão com possíveis alterações no transporte e desenvolvimento embrionário ou com alterações hormonais maternas.

Com esta finalidade, ratas *Wistar* prenhes receberam, por gavagem, doses crescentes (400, 800 e 1600 mg/kg/dia) do extrato aquoso de *P. barbatus* ou água destilada (grupo controle) do 0 ao 4º dia de prenhez, quando foram realizadas as avaliações de parâmetros maternos e embrionários.

A exposição das ratas prenhes ao boldo, no início da gestação, não alterou os níveis plasmáticos maternos de progesterona. O número total de embriões coletados, bem como de blastocistos maduros, também foi semelhante entre os grupos, sugerindo que não deva ter ocorrido retenção dos embriões nos ovidutos. Entretanto, a ingestão do boldo resultou em aumento significativo dose-dependente na porcentagem de embriões anômalos e de ninhadas com embriões anômalos. Esse efeito não foi associado à alteração no número médio de blastômeros por embrião, o qual não diferiu nos 4 grupos experimentais.

Conclui-se, portanto, que o extrato aquoso do boldo apresenta efeito embriotóxico direto, evidenciado por alterações morfológicas antes da implantação embrionária.

Palavras-Chave: *Plectranthus barbatus*, Boldo-Brasileiro, Ratas, Embriotoxicidade, Pré-implantação

ABSTRACT

The present study was conducted to determine the possible mechanism by which the aqueous extract of *Plectranthus barbatus* (brazilian-boldo), a plant used popularly as abortive agent, can lead to early loss of pregnancy, correlating this possible effect with morphological alterations in the embryo, oviductal motility dysfunctions or maternal hormonal level modifications. Pregnant *Wistar* rats were treated with increasing doses (400, 800 and 1600 mg/kg per day) of an aqueous extract of *P. barbatus* or water (control), orally on days 0-4 of pregnancy. Before implantation, embryos were flushed from uterine horns to examine their developmental stage, morphology and cell number. Maternal plasmatic progesterone level was measured and no significant differences were observed between groups. The total number of embryos present in the uterus on day 4 p.c. (post-coitum) was similar, suggesting that the treatment did not cause embryo retention in the oviduct. However, ingestion of brazilian-boldo resulted in a significant increased proportion of dams with abnormal embryos and number of abnormal embryos. These findings demonstrate that oral administration of *P. barbatus* extract interferes with normal morphological embryo development.

Keywords: *Plectranthus barbatus*, Brazilian-Boldo, Rats, Embryotoxicity, Preimplantation

1. INTRODUÇÃO

O uso de princípios ativos naturais, como terapia alternativa, é muito difundido no Brasil [1]. Apesar da ampla utilização de fitoterápicos pela população, poucos têm suas propriedades medicinais comprovados cientificamente [2].

Assim como outras substâncias químicas de uso terapêutico, os princípios ativos naturais também são utilizados de forma inadequada, sendo uma delas a que visa à interrupção da gestação. No entanto, alguns princípios ativos naturais utilizados com essa finalidade não têm seus efeitos confirmados em animais de laboratório [3].

O *Plectranthus barbatus* Andrews, conhecido popularmente como boldo-brasileiro, é uma planta à qual são atribuídos diversos efeitos terapêuticos, principalmente os relacionados a distúrbios gastrointestinais e hepáticos [4,5]. Essa planta medicinal também vem sendo relatada na literatura científica como utilizada popularmente objetivando efeito abortivo ou emenagogo [6,7].

Em estudo realizado em ratas, foi observado que a exposição crônica ao boldo não interfere com a fertilidade e a capacidade reprodutiva desses animais [8]. Por outro lado, o extrato aquoso do boldo administrado a ratas, em doses 40 vezes maiores que as utilizadas terapeuticamente, durante a gestação e antes da implantação embrionária, diminuiu a implantação dos embriões, aumentou a taxa de perda pré-implantação e aumentou o número de fetos com retardo de desenvolvimento

ao nascimento [9]. A exposição, à mesma dose, quando realizada após a implantação embrionária não resultou em alterações embriofetais que pudessem ser atribuídas ao tratamento.

Frente a essas evidências, o objetivo desse estudo foi estabelecer, experimentalmente, o possível mecanismo pelo qual o extrato aquoso das folhas de *P. barbatus* atua no início da gestação e que justificaria seu uso popular.

Para avaliar seus efeitos sobre o organismo de ratas prenhes ou sobre o desenvolvimento do embrião antes de sua implantação no útero materno, foram testadas 3 hipóteses:

- ✓ efeito embriotóxico, promovendo alterações morfológicas no embrião que impossibilitariam sua implantação;
 - ✓ alteração na motilidade do oviduto, interferindo com o transporte embrionário e
 - ✓ alteração de níveis hormonais maternos, impedindo o desenvolvimento normal da gestação.
-

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Extrato aquoso

O *P. barbatus* foi coletado na região de Rubião Júnior, Botucatu (SP/Brasil) e identificado no Departamento de Botânica do IBB, UNESP, sendo um espécime da planta depositado (nº 25.085) no Herbário da Universidade.

O princípio ativo foi extraído das folhas frescas através de mistura etanol/água 70% durante 48 horas. A mistura foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo para eliminação do álcool e obtenção de um extrato aquoso concentrado. Alíquotas de 0.2 ml do extrato da planta foram utilizadas na determinação do peso seco do extrato, que variou de 50 a 100 mg/ml.

2.2. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas *Wistar* com idades entre 8 e 12 semanas, ambos adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia – FM, em sala com temperatura controlada e com ciclo de claro/escuro de 12/12 hs durante os períodos de aclimação (aproximadamente 10 dias) e experimental. Água e ração foram oferecidas “*ad libitum*”.

2.3. Procedimento experimental

Para o acasalamento, as ratas foram colocadas com macho comprovadamente fértil. O estro com a presença de espermatozóides observados no exame microscópico dos esfregaços vaginais foram considerados como indicativos do dia 0 da gestação.

As ratas prenhes foram distribuídas, aleatoriamente, em 4 grupos experimentais com 12 animais cada e foram tratadas do 0 ao 4º dias de gestação com água destilada (grupo controle) ou com o extrato do boldo nas doses de 400, 800 ou 1600 mg/kg/dia (grupos experimentais).

A ingestão de ração e o ganho de peso das ratas prenhes foram observados com a finalidade de verificar uma possível toxicidade do extrato nas doses administradas.

As avaliações de parâmetros maternos e embrionários foram realizadas no 4º dia de gestação, quando as fêmeas prenhes foram sacrificadas.

2.4. Avaliação Hormonal

Durante a laparotomia foi realizada punção cardíaca e o sangue coletado centrifugado (1800 rpm / 8 min) para estoque do plasma em freezer e posterior dosagem de progesterona.

2.5. Avaliação morfológica dos embriões antes da implantação

Após a coleta sangüínea, foram retirados os cornos uterinos e os ovários para contagem dos corpos lúteos.

Os cornos uterinos foram, então, seccionados nas 2 extremidades e perfundidos com 1 ml de solução fisiológica 0.9%. Os embriões coletados foram observados em microscópio com contraste de fase quanto à sua morfologia e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em mórula, blastocisto inicial ou blastocisto maduro. As alterações morfológicas foram definidas quanto ao tamanho e forma das células, além da compactação e integridade das mesmas.

2.6. Análise do número de blastômeros

Posteriormente, os embriões foram individualmente processados pelo método de Tarkowsky [10] para contagem do número de blastômeros. Após permanecerem em solução de citrato de sódio 0.8% por 15 minutos, os embriões foram transferidos para lâminas histológicas e fixados com álcool etílico/ácido acético (3:1). Em seguida a secagem das lâminas, foi realizada a coloração utilizando-se corante Giemsa e tampão fosfato (pH=6.5) [11].

2.7. Análise estatística

Para a avaliação dos resultados foram utilizados os testes de Análise de Variância para o modelo com um fator, complementado com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey [12], o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis [12] e o teste de Goodman para comparações entre e dentro de populações binomiais [13].

Foram utilizadas letras minúsculas para indicar os resultados das comparações entre grupos fixadas a categoria de resposta.

Todas as conclusões estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS

Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes aos parâmetros indicativos de toxicidade e desempenho reprodutivos maternos avaliados durante o período de pré-implantação.

Na análise estatística do ganho de peso materno foi detectada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos que receberam as doses de 400 e 1600 mg/kg/dia do extrato do boldo (mediana \pm semi-amplitude total, Teste de Kruskal-Wallis). Nas fêmeas que receberam a dose de 800 mg/kg/dia, apesar de ter sido observada uma redução no ganho de peso, esse resultado não foi estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle.

Para avaliação da ingestão média de ração foi realizada Análise de Variância, através da qual foi constatada uma redução significativa, somente na ingestão das fêmeas do grupo que recebeu a maior dose do extrato da planta com relação às fêmeas do grupo controle.

Os resultados relacionados à dosagem dos níveis plasmáticos de progesterona nas ratas e ao número de corpos lúteos, demonstram não existir efeito do tratamento nas funções ovarianas, pois na análise estatística não foi possível detectar diferenças entre os 4 grupos experimentais.

Tabela 1- Toxicidade materna e desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* ao 4º dia de prenhez que receberam, por gavagem do 0 ao 4º dias de gestação, diferentes doses do extrato aquoso de *P. barbatus* ou água destilada.

	Controle	400 mg/kg/dia	800 mg/kg/dia	1600 mg/kg/dia
Número de fêmeas prenhes	12	12	12	12
*Ganho de peso materno (g)	9.50 ± 11.0 ^b	4.00 ± 11.0 ^a	6.00 ± 17.0 ^{ab}	-1.00 ± 24.0 ^a
**Ingestão diária de ração (g)	19.31 ± 2.52 ^b	16.06 ± 3.08 ^{ab}	15.48 ± 3.57 ^{ab}	12.67 ± 4.79 ^a
**Nível plasmático de Progesterona (ng/ml)	26.03 ± 7.74 ^a	30.27 ± 6.60 ^a	26.87 ± 6.87 ^a	28.83 ± 5.58 ^a
*Número de Corpo Lúteo (total)	12.0 ± 4.0 ^a (153)	13.0 ± 2.0 ^a (152)	12.0 ± 1.5 ^a (147)	12.0 ± 2.0 ^a (145)

*mediana ± semi-amplitude total, Teste de Kruskal-Wallis (p<0.05)

** média ± SD, Análise de Variância (p<0.05)

A observação dos dados da Tabela 2 indica que o número total de embriões coletados ao 4º dia de gestação foi semelhante entre os grupos experimentais, assim como o número de embriões que alcançaram o estágio de blastocisto maduro. Houve, entretanto, nos grupos que receberam o extrato, um decréscimo na porcentagem de embriões menos desenvolvidos que ainda estavam em estágio de mórula ou blastocisto inicial, possivelmente correlacionado ao aumento significativo dose-dependente na porcentagem de embriões anômalos ($p < 0.05$, teste de Goodman). Analisando a porcentagem de fêmeas que apresentaram embriões anômalos, observa-se que houve também um aumento dessa porcentagem nos grupos tratados, sendo que 83.3% das fêmeas tratadas com a dose de 1600 mg/kg/dia (maior dose) apresentaram alterações embrionárias em suas ninhadas.

O teste de Análise de Variância, utilizado para avaliação do número médio de blastômeros por embrião, não detectou diferenças significantes ($p < 0.05$) entre os resultados dos grupos tratados com o extrato em relação ao grupo controle.

Tabela 2 - Avaliação dos embriões coletados ao 4º dia de prenhez de ratas Wistar que receberam, por gavagem do 0 ao 4º dias de gestação, diferentes doses do extrato aquoso de *P. barbatus* ou água destilada.

	Controle	400 mg/kg/dia	800 mg/kg/dia	1600 mg/kg/dia
Número de fêmeas				
Total	12	12	12	12
*Com embriões anômalos (%)	4 (33.3) ^a	7 (58.3) ^{ab}	7 (58.3) ^{ab}	10 (83.3) ^b
Número total de embriões				
**Coletados	99 (8.5 ± 3.5) ^a	101(8.5 ± 2.5) ^a	102 (8.5 ± 3.5) ^a	89 (7.0 ± 3.0) ^a
Processados para citologia (%)	53 (53.5)	35 (34.7)	57 (55.9)	41 (46.1)
*Número de blastocistos maduros (%)	39 (39.40) ^a	39 (38.60) ^a	43 (42.2) ^a	35 (39.3) ^a
* Número de blastocistos iniciais e mórulas (%)	53 (53.5) ^b	48 (47.5) ^{ab}	34 (33.3) ^a	28 (31.5) ^a
*Número de embriões anômalos (%)	7 (7.1) ^a	13 (12.9) ^{ab}	25 (24.5) ^{bc}	26 (29.2) ^c
***Número médio de blastômeros/embrião	23.29 ± 3.41 ^a	22.21 ± 3.60 ^a	20.66 ± 6.43 ^a	19.02 ± 6.45 ^a

* Teste de Goodman (p< 0.05)

** Teste de Kruskal-Wallis (mediana ± semi-amplitude total)

*** Análise de Variância (p<0.05)

4. DISCUSSÃO

Para avaliar experimentalmente os efeitos adversos de substâncias químicas sobre a gestação é importante o estabelecimento das doses a serem testadas, pois considera-se a existência de uma dose limite a partir da qual possam ocorrer efeitos adversos sobre o desenvolvimento intra-uterino. Outro aspecto que deve ser considerado diz respeito à diferença de sensibilidade existente entre as espécies animais, o que implica na possibilidade de extrapolação dos dados obtidos em laboratório para a espécie humana.

Relatos populares indicam que, com finalidade abortiva, o boldo-brasileiro é ingerido em doses superiores às utilizadas com finalidade terapêutica. Dessa forma, após estudos preliminares, optou-se por utilizar doses crescentes, até 80 vezes maiores que as utilizadas pela população no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

Durante o experimento, as fêmeas dos grupos que receberam as diferentes doses do extrato apresentaram sinais leves de intoxicação. Na avaliação da toxicidade materna, não foram observadas alterações físicas ou comportamentais que pudessem ser relacionadas ao tratamento. O ganho de peso corporal se apresentou reduzido nos animais que receberam o extrato nas doses de 400 e 1600 mg/kg/dia, em relação ao grupo controle. No grupo que recebeu o extrato na dose de 800 mg/kg/dia, essa redução, apesar de existir, não foi estatisticamente diferente do grupo controle. O consumo de ração, outro parâmetro indicativo de toxicidade

materna, manteve-se reduzido durante todo o período de tratamento, sendo significativo em relação ao controle somente na maior dose (Tabela 1).

Como o tratamento foi realizado no período de pré-implantação, quando ainda não estão estabelecidas as trocas materno-embrionárias através da placenta, e os embriões estão expostos aos agentes tóxicos através dos fluidos maternos, acredita-se que possíveis alterações na homeostase dessas ratas, resultantes da intoxicação, não devam estar associadas aos efeitos reprodutivos adversos observados neste estudo.

A exposição materna a princípios ativos naturais vem sendo relacionada a efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento embrionário. O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), quando administrado como extrato aquoso a ratas prenhes do 1º ao 4º dias de gestação na dose de 52 mg/kg/dia, aumentou o número de blastocistos anômalos coletados na luz uterina, evidenciando efeito embriotóxico [14]. Da mesma forma, a exposição de camundongos a *Ruta graveolens* elevou a incidência de embriões com alterações morfológicas associada a uma redução no número de blastômeros [15].

No presente estudo, a administração do extrato aquoso do boldo nas doses de 400, 800 e 1600 mg/kg/dia a ratas prenhes antes da implantação embrionária, resultou no aumento do número de embriões que apresentaram alterações morfológicas (Tabela 2). A porcentagem de embriões anômalos, que foi de 7.1% no grupo controle, aumentou para

29.2% no grupo que recebeu a maior dose do extrato. Os grupos tratados com 400 e 800 mg/kg/dia, apresentaram porcentagens de 12.9 e 24.5%, respectivamente, sendo superiores à do grupo controle. Este aumento foi estatisticamente significativo, além de dose-dependente. Analisando este parâmetro com relação às mães, unidade experimental a ser considerada em estudos de toxicologia do desenvolvimento, observou-se que a porcentagem de ratas prenhes que apresentavam embriões anômalos também aumentou significativamente de 33.3% das fêmeas no grupo controle para 83.3% das fêmeas no grupo que recebeu a maior dose do boldo. Essas observações indicam que o extrato exerceu ação direta sobre os embriões, caracterizada por diferenças no tamanho e forma das células embrionárias, além da falta de compactação e integridade das mesmas.

Considerando que o efeito embriotóxico pode se estabelecer através da inibição do crescimento embrionário e que a redução no número de células pode estar relacionada a alterações na formação dos blastocistos [16], foi realizada a análise do número médio de blastômeros por embrião. Como pode ser observado na Tabela 2, este parâmetro não apresentou diferenças significativas entre os grupos testados, indicando que o tratamento não interferiu com a proliferação celular.

Apesar do número médio de blastômeros ter se mostrado semelhante em todos os grupos experimentais, verificou-se que esse número é inferior aos observados em outros estudos [11,14,15,17]. Além disso, na análise dos estágios de desenvolvimento dos embriões, foi constatada elevada incidência de embriões em fase de mórula ou blastocisto

inicial, inclusive no grupo controle, quando comparada à porcentagem de blastocistos maduros. Estes dados sugerem uma possível imaturidade dos embriões no momento da coleta. Embora a escolha do dia de coleta dos embriões tenha se baseado em dados da literatura que indicam que a maioria dos embriões se implanta ao final da tarde do 4º dia de gestação, considerando-se o dia da fecundação como dia 0, acredita-se que essa diferença se deva a linhagem de ratos utilizada [18,19].

Pode-se verificar também que houve uma queda significativa na porcentagem de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, de 53.5% no grupo controle para 31.5% no grupo tratado com a dose de 1600 mg/kg/dia do extrato. Esta redução pode ser inferida ao aumento, inversamente proporcional, na porcentagem de embriões anômalos observado nos grupos tratados, pois as alterações na morfologia das células não permitiram a classificação desses embriões quanto ao estágio de desenvolvimento.

Além de atuar sobre o conceito, os princípios ativos naturais também podem interferir na manutenção da gestação alterando o transporte embrionário através de uma ação sobre o oviduto. Uma vez que, o tempo correto de permanência dos embriões nesse local, constitui-se, no início da gestação, em pré-requisito para o desenvolvimento completo dos mesmos, alterações na motilidade do oviduto, atrasando ou adiantando a chegada dos embriões ao útero, podem estar associadas a perdas pré-implantação [20]. De fato, o extrato de *Ixora finlaysoniana* administrado a ratas no 1º dia de prenhez promoveu a aceleração no transporte do embrião, impedindo o

processo normal da implantação [21]. Efeito semelhante foi observado em camundongos expostos ao extrato aquoso de *Ruta graveolens*, cuja ingestão resultou, também, em interferência no transporte dos embriões [15].

Vários autores observaram, em diferentes espécies animais, atividade do extrato de boldo sobre a musculatura lisa associando-a a presença de diterpenos extraídos da raiz da planta [22,23]. Frente a essa evidência, aventou-se a hipótese de que o efeito anti-implantação do boldo relatado por outros autores [9], estivesse associado à ação do extrato sobre a musculatura do oviduto, interferindo com sua motilidade e, conseqüentemente, com o transporte embrionário. Porém, o número total de embriões coletados ao 4º dia de gestação, assim como o número de blastocistos maduros observados, foi semelhante entre todos os grupos experimentais (Tabela 2). Deve-se considerar, entretanto, que, no presente estudo, o extrato aquoso foi obtido a partir de folhas frescas do boldo e que a concentração dos componentes químicos responsáveis por essa atividade espasmolítica é menor nas partes aéreas da planta [24].

Alterações na motilidade do oviduto podem também ser induzidas por desbalanço nos níveis hormonais, uma vez que o número de receptores responsáveis pela contração e relaxamento da musculatura desse órgão é modulado por hormônios [25]. Tanto o transporte como o desenvolvimento do embrião, ocorrem em resposta ao nível de estrogênio e progesterona circulantes, secretados, a princípio, pelo corpo lúteo materno. Algumas espécies de plantas medicinais são capazes de interferir na secreção ou na função de diferentes hormônios que participam do processo

de gestação com conseqüências adversas para o desenvolvimento embrionário. A exposição de ratas ao extrato de *Mallotus philippinensis* (kamala), por exemplo, reduziu significativamente os níveis séricos de FSH, LH e estradiol, com conseqüente alteração no desenvolvimento folicular, ciclo estral, ovulação, formação de corpos lúteos, interferindo no estabelecimento e manutenção da prenhez [26]. Por sua vez, o extrato aquoso de *Inula viscosa* administrado a ratas prenhes do 1º ao 6º dias de gestação, reduziu o nível de progesterona alterando a implantação dos embriões [27].

O extrato do boldo, não alterou os níveis plasmáticos de progesterona determinados por radioimunoensaio ao final do período de tratamento, os quais variaram em média de 26.03 a 30.27 ng/ml (Tabela 1). Não foram observadas também diferenças entre o número de corpos lúteos nos grupos experimentais, demonstrando que sua formação e desenvolvimento não foram afetados com o tratamento.

Conclui-se, que a ingestão do extrato aquoso das folhas de *P. barbatus*, no início da gestação, resulta em efeito embriotóxico direto, promovendo alterações morfológicas no embrião em seus primeiro estágios de desenvolvimento, sendo mantidos a integridade hormonal materna e o transporte dos embriões ao útero.

REFERÊNCIAS

- [1] Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP; 1996.
- [2] Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica. São Paulo: UNESP; 2002.
- [3] Damasceno DC, Volpato GT, Lemonica IP. A review of antifertility folkloric tested in laboratory animals. Rev Bras PI Med 2002; 5(1): 19-26.
- [4] Moreira F. Plantas que curam: Cuide de sua saúde através da natureza. 5.ed. São Paulo: Hemus; 1996. 256p.
- [5] Panizza S. Plantas que curam: Cheiro de Mato. São Paulo:Ibrasa; 1997. p.50-1.
- [6] Farnsworth RN, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA.. Potencial value of plants as source of new antifertility agents. J Pharm Sci 1975; 64: 535-98.
- [7] Valdés LJ, Mislankar SG, Paul AG. *Coleus barbatus* (*C. forskohlii*) (Lamiaceae) and the potential new drug forskolin (coleonol). Econ Bot 1987; 41: 474-83.
- [8] Silva EA, Sheu H, Lima – Lardman HTR, Souccar C, Lapa AJ. Efeitos do tratamento crônico do extrato da *Coleus barbatus* Benth na fertilidade e na capacidade reprodutora de ratas. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil; 1992, Curitiba. Curitiba: UFPR; 1992. p.58.
-

-
- [9] Almeida FCG, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 73:53-60.
- [10] Tarkowsky AK. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966; 5: 394-400.
- [11] Giavini E, Lemonica IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: Cyclophosphamide, Cis-Platinum, Adriamycin. *Teratog Carcinog Mutagen* 1990; 10: 417-26.
- [12] Zar JH. *Biostatistical analysis*. 4^a ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.
- [13] Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat* 1964; 35(2): 716-25.
- [14] Damasceno DC, Lemonica IP. Embryotoxicity and anti-implantation effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. *Rev Bras Toxicol* 1999; 12: 47-54.
- [15] Gutiérrez-Pajares JL, Zúñiga L, Pino J. *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 667-72.
- [16] Kola I, Folb P. Chlorpromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 527-36.
-

-
- [17] Orihuela PA, Ishiyama V. Postcoital ingestion of the aqueous extract of *Erythrina falcata* Benth prevents pregnancy in the mouse. *Contraception* 2006; 73: 307-10.
- [18] Giavini E, Prati M. The timing of preimplantation events and blastocyst proliferation in rat. *Act Embryol Exp* 1978; 3: 279-82.
- [19] Cummings AM. Toxicological mechanisms of implantation failure. *Fundam Appl Toxicol* 1990; 15: 571-9.
- [20] Emmens CW. Antifertility agents. *Annu Rev Pharmacol* 1970; 10: 237-54.
- [21] Singh MM, Chowdhury SR, Kulshreshtha DK, Kamboj VP. Antigestagenic activity of *Ixora finlaysoniana* in rat. *Contraception* 1993; 48: 178-91.
- [22] Dubey MP, Srimal RC, Nityanand S, Dhawan BN. Pharmacological studies on coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. *J Ethnopharmacol* 1981; 3: 1-13.
- [23] Kasonia K. Screening préliminaire d'extraits de plantes utilisées dans les maladies respiratoires au Kivu (Zaire) sur tracheé isolée de cobaye. *Belg J Bot* 1995; 128:165-75.
- [24] Shah V, Bhat SV, Bajwa BS, Dornwer H, de Souza NJ. The occurrence of forskolin in the Labiatae. *Planta Med* 1980; 39: 183-5.
-

- [25] Melo RCN. Inervação autonôma do útero de mamíferos. Bol Cent Biol Reprod 1994; 13: 37-48.
- [26] Thakur SC, Thakur SS, Chaube SK, Singh SP. An ethereal extract of Kamala (*Mallotus philippinensis* (Moll.Arg) Lam.) seed induce adverse effects on reproductive parameters of female rats. Reprod Toxicol 2005; 20:149-56.
- [27] Al-Dissi NM, Salhab AS, Al-Hajj HA. Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. J Ethnopharmacol 2001; 77:117-21.
-



Capítulo III

*Efeito tóxico da exposição pré-natal ao
Plectranthus barbatus Andr.
sobre o desenvolvimento de
embriões de ratos pós-implantados*



* Padronizado de acordo com as normas para
publicação na Revista Contraception

RESUMO

O extrato aquoso do boldo-brasileiro demonstrou, em estudo anterior, exercer ação tóxica direta sobre o embrião de ratas, quando administrado durante a prenhez, antes da implantação embrionária. Como as alterações, nesse período, podem vir a comprometer a implantação do concepto no útero materno e o desenvolvimento do embrião pós-implantado, o objetivo deste estudo foi o de verificar, ao final da gestação, as repercussões maternas e fetais do tratamento.

Com esta finalidade ratas *Wistar* prenhes receberam, por via oral através de gavagem, doses crescentes (400, 800 e 1600 mg/kg/dia) do extrato aquoso de *P. barbatum* ou água destilada (grupo controle) do 0 ao 4º dia de prenhez, sendo que ao 20º dia foram realizadas a avaliação do desempenho reprodutivo materno e a análise morfológica dos recém-nascidos.

A porcentagem de perda embrionária pré-implantação não diferiu significativamente entre os grupos. Entretanto, o tratamento com o extrato aumentou o número de reabsorções precoces e conseqüentemente a porcentagem de perda embrionária pós-implantação. Os fetos examinados a termo, apresentaram retardo de desenvolvimento, provavelmente devido ao comprometimento das trocas materno-fetais, resultante de alterações placentárias.

Portanto, conclui-se, que o extrato aquoso do boldo-brasileiro, administrado às ratas prenhes em dose até 80 vezes mais elevadas do que as utilizadas popularmente com fins terapêuticos, não interferiu com a implantação embrionária, apresentando, porém, efeito embriotóxico, embriofetal e alterando o peso e estrutura da placenta.

Palavras-Chave: *Plectranthus barbatum*, Boldo-Brasileiro, Ratas, Embriotoxicidade, Embriofetalidade, Placentomegalia

ABSTRACT

Aim: This study examined whether the aqueous extract of *Plectranthus barbatus* (brazilian-boldo), with confirmed toxic effect on early embryonic development, could affect the establishment and maintenance of pregnancy and/or alter embryo post-implantation development in rats.

Methods: Pregnant *Wistar* rats were treated with an aqueous extract of *P. barbatus* (400, 800 and 1600 mg/kg per day) or water (control), orally, on days 0-4 of pregnancy. At term, reproductive performance of dams was evaluated and fetuses were examined for external, visceral and skeletal variations or fetal development delayed.

Results: There was no significant change in the percentage of pre-implantation embryonic loss in the treated groups. However, there was an increase in the number of resorptions and in the percentage of post-implantation embryonic loss, indicating abortive effect. The analysis of fetal development revealed a reduction in the total number of ossification centers, and this delayed may be related to possible placental dysfunction.

Conclusion: The results of this study are in agreement with the popular reputation of this plant as abortifacient. Further, the plant possesses toxic effect that interferes with embriofetal and placental development.

Keywords: *Plectranthus barbatus*, Brazilian-Boldo, Rats, Embryotoxicity, Abortive effect, Placental alterations

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento das alterações reprodutivas promovidas por plantas medicinais, recurso terapêutico muito difundido no Brasil, é necessário para avaliação de riscos para saúde humana, principalmente durante a gestação.

Efeitos adversos que comprometam o estabelecimento e manutenção da gestação, resultantes da exposição materna a agentes tóxicos, podem estar associados tanto a uma ação sobre o organismo materno como sobre o organismo embriofetal, interferindo no desenvolvimento intra-uterino [1]. Vários princípios ativos naturais, utilizados com finalidade abortiva, no início da gestação, apresentam efeitos embriotóxicos [2-4].

Embora o período inicial da gestação não seja um período teratogênico, os agentes químicos podem entrar em contato com o embrião através dos fluidos maternos, persistindo em suas células por períodos maiores que no sangue [5], e promover efeitos tóxicos. Esses efeitos podem resultar, ao final da gestação, em morte intra-uterina [6,7], retardo do desenvolvimento fetal [8,9] e/ou em alterações morfofuncionais nos recém-nascidos [10].

Em estudos anteriores, procurando estabelecer o possível mecanismo pelo qual o extrato aquoso do *Plectranthus barbatus* (boldo-brasileiro) atua sobre a gestação, foram administrados a ratas prenhes, durante o período de pré-implantação embrionária, doses do extrato até 80

vezes maiores que as utilizadas terapeuticamente. Nesse estudo, constatou-se que o boldo apresenta ação tóxica direta sobre o embrião, promovendo alterações morfológicas em seus primeiros estágios de desenvolvimento. A ingestão desse extrato não esteve associada a alterações nos níveis plasmáticos maternos de progesterona, assim como não interferiu no transporte embrionário [11].

Considerando que, alterações morfológicas nos embriões antes da implantação, podem comprometer seu processo de implantação no útero materno, assim como seu desenvolvimento, o objetivo do presente estudo foi verificar, ao final da gestação, as possíveis repercussões da exposição materna ao extrato de *P. barbatus*, durante o período de pré-implantação, no desempenho reprodutivo de ratas e no desenvolvimento do embrião pós-implantado.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Extrato aquoso

O *P. barbatus* foi coletado na região de Rubião Júnior, Botucatu (SP/Brasil) e identificado no Departamento de Botânica do IBB, UNESP, sendo um espécime da planta depositado (nº 25.085) no Herbário da Universidade.

O princípio ativo foi extraído das folhas frescas através de mistura etanol/água 70% durante 48 horas. A mistura foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo para eliminação do álcool e obtenção de um extrato aquoso concentrado. Alíquotas de 0.2 ml do extrato da planta foram utilizadas na determinação do peso seco do extrato, que variou de 50 a 100 mg/ml.

2.2. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas *Wistar* com idades entre 8 e 12 semanas, ambos adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia – FM, em sala com temperatura controlada e com ciclo de claro/escuro de 12/12 hs durante os períodos de aclimação (aproximadamente 10 dias) e experimental. Água e ração foram oferecidas “*ad libitum*”.

2.3. Procedimento experimental

Para o acasalamento, as ratas foram colocadas com macho comprovadamente fértil. A presença de espermatozóides observada no exame microscópico dos esfregaços vaginais foi considerada como indicativa do dia 0 da gestação.

As ratas prenhes foram distribuídas, aleatoriamente, em 4 grupos experimentais com 12 animais cada e foram tratadas do 0 ao 4º dias de gestação com água destilada (grupo controle) ou com o extrato do boldo nas doses de 400, 800 ou 1600 mg/kg/dia (grupos experimentais).

A ingestão de ração e o ganho de peso das ratas prenhes foram observados com a finalidade de verificar uma possível toxicidade do extrato nas doses administradas.

As avaliações do desempenho reprodutivo materno e análises morfológicas dos fetos foram realizadas no 20º dia de gestação, quando as fêmeas prenhes foram sacrificadas.

2.4. Avaliação fetal

Após laparotomia e exposição dos cornos uterinos, foram verificados pontos de implantação, reabsorções precoces e tardias e o número de fetos vivos e mortos. Os fetos e as placentas foram pesados e examinados externamente. Os ovários também foram retirados para contagem do número de corpos lúteos.

Quando não foram verificados desenvolvimento fetal ou pontos de implantações visíveis, o útero foi submetido ao teste de confirmação de prenhez, utilizando-se reativo de Salewsky [12], o qual permite a visualização de reabsorções em estágios iniciais de implantação.

Metade de cada ninhada, após fixação em Bouin, foi analisada quanto à presença de alterações viscerais, utilizando-se o método de secções seriadas proposto por Wilson [13]. A outra metade dos fetos, foi examinada quanto à presença de alterações esqueléticas seguindo método proposto por Staple & Schenell [14], e os pontos de ossificação contados para determinação do grau de desenvolvimento fetal [15].

2.5. Análise estatística

Para a avaliação dos resultados foram utilizados a técnica da Análise de Variância para o modelo com um fator, complementada com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey [16], o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis [16] e o teste de Goodman para comparações entre e dentro de populações binomiais [17].

Foram utilizadas letras minúsculas para indicar os resultados das comparações entre grupos fixadas a categoria de resposta.

Todas as conclusões estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da toxicidade materna

Os dados referentes ao peso corporal médio das ratas prenhes nos 4 grupos experimentais, obtidos diariamente durante o período de tratamento e semanalmente até o final da gestação, encontram-se representados no Gráfico 1.

O ganho de peso materno total e durante o tratamento apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$, Análise de Variância), nos grupos que receberam 800 e 1600 mg/kg/dia do extrato quando comparados ao grupo controle. Porém, o ganho de peso corrigido, calculado descontando-se do ganho de peso total o peso da ninhada, foi semelhante entre os grupos (Gráfico 2 e Tabela 1).

O consumo médio diário de ração dos grupos tratados, Tabela 1, apresentou redução significativa durante todo o período experimental (Análise de Variância, $p < 0.05$).

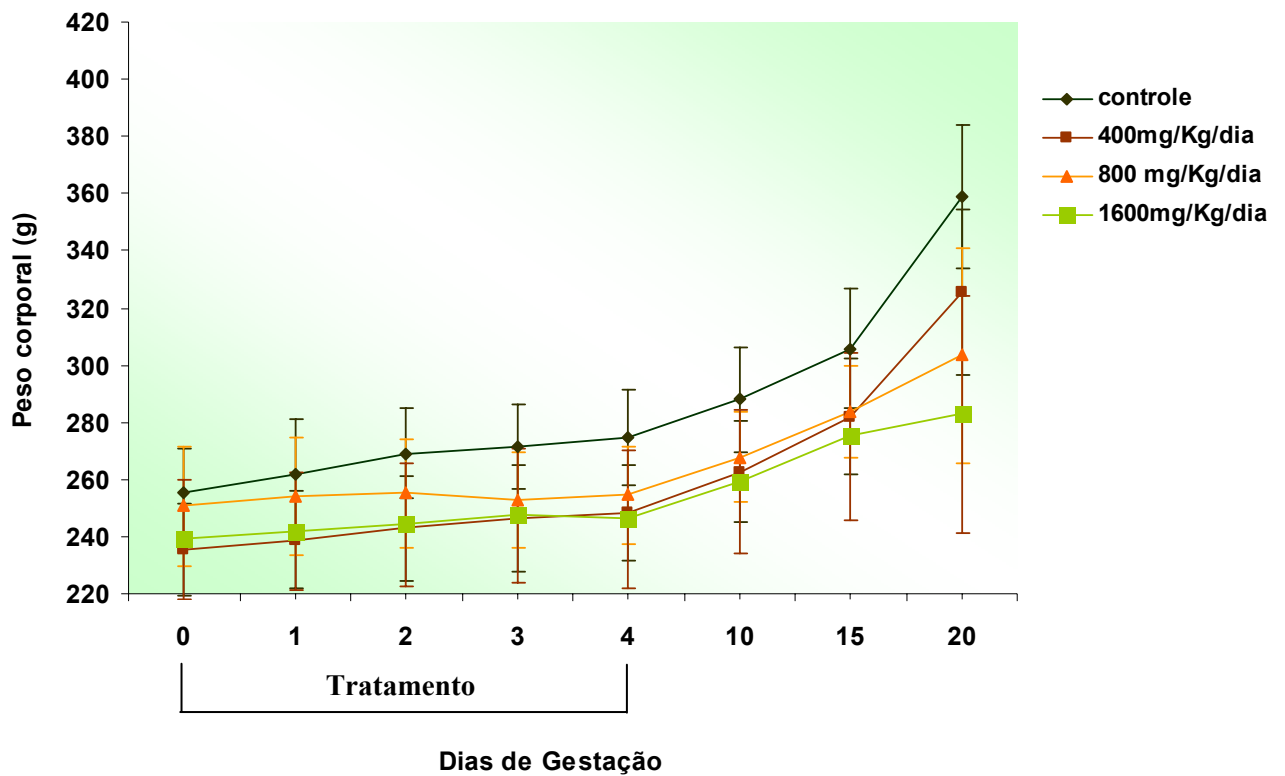
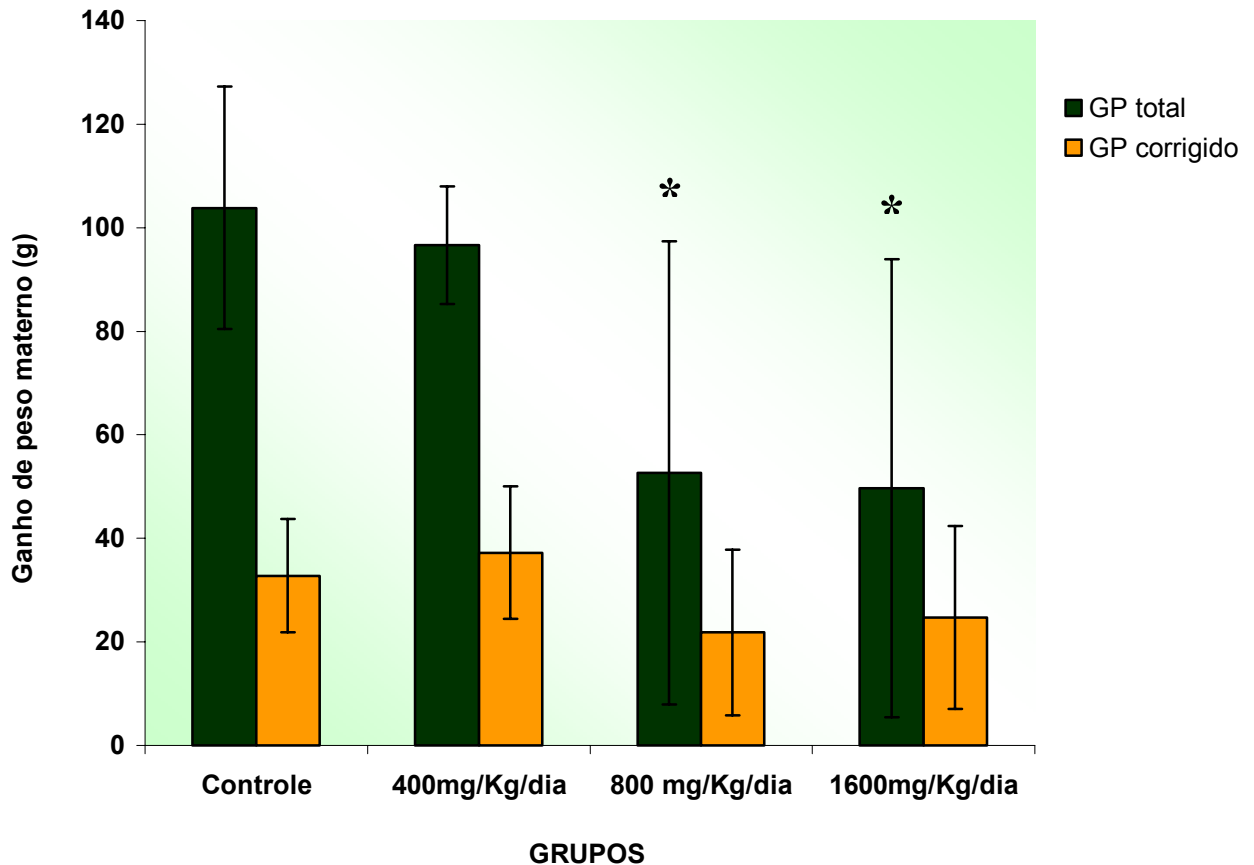


Gráfico 1 – Peso corporal (g) diário de ratas *Wistar* que receberam, por gavagem, água destilada ou extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* nas doses de 400, 800 ou 1600 mg/kg/dia do 0 ao 4º dias de gestação. São apresentadas nas médias e os respectivos desvios padrões.



* Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$, Análise de Variância).

Gráfico 2 – Ganho de peso corporal materno (g) total e corrigido de ratas *Wister* que receberam, por gavagem, água destilada ou extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* nas doses de 400, 800 ou 1600 mg/kg/dia do 0 ao 4º dias de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões.

Tabela 1 - Avaliação da toxicidade materna ao 20º dia de gestação (ganho de peso e ingestão diária de ração) em ratas Wistar que receberam, por gavagem, diferentes doses do extrato aquoso de *P.barbatus* ou água destilada do 0 ao 4º dias de prenhez.

	GRUPO 1 Controle	GRUPO 2 400 mg/kg/dia	GRUPO 3 800 mg/kg/dia	GRUPO 4 1600 mg/kg/dia
Ganho de peso materno (g)				
Total	103.83 ± 23.43 ^b	96.64 ± 11.41	52.67 ± 44.73 ^a	49.70 ± 44.21 ^a
Durante tratamento (0 ao 4º dias)	19.58 ± 10.12 ^b	13.27 ± 4.88 ^{ab}	3.92 ± 10.71 ^a	8.10 ± 9.33 ^a
Corrigido (Total – Ninhada)	32.77 ± 10.95 ^a	37.25 ± 12.74 ^a	21.81 ± 16.05 ^a	24.68 ± 17.69 ^a
Ingestão diária de ração (g)				
	22.90 ± 1.53 ^c	22.18 ± 2.01 ^{bc}	20.21 ± 2.04 ^{ab}	19.35 ± 3.52 ^a

Média ± SD (Análise de Variância, p<0.05)

3.2. Avaliação do desempenho reprodutivo materno

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da avaliação do desempenho reprodutivo materno, ao final da gestação, das ratas expostas ao boldo-brasileiro no período de pré-implantação.

O número de fêmeas que apresentaram reabsorções precoces aumentou nos grupos tratados, além de que foi observada uma perda total dos embriões implantados em metade das fêmeas que receberam as 2 maiores doses do extrato.

O teste estatístico de Kruskal-Wallis (mediana e semi-amplitude total) demonstrou não existir diferença significativa ($p < 0.05$) no número de corpos lúteos e de sítios de implantações, sendo, no entanto, verificado aumento significativo no número de reabsorções, com conseqüente redução no número de fetos vivos, nos grupos tratados com as doses de 800 e 1600 mg/kg/dia do extrato da planta.

A porcentagem de perda embrionária pré-implantação aumentou nos grupos que receberam o extrato quando comparada à apresentada pelo grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Os grupos tratados com as duas maiores doses do extrato apresentaram aumento significativo na porcentagem de perda embrionária pós-implantação (62.50% e 95.45%, respectivamente), não sendo observada perda dos embriões após a implantação no grupo controle.

Os pesos fetais médios não diferiram entre os grupos experimentais ($p < 0.05$, Análise de Variância). Porém, foi verificado em todos os grupos tratados, aumento significativo nos pesos placentários, assim como nos índices placentários.

Tabela 2 - Desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* ao 20º dia de gestação que receberam, por gavagem, diferentes doses do extrato aquoso de *P.barbatus* ou água destilada do 0 ao 4º dias de prenhez.

	GRUPO 1 Controle	GRUPO 2 400 mg/kg/dia	GRUPO 3 800 mg/kg/dia	GRUPO 4 1600 mg/kg/dia
Nº de Fêmeas				
Acasaladas	12	12	12	12
Com prenhez confirmada	12	11	12	11
Com reabsorção	5	8	9	11
Com reabsorção total	0	0	6	6
Com fetos vivos a termo (%)	12 (100%)	11 (100%)	6 (50%)	5 (45.5%)
*Nº de Corpos Lúteos	14.0 ± 2.0 ^a	13.0 ± 3.0 ^a	13.02 ± 2.0 ^a	13.0 ± 2.5 ^a
*Nº de Implantações	14.0 ± 3.5 ^a	12.0 ± 2.0 ^a	12.0 ± 2.5 ^a	12.0 ± 3.5 ^a
*Nº de Reabsorções	0.0 ± 1.0 ^a	1.0 ± 3.5 ^a	6.0 ± 6.5 ^{a,b}	9.5 ± 5.0 ^b
*Nº de Fetos Vivos	12.5 ± 4.0 ^c	10.0 ± 5.5 ^{b,c}	4.0 ± 5.5 ^{a,b}	0.5 ± 6.5 ^a
*% Perda Pré-Implantação	3.13 ± 17.86 ^a	10.99 ± 20.00 ^a	10.99 ± 15.38 ^a	7.69 ± 12.50 ^a
*% Perda Pós-Implantação	0.00 ± 11.11 ^a	8.33 ± 38.89 ^a	62.50 ± 50.00 ^b	95.45 ± 40.88 ^b
**Peso Fetal	3.70 ± 0.21 ^a	3.70 ± 0.24 ^a	3.60 ± 0.29 ^a	3.61 ± 0.54 ^a
**Peso Placentário	0.48 ± 0.03 ^a	0.64 ± 0.21 ^b	0.60 ± 0.08 ^b	0.73 ± 0.12 ^b
**Índice Placentário	0.132 ± 0.012 ^a	0.174 ± 0.054 ^b	0.170 ± 0.021 ^b	0.209 ± 0.061 ^b

*mediana ± semi-amplitude total (Teste de Kruskal-Wallis, p<0.05)

** média ± SD (Análise de Variância, p<0.05)

3.3. Avaliação fetal

Os dados referentes à avaliação dos fetos dos diferentes grupos experimentais ao final da gestação estão apresentados na Tabela 3.

Não foi observada a presença de fetos com malformações ou anomalias externas, o mesmo ocorrendo com relação a malformações esqueléticas e viscerais.

Anomalias esqueléticas, como costelas extra-numerárias e esternóbrios assimétricos, foram observados em todos os grupos estudados, porém sua incidência não diferiu significativamente entre os grupos.

Com relação às anomalias viscerais, foi observada a presença de ureteres dilatados ou sinuosos em todos os grupos experimentais, sem significância estatística.

O grau de desenvolvimento fetal foi avaliado através da contagem dos centros de ossificação (Tabela 3). Houve uma diminuição significativa no número de centros de ossificação total nos fetos dos grupos tratados com as duas maiores doses em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu a dose de 400 mg/kg/dia do extrato da planta ($p < 0.05$, teste de Kruskal-Wallis), demonstrando retardo no crescimento intra-uterino.

Tabela 3 - Avaliação morfológica e do grau de desenvolvimento dos fetos de ratas *Wistar* sacrificadas ao 20º dia de gestação que receberam, por gavagem, diferentes doses do extrato aquoso de *P.barbatus* ou água destilada do 0 ao 4º dias de prenhez.

	GRUPO 1 Controle	GRUPO 2 400 mg/kg/dia	GRUPO 3 800 mg/kg/dia	GRUPO 4 1600 mg/kg/dia
Número Total de Ninhadas	12	11	6	5
Número Total de Fetos	148	110	59	38
*Malformações				
Ninhadas afetadas	0/12	0/11	0/6	0/5
Fetos afetados	0/148	0/110	0/59	0/38
*Anomalias Externas				
Ninhadas afetadas	0/12	0/11	0/6	0/5
Fetos afetados	0/148	0/110	0/59	0/38
*Anomalias Esqueléticas				
Ninhadas afetadas	11/12 ^a	11/11 ^a	5/6 ^a	4/5 ^a
Fetos afetados (%)	54/148 (36.5) ^a	46/110 (41.8) ^a	21/59 (35.6) ^a	16/38 (42.1) ^a
Anomalias do esterno	52/148 ^a	44/110 ^a	21/59 ^a	16/38 ^a
Costela Extra-numerária	4/148 ^a	5/110 ^a	1/59 ^a	1/38 ^a
*Anomalias Viscerais				
Ninhadas afetadas	10/12 ^a	11/11 ^a	6/6 ^a	5/5 ^a
Fetos afetados (%)	36/148 (24.3) ^a	46/110 (41.8) ^a	21/59 (35.6) ^a	15/38 (39.5) ^a
Hidroureter	36/148 ^a	46/110 ^a	21/59 ^a	15/38 ^a
**Nº de centros de ossificação total	18.25 ± 1.30 ^b	17.50 ± 2.15 ^b	0.00 ± 9.20 ^a	0.00 ± 8.9 ^a

* Teste de Goodman, p<0.05

**Mediana ± semi-amplitude total (Teste de Kruskal-Wallis, p<0.05)

4. DISCUSSÃO

Os princípios ativos contidos nas plantas medicinais quando utilizados durante a gestação apresentam grande risco de toxicidade para o concepto, principalmente quando esse uso tem como objetivo interromper a gestação, pois, nesse caso, as doses empregadas são geralmente elevadas.

A esse respeito, deve-se considerar ainda, que, a exposição a doses tóxicas que venham a comprometer a homeostase materna, pode de *per se* induzir efeitos tóxicos no desenvolvimento intra-uterino do concepto [18].

Após estudos preliminares, foram selecionadas doses crescentes (respectivamente de 400, 800 e 1600 mg/kg/dia) do extrato aquoso de boldo brasileiro para o tratamento das ratas prenhes, sendo que a maior dose correspondeu a 80 vezes a dose utilizada popularmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

Para análise do grau de intoxicação materna foram avaliados, além das alterações físicas e comportamentais, o consumo de ração e o ganho de peso (Tabela1).

Durante o período experimental, a ingestão de ração manteve-se reduzida significativamente em todos os grupos que receberam o extrato da planta. Essa redução pode ser devida a um efeito irritante do extrato sobre a mucosa gástrica, influenciando, dessa forma, no ganho de peso materno.

Embora as ratas dos grupos tratados com o extrato, tenham apresentado, no início do experimento, pesos menores que as do grupo controle, o aumento de seu peso corporal foi proporcionalmente menor em comparação ao apresentado pelas ratas que não receberam o extrato. Quando analisado o ganho de peso total e o ganho de peso durante o período de tratamento, observou-se que esses parâmetros apresentaram redução significativa nos animais dos grupos que receberam as doses de 800 e 1600 mg/kg/dia do extrato. Por outro lado, o ganho de peso corrigido, calculado subtraindo-se o peso da ninhada do ganho de peso total, não se mostrou diferente entre os grupos experimentais.

Acredita-se, no entanto, que as alterações maternas observadas não tenham tido influência nos resultados avaliados ao final da gestação. Isto porque, o ganho de peso corrigido é um parâmetro mais conclusivo na avaliação da toxicidade materna, pois indica o real perfil ponderal das fêmeas; enquanto que, o ganho de peso total está diretamente relacionado com o tamanho da ninhada. A redução do peso materno durante o período de tratamento (0 ao 4º dias da gestação), observada em todos os grupos que receberam o extrato, também não pode ser associada às alterações no desenvolvimento embriofetal observadas ao final da gestação, pois, nesse período, ainda não estão estabelecidas as trocas materno-embrionárias através da placenta.

Ao final da gestação, a análise dos resultados de desempenho reprodutivo materno revelou que, apesar do número de corpos lúteos e sítios de implantações terem sido semelhantes entre os grupos, o

número de reabsorções precoces observadas aumentou significativamente nas fêmeas tratadas com as duas maiores doses do extrato quando comparadas às do grupo controle, sendo que esse aumento esteve associado à redução no número de fetos vivos a termo observada nesses grupos (Tabela 2).

A porcentagem de perda embrionária pré-implantação, embora aumentada nos grupos que receberam o extrato, não apresentou diferença significativa, indicando que a maioria dos embriões conseguiu se implantar.

Por outro lado, os animais dos grupos tratados com as duas maiores doses apresentaram aumento significativo na porcentagem de perda embrionária pós-implantação. Essa taxa, que foi praticamente nula no grupo controle, aumentou para 95.45% no grupo que recebeu 1600 mg/kg/dia do boldo (maior dose testada). Estudos anteriores indicam que, a exposição materna às mesmas doses do extrato resulta em importante efeito sobre os embriões pré-implantados, aumentando de maneira significativa e dose dependente o número de ninhadas com incidência elevada de embriões anômalos [11]. O aumento na porcentagem de perda embrionária pós-implantação sugere que, o efeito embriotóxico da planta observado antes da implantação, resulta na morte de grande parte dos embriões, logo após sua implantação no útero materno. De fato, cerca de metade das fêmeas que receberam as duas maiores doses do boldo, tiveram reabsorção total de suas ninhadas.

Considerando, pois, a importante toxicidade do extrato sobre o conceito antes da implantação, procurou-se verificar se, aqueles embriões que não eram absorvidos logo após implantados, conseguiriam se desenvolver normalmente até o final da gestação.

O primeiro parâmetro analisado na avaliação fetal foi o peso, através do qual estima-se o grau de desenvolvimento dos fetos a termo. Alterações no período inicial da gestação podem interferir no crescimento intra-uterino, reduzindo o peso fetal ao nascimento [19,20]. No presente estudo, o peso dos recém-nascidos apresentou-se semelhante em todos os grupos experimentais. Entretanto, a semelhança no peso dos filhotes ao nascimento pode estar relacionada ao número reduzido de fetos vivos a termo. Considerando que o tamanho da ninhada pode ter relação direta com o peso dos filhotes, esse parâmetro torna-se pouco conclusivo na avaliação do desenvolvimento embriofetal.

Assim, para fornecer um índice adicional na avaliação do desenvolvimento dos recém-nascidos, foi utilizado o método de contagem de centros de ossificação proposto para análise do grau de maturidade fetal [15].

Dessa análise foi possível constatar que, o tratamento resultou no retardo de desenvolvimento das ninhadas dos grupos que receberam as doses de 800 e 1600 mg/kg/dia do extrato, evidenciado por redução significativa no índice de ossificação total dos recém-nascidos quando comparado ao do controle (Tabela 3).

Um dos aspectos que deve ser considerado é que o retardo no desenvolvimento fetal induzido pelo boldo possa estar associado à alterações placentárias, tendo em vista que nos grupos que receberam o extrato foi observado aumento significativo no peso das placentas. Disfunções placentárias, promovidas por diversos agentes químicos, têm sido associadas com retardo de desenvolvimento fetal, e dependendo da intensidade, até mesmo com a morte do concepto [21].

Até o momento, poucos estudos foram realizados objetivando os efeitos tóxicos de agentes químicos sobre o desenvolvimento da placenta de ratos. Sabe-se que existem diferenças morfológicas entre a placenta de roedores e a placenta humana, mas em ambas, são verificados tipos análogos de células que desempenham funções similares [22]. A placenta de ratos apresenta 3 camadas morfolologicamente distintas: a decidual; a zona juncional composta de células trofoblásticas gigantes, células do espongiotrofoblasto e células de glicogênio (reserva); e o labirinto que se localiza na interface fetal e corresponde à área de trocas materno-fetais [23].

A placentomegalia tem sido considerada como alteração decorrente de possíveis alterações no desenvolvimento do concepto e esse aumento vem sendo associado a uma expansão da camada espongiotrofoblástica. O espessamento dessa camada intermediária de reserva, segundo alguns autores, ocorre para que o feto tenha maior suprimento de nutrientes e produza hormônios e fatores de crescimento em quantidades suficientes para compensar o retardo no desenvolvimento e sobreviver até o nascimento. Outra possibilidade aventada para explicar

essa alteração, é a de que anomalias placentárias possam estar relacionadas ao desenvolvimento anormal do trofoblasto durante os estágios iniciais da gestação, levando a expansão da camada espongiotrofoblástica [24].

No presente estudo, foi realizada análise morfológica preliminar das placentas coletadas, ao final da gestação, das ratas expostas ao boldo no período de pré-implantação. Na avaliação, foi observado espessamento da camada de espongiotrofoblasto, o que pode indicar efeito tóxico do boldo sobre as placentas. São necessários, no entanto, mais estudos e avaliações anatomopatológicas mais detalhadas, bem como análises morfométricas, para estabelecer o mecanismo de ação tóxica envolvido nas alterações do desenvolvimento placentário.

Apesar da exposição intra-uterina do conceito a agentes tóxicos no período de pré-implantação estar relacionado ao aumento no número de anomalias nos recém-nascidos[10,25], a incidência de anomalias externas, viscerais ou esqueléticas observadas neste estudo não esteve relacionada ao tratamento, mostrando-se semelhante em todos os grupos experimentais.

Conclui-se, portanto, que a ingestão do extrato aquoso do boldo no início da gestação, não compromete o processo de implantação embrionária, mas resulta em efeito embriotal precoce, o que justifica seu uso popular. Além disso, os fetos que conseguem se desenvolver até o nascimento, apresentam retardo de desenvolvimento intra-uterino, possivelmente associado a alterações placentárias.

REFERÊNCIAS

- [1] Lemonica IP. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: Sanseverino MTV, Sprintzer DT, Shüler-Faccini L, editors. Manual de Teratogênese. Porto Alegre: Ed Universidade/UFRGS; 2001. p.19-39.
- [2] Damasceno DC, Lemonica IP. Embryotoxicity and anti-implantation effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. Rev Bras Toxicol 1999; 12: 47-54.
- [3] Orihuela PA, Ishiyama V. Postcoital ingestion of the aqueous extract of *Erythrina falcata* Benth prevents pregnancy in the mouse. Contraception 2006; 73: 307-10.
- [4] Gutiérrez-Pajares JL, Zúñiga L, Pino J. *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. Reprod Toxicol 2003; 17: 667-72.
- [5] Nishimura H & Tanimura T. Clinical aspects of the teratogenicity of drugs. New York: Elsevier; 1976.
- [6] Nath D, Sethi N, Srivastava S, Jain AK, Onwughalu J. Teratogenic evaluation of an indigenous antifertility medicinal plant *Gossypium herbaceum* in rat. Fitoterapia 1997; 68: 137-9.
- [7] Al-Dissi NM, Salhab AS, Al-Hajj HA. Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. J Ethnopharmacol 2001; 77:117-21.
-

-
- [8] Calliari-Martins MR, Almeida RC, Basso T, Buskühl H, Chiochetta M, Tonetto C. Performance reprodutiva de ratas *Wistar* prenhes tratadas com glifosato durante o período de pré-implantação. *Rev Bras Toxicol* 2005; 18: 142.
- [9] Almeida FCG, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 73:53-60.
- [10] Giavini E, Lemonica IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: Cyclophosphamide, Cis-Platinum, Adriamycin. *Teratog Carcinog Mutagen* 1990; 10: 417-26.
- [11] Alvarenga CMD. Avaliação dos mecanismos de ação interceptiva e/ou embriotóxica do extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* Andr. (boldo-brasileiro) administrado a ratas prenhes no período de pré-implantação. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2006
- [12] Salewsky E. Farbemethode zum markroskopischen nachweis von implantatconstellen am uterus der ratter naunyn schmuderbergs. *Arch Pharmacol* 1964; 247: 367.
- [13] Wilson JC. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: Wilson JC, Warkani J, editors. *Teratology: Principles and Techniques*. Chicago: University of Chicago Press; 1965.
-

-
- [14] Staple RE, Schenell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 1964; 39: 61-3.
- [15] Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E *et al.* The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* 1979; 20: 237-42.
- [16] Zar JH. *Biostatistical analysis*. 4^a ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.
- [17] Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat* 1964; 35(2): 716-25.
- [18] Khera KS. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology* 1984; 29: 411-6.
- [19] Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000; 127:4195-202.
- [20] Lyra MMA, Costa-Silva JH, Carvalho DM, Gusmão AP, Araújo AV, Arruda VM *et al.* Efeito do óleo da *Azadirachta indica* (Neem) sobre a fase de pré-implantação da gestação em ratas *Wistar*. *Rev Bras Toxicol* 2005; 18:140.
- [21] Levin AA, Kilpper RW, Miller RK. Fetal toxicity of cadmium chloride: the pharmacokinetics in the pregnant *Wistar* rat. *Teratology* 1987; 36:163-70.
-

-
- [22] Loregger T, Pollheimer J, Knofler M, Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast – a review. *Placenta* 2003; 24(A): S104-10.
- [23] Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol* 2003; 260: 176-90.
- [24] Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N *et al.* Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod* 2001; 65: 1813-21.
- [25] Spielman H. Analysis of embryotoxic effects in preimplantation embryos. In: Bavister BD ed. *The mammalian preimplantation embryo*. New York: Plenum; 1987, p. 309-31.
-



Conclusão

CONCLUSÃO

A exposição materna ao extrato aquoso de folhas do *Plectranthus barbatus* Andrews (boldo brasileiro), durante o período de pré-implantação embrionária, resultou em efeito tóxico direto sobre os embriões pré-implantados, promovendo a morte de grande parte desses embriões logo após a implantação no útero materno, o que justifica sua utilização popular para interromper a gestação. Esse efeito embriotóxico da planta é caracterizado, ao final da gestação e nos embriões que se desenvolveram, por retardo de desenvolvimento intra-uterino, provavelmente relacionado a alterações placentárias induzidas pelo extrato.



Apêndice

AVALIAÇÃO ANTES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Dados Individuais

→ Grupo 1 - Controle (n=12)

Parâmetros \ Fêmeas	1	2	3	4	14	20	21	28	33	41	42	43	Média e/ou Total
Ganho de peso materno (g)	13	9	11	10	5	6	25	13	7	12	7	3	10.08 ± 5.70
Ingestão de ração (g)	21.5	18.75	20.75	19	21.75	18.75	23.5	18.5	18.5	18.75	18.75	13.25	19.31 ± 2.52
Progesterona (ng/ml)	13.11	26.50	26.12	26.12	31.94	22.49	29.87	39.32	12.93	34.39	26.77	22.80	26.03 ± 7.74
Nº de CL	18	10	16	12	11	11	16	12	11	13	11	12	12.75 ± 2.53 (153)
Nº de embriões coletados	12	5	10	10	5	9	8	11	7	9	8	5	8.25 ± 2.38 (99)
Nº de blastocistos tardios	2	0	3	6	2	2	4	10	1	4	4	1	3.25 ± 2.70 (39)
Nº blastocistos Iniciais e mórulas	10	5	7	4	3	7	4	0	2	4	4	3	4.42 ± 2.61 (53)
Nº de embriões Anômalos	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	0	1	0.58 ± 1.16 (07)
Nº de embriões fixados	6	1	7	4	4	6	4	4	2	6	4	5	4.42 ± 1.73 (53)
Nº médio de blastômeros	26.3	28.0	24.3	19.2	23.2	19.7	17.7	22.2	21.5	27.8	23.2	26.4	23.29 ± 3.41

AVALIAÇÃO ANTES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Dados Individuais

→ Grupo 2 - 400 mg/kg/dia (n=12)

Parâmetros \ Fêmeas	5	6	10	11	12	22	35	36	37	38	39	40	Média e/ou Total
Ganho de peso materno (g)	6	3	5	8	4	3	5	6	-14	-12	-5	4	1.08 ± 7.30
Ingestão de ração (g)	17.75	15.5	18.75	18	17.25	18.25	17.5	19	9.75	10.75	13.75	16.5	16.06 ± 3.08
Progesterona (ng/ml)	36.40	34.60	29.00	39.26	26.20	22.42	22.23	37.22	22.32	38.09	30.28	25.25	30.27 ± 6.60
Nº de CL	14	10	14	14	14	10	12	13	12	14	13	12	12.67 ± 1.50 (152)
Nº de embriões coletados	11	8	7	8	9	6	6	11	9	9	11	6	8.42 ± 1.93 (101)
Nº de blastocistos tardios	8	5	0	6	5	2	4	2	3	3	1	0	3.25 ± 2.45 (39)
Nº blastocistos Iniciais e mórulas	2	1	7	2	4	4	1	9	5	4	7	3	4.08 ± 2.54 (48)
Nº de embriões Anômalos	1	2	0	0	0	0	1	0	1	2	3	3	1.08 ± 1.16 (13)
Nº de embriões fixados	2	0	0	3	5	4	4	2	5	3	4	3	2.92 ± 1.68 (35)
Nº médio de blastômeros	20.5	-	-	29.7	20.6	16.5	22	21.5	24.8	25.3	24.2	17	22.21 ± 3.60

AVALIAÇÃO ANTES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Dados Individuais

→ Grupo 3 - 800mg/kg/dia (n=12)

Parâmetros / Fêmeas	7	8	9	13	15	16	24	25	26	27	34	44	Média e/ou Total
Ganho de peso materno (g)	7	6	6	-24	-2	-3	6	10	4	10	3	7	2.50 ± 9.27
Ingestão de ração (g)	15.75	17.25	17	7	11.75	14.75	19.25	16.5	12.5	19.25	16.25	18.5	15.48 ± 3.57
Progesterona (ng/ml)	22.04	21.85	26.27	40.00	40.00	27.39	20.52	28.42	22.88	24.67	25.13	18.31	26.87 ± 6.87
Nº de CL	14	12	12	13	11	12	12	14	11	12	11	13	12.25 ± 1.06 (147)
Nº de embriões coletados	11	11	9	7	4	11	10	10	7	7	7	8	8.5 ± 2.20 (102)
Nº de blastocistos tardios	2	6	2	3	2	2	7	4	3	5	2	5	3.58 ± 1.78 (43)
Nº blastocistos Iniciais e mórulas	3	5	7	4	2	4	2	0	1	2	2	2	2.83 ± 1.90 (34)
Nº de embriões Anômalos	6	0	0	0	0	5	1	6	3	0	3	1	2.08 ± 2.43 (25)
Nº de embriões fixados	5	6	5	3	2	8	6	5	4	1	5	7	4.75 ± 2.0 (57)
Nº médio de blastômeros	16.4	20	17	32	27.5	19.4	29.7	22.4	19.7	9	16.2	18.6	20.66 ± 6.43

AVALIAÇÃO ANTES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Dados Individuais

→ Grupo 4 - 1600 mg/kg/dia (n=12)

Parâmetros / Fêmeas	17	18	19	23	29	30	31	45	47	48	49	50	Média e/ou Total
Ganho de peso materno (g)	5	10	-2	2	0	4	5	-17	-21	-38	-2	-16	- 5.83 ± 14.14
Ingestão de ração (g)	16	14.5	14	17.5	16.5	15	15.5	12	3.75	2.5	13.25	11.5	12.67 ± 4.79
Progesterona (ng/ml)	19.75	24.47	28.40	31.26	31.65	25.23	26.26	34.86	29.70	33.34	22.03	39.02	28.83 ± 5.58
Nº de CL	12	12	11	12	12	11	11	14	12	14	14	10	12.08 ± 1.31 (145)
Nº de embriões coletados	9	10	10	8	6	5	7	9	4	7	7	7	7.42 ± 1.88 (89)
Nº de blastocistos tardios	5	4	0	2	3	3	4	4	0	0	6	4	2.92 ± 2.02 (35)
Nº blastocistos Iniciais e mórulas	1	2	4	5	0	2	1	5	1	5	0	2	2.33 ± 1.92 (28)
Nº de embriões Anômalos	3	4	6	1	3	0	2	0	3	2	1	1	2.17 ± 1.75 (26)
Nº de embriões fixados	6	5	0	4	5	3	4	5	2	4	2	1	3.42 ± 1.83 (41)
Nº médio de blastômeros	14.3	18.8	-	21.2	14.2	35.3	25.5	18.2	12	12.2	17.5	20	19.02 ± 6.45

AVALIAÇÃO ANTES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Peso corporal (g) das ratas avaliadas durante o período de pré-implantação (Média \pm SD)

Dias de Gestação	Grupo 1 (Controle)	Grupo 2 (400 mg/kg/dia)	Grupo 3 (800 mg/kg/dia)	Grupo 4 (1600 mg/kg/dia)
0	250.42 \pm 13.52	237.08 \pm 17.05	236.08 \pm 21.75	228.50 \pm 21.22
2	256.42 \pm 14.57	237.67 \pm 16.74	238.75 \pm 19.83	223.00 \pm 15.42
4	260.50 \pm 16.68	238.17 \pm 16.94	238.58 \pm 22.00	222.67 \pm 13.29

AVALIAÇÃO AO FINAL DA GESTAÇÃO

Dados Individuais

→ Grupo 1 - Controle (n=12)

Parâmetros \ Fêmeas	1	2	13	17	23	24	27	28	33	34	35	49	Média e/ou Total
Ganho de peso materno													
Total	114	136	98	146	105	95	72	100	122	103	89	66	103.83 ± 23.43
Durante tratamento	14	24	13	47	9	18	20	20	20	21	22	7	19.58 ± 10.12
Corrigido (sem ninhada)	38.5	39.9	27.4	60.5	26.1	30.8	29.0	27.1	36.7	32.0	30.5	14.8	32.77 ± 10.96
Ingestão de ração (g)	21.60	24.88	21.84	23.94	22.02	22.73	22.04	23.49	24.53	23.87	24.22	19.65	22.90 ± 1.53
Nº de CL	14	16	14	16	14	14	14	14	16	15	12	12	14.25 ± 1.36
Nº de implantações	14	15	12	16	14	12	9	14	16	15	10	9	13.00 ± 2.56
Nº de fetos vivos	14	15	12	16	14	11	7	12	15	13	10	9	12.42 ± 2.54 (148)
Nº de fetos mortos	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Nº de reabsorções	0	0	0	0	0	1	1	2	1	2	0	0	0.58 ± 0.79
Nº de fêmeas com reabsorções													5 / 12
% perda pré-implantação	0	6.25	14.28	0	0	14.28	35.71	0	0	0	16.67	25	9.35 ± 11.97
% perda pós-implantação	0	0	0	0	0	8.33	22.22	14.28	6.25	13.33	0	0	5.37 ± 7.62
% gestação a termo													100%
Peso médio dos RN	3.318	4.011	3.897	3.488	3.727	3.820	3.779	3.913	3.449	3.610	3.733	3.686	3.70 ± 0.21
Peso médio das placentas	0.489	0.451	0.469	0.437	0.485	0.471	0.467	0.546	0.500	0.442	0.522	0.497	0.48 ± 0.03
Índice Placentário	0.151	0.112	0.120	0.126	0.131	0.123	0.131	0.141	0.146	0.123	0.141	0.136	0.132 ± 0.012

AVALIAÇÃO AO FINAL DA GESTAÇÃO

Dados Individuais

→ Grupo 2 – 400 mg/kg/dia (n=12)

Parâmetros \ Fêmeas	8	9	10	14	18	19	30	39	40	41	42	48	Média e/ou Total
Ganho de peso materno													
Total	110	100	83	97	100	105	87	21	100	79	87	115	96.64 ± 11.41
Durante tratamento	15	12	12	11	15	16	19	10	4	22	10	10	13.27 ± 4.88
Corrigida (sem ninhada)	51.7	34.9	36.0	30.6	23.8	30.6	22.2	20.0	33.2	62.0	31.6	53.1	37.25 ± 12.74
Ingestão de ração (g)	25.24	23.45	21.13	21.14	23.43	20.16	18.97	19.23	20.88	25.02	21.35	23.18	22.18 ± 2.01
Nº de CL	14	13	14	13	16	14	10	Regressão	13	15	12	13	13.36 ± 1.57
Nº de implantações	11	12	9	12	13	13	10	0	13	9	12	12	11.45 ± 1.51
Nº de fetos vivos	10	11	8	11	13	13	10	0	12	2	10	10	10.00 ± 3.03 (110)
Nº de fetos mortos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de reabsorções	1	1	1	1	0	0	0	-	1	7	2	2	1.45 ± 1.97
Nº de fêmeas com reabsorções								-					8 / 12
% perda pré-implantação	21.43	7.69	35.71	7.69	18.75	7.14	0	?	0	40	0	7.69	13.28 ± 14.05
% perda pós-implantação	9.09	8.33	11.11	8.33	0	0	0	-	7.69	77.78	16.67	16.67	14.15 ± 21.92
% gestação a termo													92%
Peso médio dos RN	3.661	3.824	3.527	3.926	3.643	3.733	3.956	-	3.245	4.030	3.414	3.716	3.70 ± 0.24
Peso médio das placentas	0.548	0.495	0.635	0.520	0.593	0.514	0.578	-	0.620	1.245	0.586	0.663	0.64 ± 0.21
Índice Placentário	0.151	0.130	0.180	0.132	0.171	0.138	0.146	-	0.194	0.322	0.169	0.181	0.174 ± 0.054

AVALIAÇÃO AO FINAL DA GESTAÇÃO

Dados Individuais

→ Grupo 3 – 800 mg/kg/dia (n=12)

Parâmetros \ Fêmeas	5	6	11	25	26	36	37	38	50	51	52	53	Média e/ou Total
Ganho de peso materno													
Total	93	102	81	105	96	38	6	2	6	88	13	2	52.67 ± 44.73
Durante Tratamento	11	14	9	24	10	5	-6	-17	-4	2	-1	0	3.92 ± 10.71
Corrigido (sem ninhada)	33.8	36.6	35.1	41.8	27.5	34.2	5	0.3	4.8	31.8	9.7	1.1	21.81 ± 16.05
Ingestão de Ração (g)	21.97	21.24	20.01	21.81	23.31	21.98	19.52	16.95	19.03	21.12	18.61	17.01	20.21 ± 2.04
Nº de CL	11	15	11	12	13	13	13	13	13	14	13	14	12.92 ± 1.16
Nº de implantações	11	12	8	10	11	13	9	12	13	12	12	13	11.33 ± 1.61
Nº de fetos vivos	10	11	8	10	11	0	0	0	0	9	0	0	4.92 ± 5.19 (59)
Nº de fetos mortos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de reabsorções	1	1	0	0	0	13	9	12	13	3	12	13	6.42 ± 5.98
Nº de fêmeas com reabsorções													9 / 12
% perda pré-implantação	0	20	27.27	16.67	15.38	0	30.77	7.69	0	14.28	7.69	7.14	12.24 ± 10.36
% perda pós-implantação	9.09	16.67	0	0	0	100	100	100	100	25	100	100	54.23 ± 48.33
% gestação a termo													50%
Peso médio dos RN	3.474	3.511	3.190	3.829	4.003	-	-	-	-	3.564	-	-	3.59 ± 0.29
Peso médio das placentas	0.567	0.542	0.542	0.681	0.568	-	-	-	-	0.715	-	-	0.60 ± 0.08
Índice Placentário	0.164	0.161	0.174	0.179	0.141	-	-	-	-	0.203	-	-	0.170 ± 0.021

AVALIAÇÃO AO FINAL DA GESTAÇÃO

Dados Individuais

→ Grupo 4 - 1600 mg/kg/dia (n=12)

Parâmetros \ Fêmeas	3	4	12	20	21	22	31	43	44	45	46	47	Média e/ou Total
Ganho de peso materno													
Total	96	115	102	25	16	3	84	36	17	8	11	12	49.70 ± 44.21
Durante tratamento	17	17	3	21	17	-5	4	7	3	-4	2	4	8.10 ± 9.33
Corrigido (sem ninhada)	50.9	56.9	24	24	15.1	2.4	26.7	28.3	16.1	7.3	9.3	11.2	24.68 ± 17.69
Ingestão de Ração (g)	18.32	19.47	20.28	25.81	24.90	18.26	17.59	16.76	15.78	14.55	18.71	17.55	19.35 ± 3.52
Nº de CL	13	13	16	14	15	13	14	12	Regressão	11	0	12	13.30 ± 1.49
Nº de implantações	12	12	16	13	12	13	12	11	1	11	0	9	12.10 ± 1.79
Nº de fetos vivos	7	8	13	0	0	0	9	1	0	0	0	0	3.80 ± 4.94 (38)
Nº de fetos mortos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de reabsorções	5	4	3	13	12	13	3	10	1	11	0	9	8.30 ± 4.13
Nº de fêmeas com reabsorções													11 / 12
% perda pré-implantação	7.69	7.69	0	7.14	20	0	14.28	8.33	?	0	?	25	9.01 ± 8.53
% perda pós-implantação	41.67	33.33	18.75	100	100	100	25	90.90	100	100	-	100	70.97 ± 36.10
% gestação a termo													42%
Peso médio dos RN	3.545	4.111	3.917	-	-	-	3.905	2.756	-	-	-	-	3.61 ± 0.54
Peso médio das placentas	0.849	0.766	0.545	-	-	-	0.689	0.812	-	-	-	-	0.72 ± 0.12
Índice Placentário	0.244	0.191	0.139	-	-	-	0.178	0.295	-	-	-	-	0.209 ± 0.061

AVALIAÇÃO AO FINAL DA GESTAÇÃO

Peso corporal (g) das ratas avaliadas durante toda a gestação (Média ± SD)

Dias de Gestação	Grupo 1 (Controle)	Grupo 2 (400 mg/kg/dia)	Grupo 3 (800 mg/kg/dia)	Grupo 4 (1600 mg/kg/dia)
0	255.08 ± 15.57	235.25 ± 16.07	250.67 ± 21.09	239.17 ± 20.91
1	261.58 ± 19.42	238.92 ± 17.02	254.08 ± 20.38	241.92 ± 20.58
2	269.17 ± 15.90	242.83 ± 18.21	255.08 ± 19.08	244.25 ± 21.46
3	271.25 ± 14.82	246.42 ± 18.40	252.75 ± 16.69	247.50 ± 23.32
4	274.67 ± 16.93	248.25 ± 16.80	254.58 ± 17.13	246.33 ± 24.15
10	288.00 ± 18.39	262.50 ± 17.69	267.75 ± 15.61	259.17 ± 24.97
15	305.67 ± 21.02	281.92 ± 20.29	283.58 ± 15.92	275.17 ± 29.34
20	358.92 ± 24.95	325.58 ± 29.06	303.33 ± 37.38	282.92 ± 41.45



Anexas

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 – FONE E FAX (014) 6802-61432202

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 220 , sobre o projeto de pesquisa intitulado “Avaliação dos mecanismos de ação interceptiva e/ou embriotóxica do extrato aquoso de *Coleus barbatus* B (boldo) administrado a rata prenhez no período de pré implantação”, sob a responsabilidade de Cláudia Maria Dominguês Alvarenga, com a orientação da Profª Drª Ione Pellegatti Lemonica, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Botucatu, em 24 de setembro de 2001


p/ Prof. Dr. Antero Frederico M. Miranda
Presidente


Alberto Santos Capelluppi
Secretário

unesp

DIVISÃO TÉCNICA ACADÊMICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTACÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Seção de Pós-Graduação

Fls.
Proc.
Rub.

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18.618-970 - PABX (0xx14) 3811-8022

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Avaliação dos mecanismos de ação interceptiva e/ou embriotóxica do extrato aquoso de *Coleus barbatus* B. (boldo) administrado a ratas prenhes no período de pré-implantação",

aprovado pelo CEP em 24/09/2001, teve seu título alterado para "Avaliação dos mecanismos de ação interceptiva e/ou embriotóxica do extrato aquoso de *Plectranthus barbatus* Andr. (boldo-brasileiro) administrado a ratas prenhes no período de pré-implantação", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

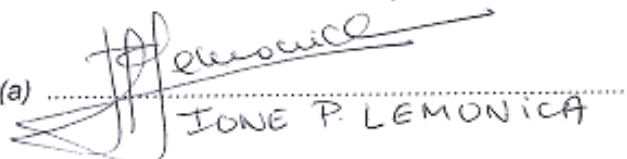
A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Tese de Doutorado.

Botucatu, 24/07/2006

Nome/Assinatura do(a) aluno(a)



Nome/Assinatura do(a) orientador (a)



Programa de Pós Graduação em PATOLOGIA