UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

THIAGO FELIX DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* TRATADOS COM IANGAMBINA

RECIFE
2021

THIAGO FELIX DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* TRATADOS COM IANGAMBINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfotecnologia.

Orientadora: Prof.ª Dra. Eliete Cavalcanti da Silva
Coorientadora: Prof.ª Dra. Marta Gerusa Soares de Lucena

RECIFE

2021

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Thiago Felix da
Caracterização morfológica de embriões de *Gallus gallus domesticus* tratados com iangambina / Thiago Felix da Silva - 2021.
76 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Eliete Cavalcanti da Silva
Coorientadora: Marta Gerusa Soares de Lucena
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. Plantas medicinais 2. Lignana 3. Embriotoxicidade
I. Silva, Eliete Cavalcanti da (Orientadora) II. Lucena, Marta Gerusa Soares de (Coorientadora) III.Título

615.3 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2021-338

THIAGO FELIX DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* TRATADOS COM IANGAMBINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 30/03/2021

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Dra. Paloma Lys de Medeiros
(Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Camilla Vila Nova Soares Silva
(Examinadora externa)
Secretaria de Saúde do Recife

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas ao longo da minha vida pessoal e acadêmica, pela sua proteção diária e pelo livramento em todos os caminhos que percorro, principalmente durante a noite.

A minha mãe, Maria Ana Felix, pelo incentivo acadêmico e por cuidar tão bem da minha rotina.

Ao meu pai, Antonio Gomes (*in memorian*), pelo apoio e incentivo na minha vida pessoal e acadêmica.

A minha avó materna, Maria José, por cuidar tão bem da minha alimentação diariamente.

A minha orientadora, Profa. Dra. Eliete Cavalcanti, pelas suas contribuições a minha vida acadêmica desde a graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas e por viabilizar a execução de toda esta pesquisa de mestrado.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Marta Gerusa, pela sua disponibilidade em contribuir para a realização de cada etapa desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB pelo fornecimento da iangambina.

A Profa. Dra. Sônia Leite, idealizadora do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da UFPE, por cativar seus alunos com a sua trajetória de vida pessoal e profissional.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da UFPE, pela dedicação nas aulas teóricas, práticas e de campo.

A banca examinadora da qualificação, composta pelas Professoras: Dra. Luciana Maia, Dra. Isvânia Lopes e Dra. Camilla Vila Nova, pelas contribuições na correção da parte escrita desta pesquisa.

A minha turma do Mestrado em Morfotecnologia da UFPE, pelas trocas de conhecimento acadêmico e por todos os momentos de descontração.

A Eliane Bandeira, técnica do Laboratório de Cultura de Tecidos, por todas as dicas referentes à rotina do laboratório de pesquisa e pela sua contribuição na preparação do tampão fosfato salino (PBS).

A Silvania Tavares Paz, técnica do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia da UFPE, pela sua contribuição no processo de emblocamento dos embriões.

A Dra. Sandrine Arruda, técnica do Laboratório de Histotécnica do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE, pela sua contribuição no procedimento de confecção das preparações dos embriões.

A Maria Isabel Castro, pelos conhecimentos compartilhados acerca da iangambina e pela sua contribuição na análise estatística.

A Fábio Brito, por compartilhar todo o seu conhecimento referente ao manejo dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, desde a incubação dos ovos fertilizados até a confecção das preparações embriológicas.

Aos membros do grupo de pesquisa *Gallus gallus domesticus* do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFPE: Beathryz Guimarães, Alcilane Carvalho, Hana Pedrosa, André Santana, Ranielle Pimentel, Larissa Magalhães e Marina Guimarães pelas contribuições durante o manejo dos embriões.

Ao Dr. Thiago Araújo, por compartilhar seus conhecimentos referentes à área de Ciências Morfológicas, por contribuir no manejo dos embriões e por deixar a rotina do laboratório mais descontraída.

A Paloma Maria, Jucielma Lima, Rayanne Vasconcelos, Luzia Abílio, Mayara Lopes e Luana Leite, ambas presentes em minha vida desde a graduação, pelo apoio motivacional durante a execução desta pesquisa.

A Josevan Souza, pelas trocas de experiências de vida e pelo apoio motivacional, de forma presencial ou remota, durante a realização desta pesquisa.

A empresa G3 Agroavícola, por fornecer gentilmente todos os ovos fertilizados utilizados nesta pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste mestrado.

Vento que leva a gente
Vento que vem do mar
Vento que sopra quente na areia
Vento que me leva.
Vem da brisa que a onda leva
Se chegou não vai voltar
Vem do gosto do mistério
Que o corpo avança
Pelo denso mar.
(SAMICO, 2019)

RESUMO

A espécie *Ocotea duckei* Vattimo-Gil é uma planta medicinal arbórea que possui como principal metabólito secundário a iangambina, uma lignana que apresenta atividades biológicas, tais como: ação anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória e leishmanicida. Com a ausência de relatos sobre possíveis efeitos embriotóxicos, esse trabalho teve por objetivo avaliar a ação da iangambina sobre a morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*, com ênfase no sistema nervoso central. Foram utilizados 225 ovos fertilizados, sendo 165 destinados à técnica de montagem total e 60 para os cortes transversais. O experimento foi dividido em três grupos: G1 (PBS pH 7,0 + 0,1% Tween 80), G2 (50 µg/ml iangambina) e G3 (65 µg/ml iangambina), sendo injetados em cada ovo 100 µL das respectivas soluções. Os ovos fertilizados foram colocados em uma incubadora a uma temperatura de aproximadamente 37,5ºC por 24, 30 e 48 horas e após esse período foram abertos e tiveram os seus embriões removidos e processados histologicamente. Foram identificadas variações comuns de estádios nos diferentes tempos de incubação. Em todos os grupos, a análise morfológica, realizada através da montagem total, revelou que na região cefálica houve o fechamento do neuróporo anterior, as vesículas ópticas tiveram um desenvolvimento normal e não foram identificadas malformações nas vesículas encefálicas primárias e secundárias. Na região caudal foi observado um desenvolvimento normal do tubo neural, com somitos segmentados e regressão da linha primitiva. Os cortes transversais revelaram morfologia normal da aorta dorsal, da notocorda e do tubo neural. Além disso, a estrutura interna dos somitos foi preservada, sendo possível visualizar as delimitações entre dermátomo, miótomo e esclerótomo. Na análise estatística não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos com relação à morfometria da região cefálica e da largura do tubo neural. Independentemente das concentrações testadas a iangambina não alterou a morfogênese do sistema nervoso central em embriões de *Gallus gallus domesticus*.

Palavras-chave: plantas medicinais; lignana; embriotoxicidade; tubo neural; vesículas encefálicas.

ABSTRACT

The specie *Ocotea duckei* Vattimo-Gil is an arboreal medicinal plant whose main secondary metabolite is yangambin, a lignan that has biological activities, such as: anticonvulsant, analgesic, anti-inflammatory and leishmanicidal action. With the absence of reports on possible embryotoxic effects, this study aimed to evaluate the action of yangambin on the morphogenesis of *Gallus gallus domesticus* embryos, with emphasis on the central nervous system. A total of 225 fertilized eggs were used, 165 for the total assembly technique and 60 for the cross-sections. The experiment was divided into three groups: G1 (PBS pH 7.0 + 0.1% Tween 80), G2 (50 µg/ml yangambin) and G3 (65 µg/ml yangambin), with 100 µL of each being injected into each egg respective solutions. Fertilized eggs were placed in an incubator at a temperature of approximately 37.5ºC for 24, 30 and 48 hours and after this period they were opened and had their embryos removed and histologically processed. Common staging variations were identified at different incubation times. In all groups, the morphological analysis, performed through the total assembly, revealed that in the cephalic region there was a closure of the anterior neuropore, the optic vesicles had a normal development and no malformations were identified in the primary and secondary encephalic vesicles. In the caudal region, normal development of the neural tube was observed, with segmented somites and regression of the primitive line. Cross sections revealed normal morphology of the dorsal aorta, notochord and neural tube. In addition, the internal structure of the somites was preserved, making it possible to visualize the boundaries between dermatome, myotome and sclerotome. In the statistical analysis, no significant differences were identified between the groups regarding the morphometry of the cephalic region and the width of the neural tube. Regardless of the concentrations tested, yangambin did not alter the morphogenesis of the central nervous system in *Gallus gallus domesticus* embryos.

Keywords: medicinal plants; lignan; embryotoxicity; neural tube; brain vesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento embrionário dos vertebrados 22

Figura 2 – Desenho esquemático dos componentes do ovo de *Gallus gallus domesticus* 24

Figura 3 – Corte transversal de embrião de *Gallus gallus domesticus* durante a gastrulação. (A) Desenho esquemático demonstrando a migração das células do epiblasto através do sulco da linha primitiva para compor o mesoderma e o endoderma. (B) Micrografia eletrônica de varredura das células epiblásticas migrando para a blastocele 26

Figura 4 – Esquema das vesículas encefálicas primárias e secundárias 28

Figura 5 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* nos estádios 6 a 8 30

Figura 6 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* nos estádios 8 e 9 31

Figura 7 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* nos estádios 13, 14 e 15 32

Figura 8 – Estrutura química da Iangambina 37

Figura 9 – Preparação das concentrações da Iangambina. (A) Pesagem da Iangambina em pó em uma balança analítica. (B) Agitação da amostra no sonicador ultrassônico 39

Figura 10 – Avaliação inicial dos ovos fertilizados. (A) Pesagem dos ovos. (B) Ovos na incubadora (Marca: NELIPE) 40

Figura 11 – Procedimento de injeção das substâncias nos ovos fertilizados. (A) Utilização de agulha de insulina para injetar 100 µL das amostras na região da câmara de ar (seta). (B) Ovos selados com a identificação dos grupos experimentais 41

Figura 12 – Processamento dos ovos fertilizados. (A) Remoção da albumina com uma seringa. (B) Processo de fixação do disco embrionário (seta) com Bouin 42

Figura 13 – Procedimento de coleta dos embriões. (A) Remoção do disco embrionário com uma tesoura de ponta fina. (B) Remoção do excesso de vitelo com um pincel em água destilada 42

Figura 14 – Etapas da técnica de montagem total de embriões de *Gallus gallus domesticus* 43
Figura 15 – Etapas do corte transversal dos embriões de *Gallus gallus domesticus*. (A) Esquadro de Leuckart com um embrião (seta) imerso em parafina. (B) Blocos de parafina finalizados. (C) Micrótomo, banho histológico e chapa aquecedora, respectivamente 45
Figura 16 – Captura das fotomicrografias dos embriões de *Gallus gallus domesticus*. Utilização de câmera acoplada ao microscópio (seta) e o *Software MOTIC Image Plus 2.0* 46
Figura 17 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* para demonstrar o procedimento da análise morfométrica. (A) Fotomicrografia da região cefálica; nota-se uma linha reta partindo do diencéfalo (D) até a outra extremidade da região cefálica, passando pela vesícula óptica indicada pela seta. (B) Fotomicrografia do tubo neural indicando os pares de somitos: 9º, 11º e 13º. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x 47
Figura 18 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 24 horas. G1: estádios 7 (A-A1) e 8 (B-B1). G2: estádios 6 (C-C1) e 8 (D-D1). G3: estádios 7 (E-E1) e 8 (F-F1). Somitos (s). Tubo neural (tn). A seta indica o nó de Hensen. Coloração hematoxilina. (A-F) Aumento de 40x. (A1-F1) Aumento de 100x 50
Figura 19 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 30 horas. G1: estádios 8 (A) e 9 (B). G2: estádios 8 (C) e 9 (D). G3: estádios 8 (E) e 9 (F). Somitos (s). Tubo neural (tn). A seta indica o nó de Hensen. Coloração hematoxilina. Aumento de 40x 52
Figura 20 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 48 horas. G1: estádios 13 (A), 14 (B) e 15 (C). G2: estádios 13 (D), 14 (E) e 15 (F). G3: estádios 13 (G), 14 (H) e 15 (I). Coração (c). Somitos (s). Tubo neural (tn). Vesícula óptica (seta). Coloração hematoxilina. Aumento de 40x 54

Figura 21 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 24 horas, no estádio 8, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) nota-se o neuróporo anterior (np) aberto, correspondendo a morfologia esperada para o referido estádio. Na região caudal do tubo neural (tn) (B, D e F) são evidenciados 4 pares de somitos (s) segmentados (B) e em processo de segmentação (D e F), sendo ambas características consideradas dentro da normalidade. A seta indica o nó de Hensen, localizado mais próximo da região caudal do embrião, demonstrando que houve regressão da linha primitiva em todos os grupos. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x 56

Figura 22 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 30 horas, no estádio 9, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) nota-se que o neuróporo anterior (np) iniciou o seu fechamento; é possível observar que o tubo neural expandiu-se em três vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo (p), mesencéfalo (m) e rombencéfalo (r) que apresentam morfologia normal, não diferindo entre os grupos; as vesículas ópticas (*) encontram-se projetadas lateralmente ao prosencéfalo. Na região caudal do embrião (B, D e F) os somitos encontram-se segmentados e o tubo neural (tn) não possui malformações. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x 58

Figura 23 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 48 horas, no estádio 14, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) nota-se a presença das vesículas encefálicas secundárias: telencéfalo (t), diencéfalo (d), mesencéfalo (me), metencéfalo (mt) e mielencéfalo (mi) que apresentam morfologia normal em ambos os grupos; também podem ser visualizadas as vesículas ópticas indicadas pela seta. Na região caudal do embrião (B, D e F) os somitos (s) encontram-se segmentados e o tubo neural

(tn) não possui malformações. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x 60

Figura 24 – Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de corte transversal, incubados por 48 horas, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Em (A, C e E) podem ser visualizados os folhetos embrionários: ectoderma (ect) e endoderma (end), e o somito (s) em processo de diferenciação com morfologia normal, e a aorta dorsal (ad) em processo de formação. Em (B, D e F) nota-se o teto e o assoalho do tubo neural (tn) com espessura delgada; a notocorda (n) apresenta uma delimitação normal; também é possível visualizar o somito dividido em dermátomo (de), miótomo (mio) e esclerótomo (es). Coloração hematoxilina - eosina. (A, C e E) Aumento de 100x. (B, D e F) Aumento de 400x 62

Figura 25 – Análise estatística da morfometria do tubo neural e da região cefálica dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, incubados por 48 horas, no estádio 14. Em A, B e C são observadas as medidas da largura do tubo neural na altura do 9º, 11º e 13º par de somitos, respectivamente. Em D são observadas as medidas da região cefálica. Desvio padrão (*) 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos embriões de *Gallus gallus domesticus* com aproximadamente 24h por estádio de desenvolvimento 30

Tabela 2 – Características dos embriões de *Gallus gallus domesticus* com aproximadamente 30h por estádio de desenvolvimento 31

Tabela 3 – Características dos embriões de *Gallus gallus domesticus* com aproximadamente 48h por estádio de desenvolvimento 32

Tabela 4 – Quantidade de ovos utilizados por grupo experimental para a técnica de montagem total 41

Tabela 5 – Estadiamento de embriões de *Gallus gallus domesticus* em percentuais dos diferentes grupos experimentais, com 24 horas de desenvolvimento, segundo Hamburger e Hamilton (1951) 49

Tabela 6 – Estadiamento de embriões de *Gallus gallus domesticus* em percentuais dos diferentes grupos experimentais, com 30 horas de desenvolvimento, segundo Hamburger e Hamilton (1951) 51

Tabela 7 – Estadiamento de embriões de *Gallus gallus domesticus* em percentuais dos diferentes grupos experimentais, com 48 horas de desenvolvimento, segundo Hamburger e Hamilton (1951) 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ad.	Aorta dorsal
ANOVA	Análise de Variância
c.	Coração
CB	Centro de Biociências
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
d.	Diencéfalo
de.	Dermátomo
ect.	Ectoderma
end.	Endoderma
es.	Esclerótomo
G1	Grupo 1 (PBS pH 7,0 + 0,1% Tween 80)
G2	Grupo 2 (50µg/ml Iangambina)
G3	Grupo 3 (65µg/ml Iangambina)
IC50	Concentração Inibitória Média
LCT	Laboratório de Cultura de Tecidos
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
m./me.	Mesencéfalo
mt	Metencéfalo
mi.	Miencéfalo
mio.	Miótomo
n.º	Número
np.	Neuróporo
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.	Prosencéfalo
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PE	Pernambuco
r.	Rombencéfalo

Rod.	Rodovia
s.	Somito
t.	Telencéfalo
tn.	Tubo neural
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
vs.	Versus

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**18**
2	**OBJETIVOS**	**21**
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	**REVISÃO DE LITERATURA**	**22**
3.1	EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* COMO MODELO EXPERIMENTAL	22
3.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO OVO DE *Gallus gallus domesticus*	23
3.3	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DA ESPÉCIE *Gallus gallus domesticus*	24
3.4	DETERMINAÇÃO DO ESTÁDIO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus domesticus*	30
3.5	EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* COMO MODELO PARA TESTES DE EMBRIOTOXICIDADE	34
3.6	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	34
3.7	CARACTERÍSTICAS DA LIGNANA IANGAMBINA	36
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**	**38**
4.1	COMISSÃO DE ÉTICA	38
4.2	AQUISIÇÃO DOS OVOS FERTILIZADOS	38
4.3	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	38
4.4	AQUISIÇÃO DA IANGAMBINA	38
4.5	PREPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DA IANGAMBINA	39
4.6	GRUPO EXPERIMENTAL	39
4.6.1	**Grupo experimental para a técnica de montagem total**	**40**
4.7	PROCESSAMENTO DOS OVOS FERTILIZADOS	41
4.8	PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO	43
4.8.1	**Técnica de montagem total**	**43**
4.8.2	**Técnica de corte transversal**	**44**

4.9 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA 45
4.10 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA 46
4.11 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA 47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 48
5.1 ESTADIAMENTO DOS EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* 49
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* 55
5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* 63
6 CONCLUSÃO 65
REFERÊNCIAS 66
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE: OFÍCIO N.º 37/18 76

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como recurso terapêutico se faz presente na história da humanidade antes mesmo da invenção de qualquer forma de escrita. Esta prática que ocorre há milênios é frequentemente observada na medicina popular em diversas regiões do globo terrestre (ROCHA et al., 2015). Ao longo dos séculos, as informações sobre os benefícios da flora tanto na profilaxia como também no tratamento de diversas enfermidades foram transmitidas de maneira informal entre as gerações. Esse conhecimento empírico, difundido primordialmente através da oralidade, foi essencial para desencadear inúmeras pesquisas científicas que comprovassem a eficácia de tais práticas terapêuticas (SILVA; SANTOS, 2019).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 60 a 80% da população em escala global utiliza técnicas da medicina popular nos cuidados básicos de saúde e, desta parcela, cerca de 85% das pessoas utilizam plantas e seus derivados como recurso terapêutico (VERRI; MOURA; MOURA, 2017). Isso ocorre principalmente em regiões de vulnerabilidade social, onde os atendimentos na área da saúde se encontram em situação precária e a população dispõe de poucos recursos econômicos (PAULERT et al., 2014).

O alto índice de aceitação no uso de espécies vegetais para o tratamento de enfermidades se deve ao fato das plantas serem consideradas como medicamentos seguros e eficazes, além disso, apresentam menos efeitos colaterais e são de baixo custo (ULLAH, et al. 2020). Tradicionalmente esses medicamentos naturais são administrados por via oral como extratos brutos. Contudo, esta forma de utilização é preocupante em relação à segurança e a eficácia do tratamento, uma vez que os extratos contêm inúmeros compostos e a variação na porcentagem de cada substância pode reduzir os efeitos esperados (BARONE et al., 2019).

As plantas produzem substâncias, denominadas de metabólitos secundários, que não participam diretamente no seu crescimento e desenvolvimento e são divididas em: terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (BEZERRA et al., 2019). As funções desses metabólitos para o organismo vegetal são diversas e incluem atração de polinizadores e dispersores, defesa contra herbívoros e patógenos e proteção contra radiação ultravioleta. Além disso, também atuam como alelopáticos, interferindo no crescimento de outras plantas (BIRCHFIELD; MCINTOSH, 2020). A taxa de produção desses compostos pode sofrer variação devido a alguns fatores como disponibilidade hídrica e de nutrientes do solo, poluição atmosférica e temperatura (ATANASOV et al., 2015).

Os metabólitos secundários apresentam distribuição limitada na natureza, sendo a sua expressão individualizada em cada espécie vegetal (MUHAMMAD et al., 2020). O caráter medicinal das plantas está diretamente relacionado a esses produtos naturais, pois os mesmos representam uma importante fonte de novas moléculas bioativas, as quais, quando isoladas, podem ter seus efeitos biológicos investigados em diversos modelos experimentais (BOY et al., 2018).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, sendo considerado também o país que apresenta a maior taxa de endemismo, possuindo cerca de 20% do total de espécies descritas do planeta. O país também abriga cerca de 22% da flora mundial, o que equivale a um número superior a 55 mil espécies catalogadas. Essa ampla biodiversidade demonstra que o Brasil tem uma rica fonte de inúmeros produtos naturais que necessitam de investigações físico-químicas e biológicas, pois servem como matéria-prima para a indústria farmacêutica (FORZZA et al., 2012; ZAPPI et al., 2015).

Atualmente, mais de 50% dos medicamentos desenvolvidos e comercializados derivam direta ou indiretamente de produtos naturais e isso reflete na importância das pesquisas com as espécies da flora brasileira (WANG, et al., 2020).

A iangambina, uma lignana furofurânica, é o metabólito secundário predominante nas folhas e cascas do caule da planta medicinal arbórea *Ocotea duckei* Vattimo-Gil, espécie comumente encontrada nos estados do nordeste brasileiro (BARBOSA-FILHO et al., 1999; ANTONIO; VEIGA-JUNIOR; WIEDEMANN, 2020). Diversas atividades biológicas são atribuídas a iangambina, como indução de apoptose em células tumorais (HAUSOTT; GREGER; MARIAN, 2003), atividade anti-inflamatória (KIM et al., 2009), atividade analgésica (ALMEIDA; PACHÚ; BARBOSA-FILHO, 1995) e atividade anti-leishmania (MONTE-NETO et al., 2011).

No entanto, apesar dos estudos com plantas medicinais demonstrarem inúmeras atividades biológicas, também é necessário realizar testes de toxicidade, principalmente com os produtos naturais isolados. Esses testes buscam identificar os efeitos decorrentes da interação entre os compostos e o organismo, visando identificar as margens de segurança para que estas substâncias não provoquem efeitos deletérios (DUTRA et al., 2016).

Embriões da espécie *Gallus gallus domesticus* (galinha doméstica) são utilizados em pesquisas relacionadas a biologia do desenvolvimento, tanto para estudos de embriologia comparada como também em investigações de embriotoxicidade de diversas substâncias (YAMAMOTO et al., 2012; HUTCHINS; BRONNER, 2019). Isso se deve ao fato de apresentarem semelhanças morfológicas com embriões de outros grupos de vertebrados e por

serem sensíveis a ação de agentes químicos, principalmente no início do seu desenvolvimento, onde ocorre intensa proliferação celular (KMECICK et al., 2019). Além do baixo custo, a facilidade de manejo e o rápido desenvolvimento são atrativos que tornam esta espécie um modelo viável em diversos campos de pesquisa (VANCAMP; DARRAS, 2017; KOHL et al., 2019).

Em vista disso, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da iangambina sobre a morfogênese do sistema nervoso dos embriões de *Gallus gallus domesticus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da iangambina sobre a morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus* com ênfase no sistema nervoso central.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

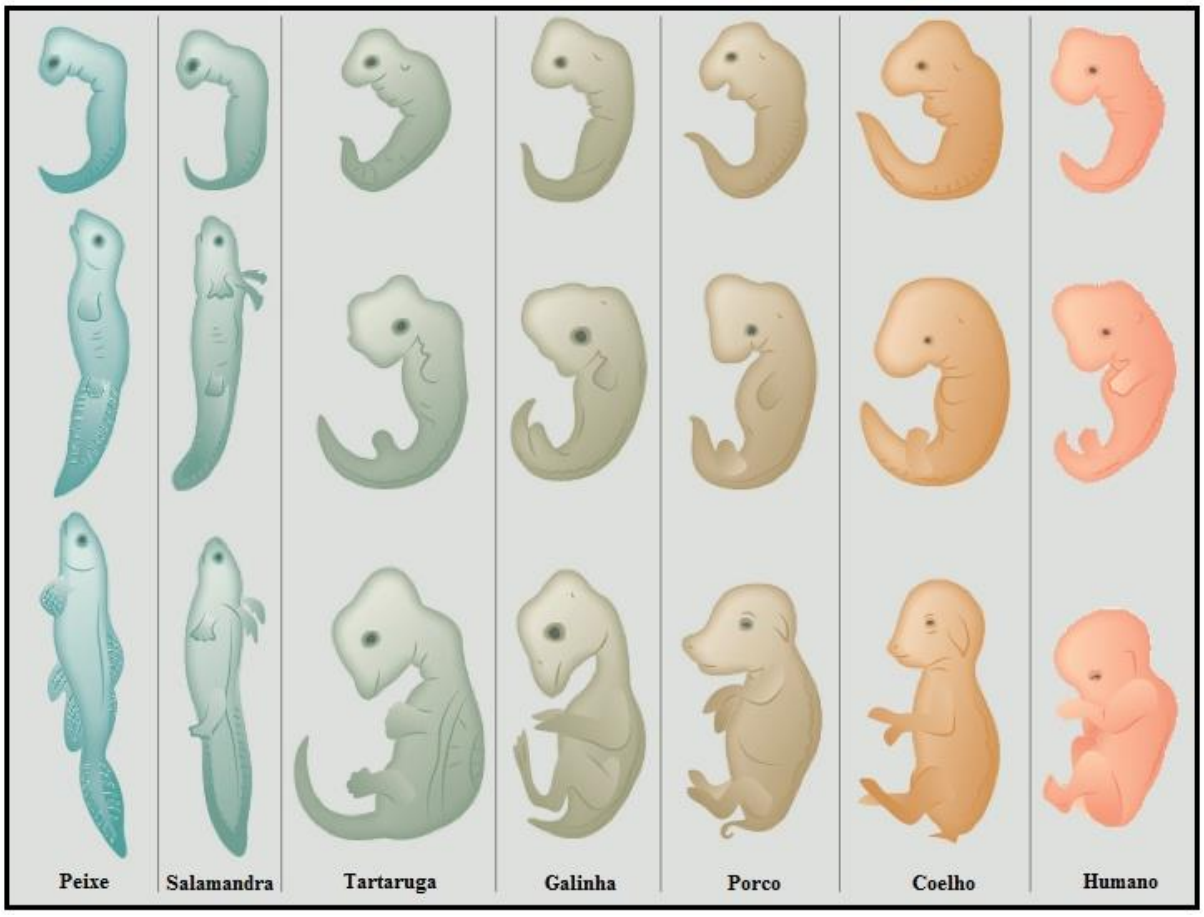
- Determinar o estadiamento dos embriões de *Gallus gallus domesticus* expostos a iangambina, de acordo com Hamburger e Hamilton (1951);
- Analisar a morfologia do sistema nervoso central em desenvolvimento dos embriões de *Gallus gallus domesticus* expostos a iangambina, isolada das folhas da *Ocotea duckei* Vattimo-Gil, nas concentrações de 50 e 65 μg/ml, incubados por 24, 30 e 48 horas;
- Realizar a análise morfométrica das estruturas do sistema nervoso (região cefálica e tubo neural) de embriões de *Gallus gallus domesticus* sobre o efeito da iangambina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* COMO MODELO EXPERIMENTAL

Os embriões de aves apresentam no início do seu desenvolvimento uma complexidade morfológica semelhante a de outros grupos de vertebrados, como peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (Figura 1**)** (GILBERT; BARRESI, 2019). O subfilo Vertebrata, que integra todos esses táxons, possui algumas características essenciais, provenientes das etapas de gastrulação e neurulação, como a presença de notocorda, coração ventral, bolsas faríngeas com arcos aórticos, sistema nervoso dorsal e cauda pós-anal, que permitem a realização de estudos comparativos entre diferentes espécies devido à similaridade dessas estruturas em desenvolvimento (HICKMAN et al., 2016).

Figura 1. Desenvolvimento embrionário dos vertebrados.



Fonte: http://phhsbiology.weebly.com/darwin.html (Adaptado).

Na classe das aves, a espécie *Gallus gallus domesticus*, conhecida popularmente por galo (macho) ou galinha (fêmea), é uma das mais utilizadas em pesquisas envolvendo a fase

embrionária de desenvolvimento, tanto para estudos de embriologia comparada, como também para testes envolvendo xenobióticos devido a sua sensibilidade (YAMAMOTO et al., 2012; HUTCHINS; BRONNER, 2019).

A comparação entre os embriões desta espécie e os embriões humanos pode ser realizada até o surgimento de estruturas embrionárias características do segundo mês gestacional intrauterino. O início da clivagem nas aves ocorre três horas após a fecundação, enquanto nos humanos esse mesmo evento acontece 24 horas após a fertilização. Até o terceiro dia de incubação os ovos fertilizados de aves estão formando estruturas como somitos, cérebro, ouvidos, olhos e os componentes do sistema vascular, portanto, equivalendo aos fenômenos que ocorrem entre a terceira e a quarta semanas de gestação humana. O quarto dia de incubação corresponde ao segundo mês do desenvolvimento humano e a partir de então cada espécie apresenta as suas especificidades, impossibilitando as correlações entre as suas estruturas morfológicas (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

Embriões de *Gallus gallus domesticus* apresentam as etapas de sua ontogênese bem documentadas por Hamburger e Hamilton (1951). Esses embriões como modelo experimental possuem algumas vantagens que incluem: baixo custo de obtenção, facilidade de manejo, tempo total de desenvolvimento relativamente curto (21 dias) e o fato do embrião se desenvolver fora do organismo materno, o que possibilita um acompanhamento diário (LØTVEDT; JENSEN, 2014; GILBERT; BARRESI, 2019).

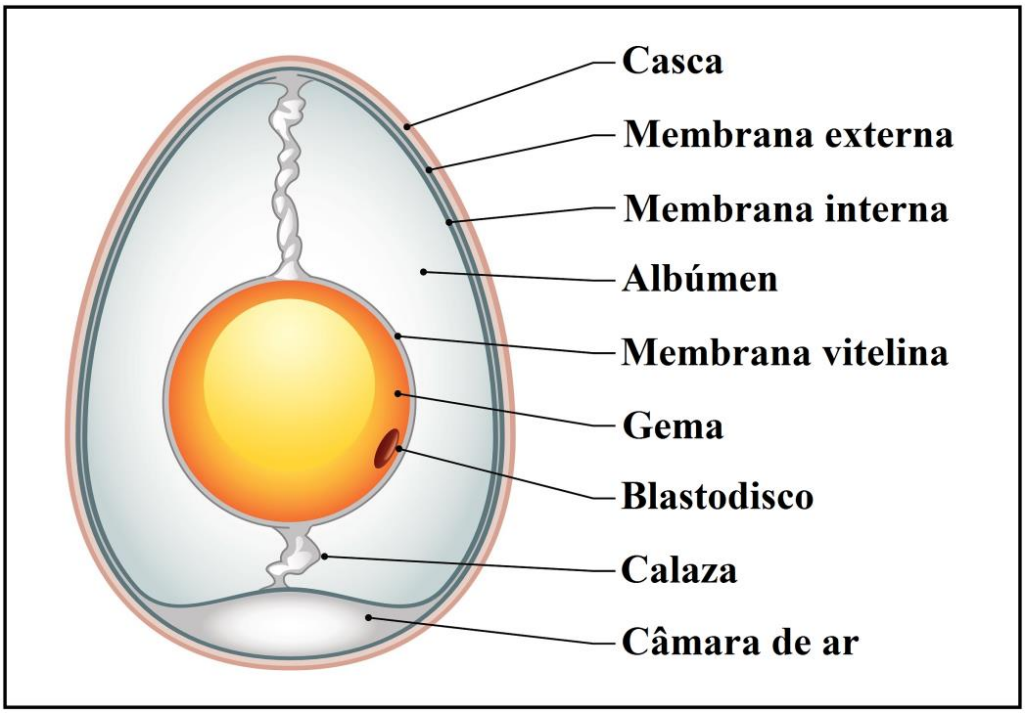
Comparados aos mamíferos placentários, os testes com aves apresentam o fator positivo de não haver a necessidade de eutanásia materna, o que torna a pesquisa eticamente mais aceita (KOHL et al., 2019).

3.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO OVO DE *Gallus gallus domesticus*

As aves apresentam ovos do tipo telolécito, sendo estes caracterizados por possuírem uma quantidade de vitelo que ocupa grande parte da célula, e que fornecem os componentes imprescindíveis para o desenvolvimento do embrião (GILBERT; BARRESI, 2019). O ovo da espécie *Gallus gallus domesticus* (Figura 2) tem o peso médio de 60g e apresenta três principais componentes: a casca (10%), a gema (30%) e o albúmen (60%), que representa a maior porcentagem de sua estrutura total (VARELIS; MELTON; SHAHIDI, 2019). Em menor proporção estão as outras partes, que incluem: cutícula, membranas da casca, membrana vitelina, câmara de ar, calazas e o disco germinativo (YIN et al., 2020). Cada uma

dessas regiões possui uma diversidade de nutrientes, além de moléculas responsáveis pela proteção física (casca e suas membranas) e química (moléculas antivirais, antibacterianas e antioxidantes) que são essenciais para a embriogênese da ave (NYS; GUYOT, 2011; VARELIS; MELTON; SHAHIDI, 2019).

Figura 2. Desenho esquemático dos componentes do ovo de *Gallus gallus domesticus*.



Fonte: https://media.gettyimages.com/vectors/chicken-egg-anatomy-vector-id475307062?s=2048x2048 (Adaptado).

3.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DA ESPÉCIE *Gallus gallus domesticus*

Na espécie *Gallus gallus domesticus* o início da formação das estruturas embrionárias antecede a postura do ovo, porém a continuidade do desenvolvimento será bem-sucedida apenas em condições favoráveis que estão diretamente relacionadas ao ambiente (natural ou experimental) e incluem a manutenção de umidade, oxigenação e temperatura (BOLIN; DUBANSKY; BURGGREN, 2017; WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019). No oviduto da galinha, o desenvolvimento embrionário inicia com temperatura de aproximadamente 40 a 41ºC e após a postura a incubação é realizada em 37ºC, sendo esta temperatura considerada a mais adequada até a eclosão (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; RUFF et al., 2020).

A fertilização da gema (ovócito) ocorre no infundíbulo, primeiro segmento do oviduto, e cerca de três horas após esse evento é iniciado o processo de clivagem na região do istmo.

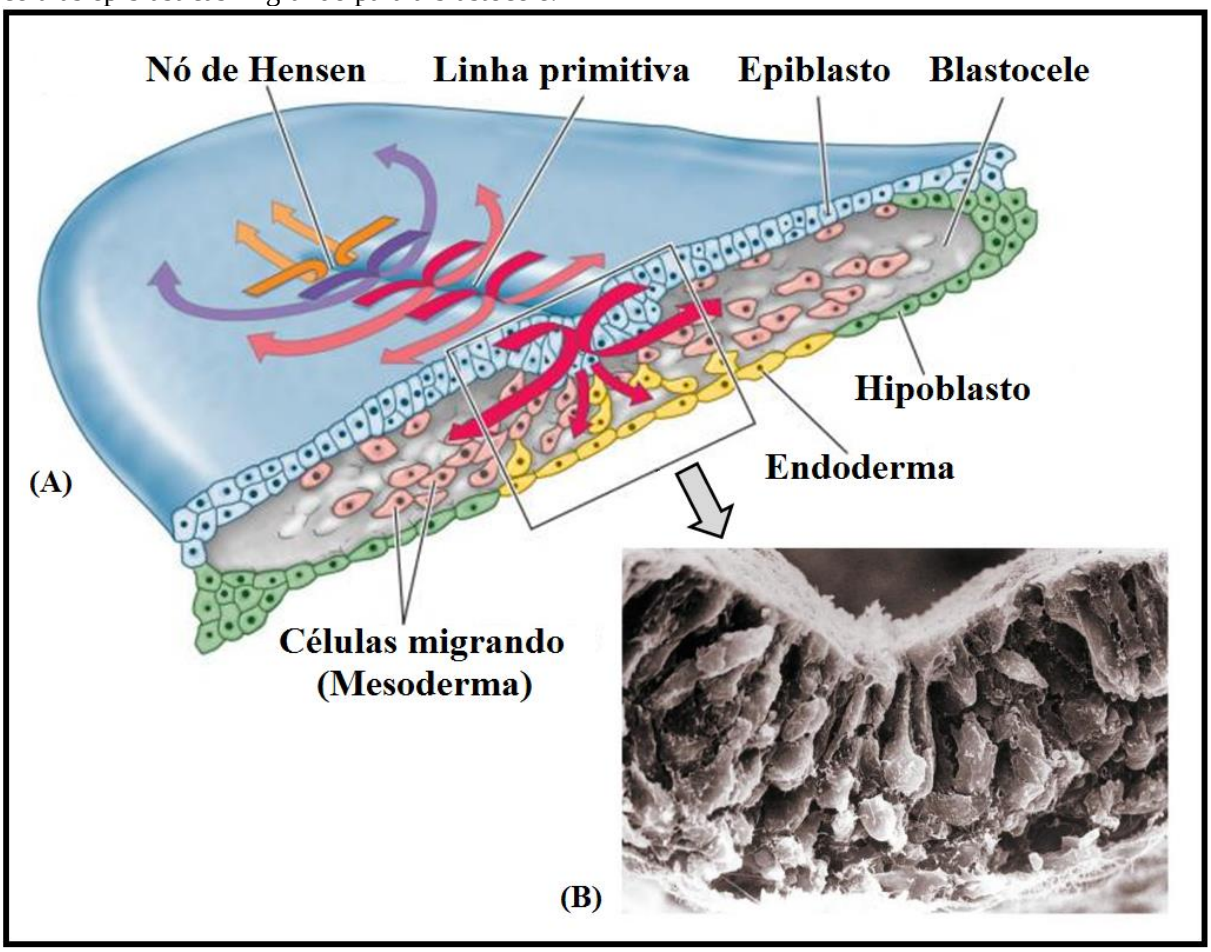
Essa clivagem é do tipo meroblástica discoidal, pois ocorre apenas no citoplasma ativo localizado no polo animal do ovo, e os sulcos formados não penetram a massa de vitelo. As sucessivas clivagens resultam em um disco com cinco ou seis camadas de células denominado blastoderma (GILBERT; BARRESI, 2019).

Com isso, as células que constituem o blastoderma absorvem água proveniente do albúmen e secretam líquidos entre elas e o vitelo, formando assim um espaço denominado de cavidade subgerminal (AMINI et al., 2017). A região central do blastoderma, por não possuir aderência ao vitelo, torna-se translúcida sendo, portanto, denominada de zona pelúcida. A região periférica, onde as células (blastômeros) não se separam do vitelo em profundidade apresenta um aspecto mais denso sendo, portanto, denominada de zona opaca (GARCIA; FERNANDEZ, 2012).

A maioria das células da zona pelúcida permanece na superfície, originando uma camada denominada epiblasto e as demais células migram no sentido da cavidade subgerminal, compondo uma camada inferior: o hipoblasto. Entre essas duas camadas há uma cavidade, denominada de blastocele, que é preenchida por células durante a gastrulação (POKHREL et al., 2017). O epiblasto origina os três folhetos germinativos do embrião e algumas membranas extraembrionárias (âmnio, cório e alantoide), e o hipoblasto compõe o saco vitelino e o pedúnculo, que conecta o vitelo ao endoderma do tubo digestório do embrião. No momento da postura o blastoderma é constituído por aproximadamente 40.000 a 60.000 células (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; GILBERT; BARRESI, 2019).

A gastrulação, que representa um período de intensa proliferação e migração celular, inicia entre 6 e 7 horas de incubação, tendo como primeiro evento a formação da linha primitiva. Essa linha é caracterizada como um espessamento da camada de células na linha média do epiblasto e é precursora do eixo anteroposterior do embrião (VERMILLION et al., 2018). Com cerca de 18 horas de incubação, a linha primitiva atinge o seu máximo alongamento e as células do seu interior perdem adesão formando o sulco primitivo, uma depressão através da qual as células do epiblasto migram para o interior da blastocele e compõem o mesoderma e o endoderma (Figura 3). Na extremidade anterior da linha primitiva é observado um espessamento de células, denominado de nó de Hensen, que possui um orifício denominado de fosseta primitiva, através do qual as células migram para formar a notocorda e contribuem para a formação dos somitos (GILBERT; BARRESI, 2019).

Figura 3. Corte transversal de embrião de *Gallus gallus domesticus* durante a gastrulação. (A) Desenho esquemático demonstrando a migração das células do epiblasto através do sulco da linha primitiva para compor o mesoderma e o endoderma. (B) Micrografia eletrônica de varredura das células epiblásticas migrando para a blastocele.



Fonte: Adaptado de GILBERT e BARRESI (2019).

Após 20 horas de incubação, tem início a regressão da linha primitiva e consequentemente o nó de Hensen é movido para uma região posterior. Essa regressão contribui para a formação da notocorda, que corresponde a um tubo em forma de bastão com células preenchidas de fluido, envolvidas de uma bainha fibrosa que se estende ventralmente ao sistema nervoso central (HICKMAN et al., 2016). Ao final da gastrulação estão estabelecidos os três folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma. O ectoderma, folheto mais externo, origina principalmente o sistema nervoso e a epiderme. O mesoderma, folheto intermediário, forma o tecido conjuntivo, sangue, coração, rins e o sistema musculoesquelético. O endoderma, folheto mais interno, compõe o epitélio dos tratos digestório e respiratório, incluindo órgãos como o fígado e os pulmões (WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019).

Simultaneamente à regressão da linha primitiva, ocorre a neurulação, que corresponde ao início da formação do sistema nervoso. A notocorda e o mesoderma paraxial induzem o

ectoderma, na região anterior do embrião, a passar por um espessamento que origina a placa neural. A região da linha média dessa placa neural sofre uma invaginação, formando assim o sulco neural e as pregas neurais, que começam a se fundir com 26 horas de incubação com o intuito de formar o tubo neural (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; JIAO et al., 2019).

De maneira concomitante aos eventos da neurulação, com aproximadamente 20 horas de incubação, a região do mesoderma paraxial sofre um processo de segmentação que origina os somitos. Cada par de somitos é formado progressivamente, em intervalos de 90 minutos, no sentido anteroposterior do embrião e organizados longitudinalmente ao lado da notocorda e do tubo neural. As células dos somitos recém-formados são organizadas de forma aleatória, no entanto com a maturação dos somitos, são identificadas três regiões distintas: o escletómo, o dermátomo e o miótomo (GILBERT; BARRESI, 2019).

O esclerótomo, posicionado mais ventralmente, possui células com características mesenquimais que envolvem a notocorda e posteriormente originam as costelas, as vértebras e os discos intervertebrais da coluna vertebral (MATSUTANI; IKEGAMI; AOYAMA, 2019). O dermátomo, parte dorsolateral do somito, possui seus limites definidos com células de características epiteliais que contribuem para a formação da derme. O miótomo, parte dorsomedial do somito, posicionado entre o dermátomo e o esclerótomo, possui células que sofrem um crescimento mais extensivo e que originam a musculatura das costas, a caixa torácica e a parede ventral do corpo (GILBERT; BARRESI, 2019; WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019).

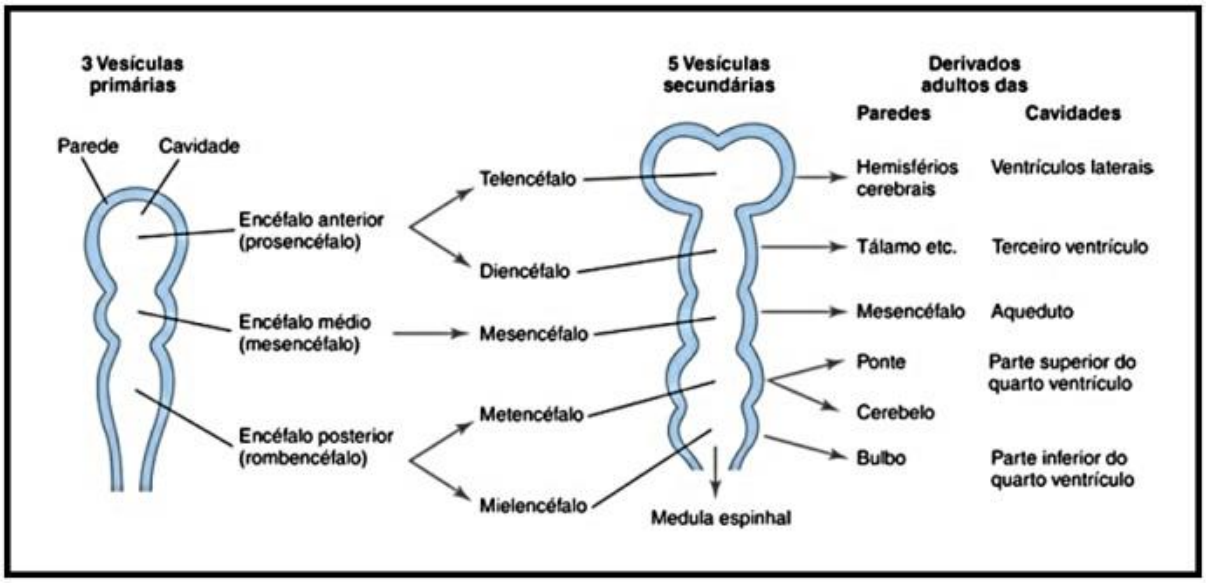
No período entre 25 e 33 horas, tem início a formação do primeiro sistema do embrião: o cardiovascular, sendo este composto pelo coração e pelo sistema vascular, que derivam do mesoderma embrionário e do saco vitelino extraembrionário (WANG et al., 2015). A partir do mesoderma, dois grupos de células mesodérmicas pré-cardíacas, guiadas pelo endoderma subjacente, migram para cada lado do intestino e sofrem diferenciação, originando um simples tubo cardíaco emparelhado na cavidade pericárdica. Com aproximadamente 37 horas de incubação os primeiros batimentos cardíacos são perceptíveis (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; HICKMAN et al., 2016).

Com cerca de 27 horas de incubação a região anterior do tubo neural apresenta-se mais alargada com relação a região caudal. Diante disso, é possível observar que o dobramento e o fechamento do tubo neural não ocorrem de maneira simultânea ao longo de todo eixo corporal do embrião (GILBERT; BARRESI, 2019). As extremidades do tubo neural, ainda não fechadas, correspondem aos neuróporos. O neuróporo anterior é fechado com cerca de 30 a 33

horas de incubação, enquanto o neuróporo posterior sofre fechamento após 43 horas de incubação (GARCIA; FERNANDEZ, 2012).

Com aproximadamente 33 a 38 horas de incubação, o processo de alongamento e regionalização na extremidade anterior do tubo neural proporciona a formação das três vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. A partir de 38 horas de incubação estas três vesículas sofrem diferenciação e originam cinco vesículas secundárias (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; GARCIA et al., 2017). O prosencéfalo se subdivide em telencéfalo e diencéfalo, onde o primeiro constitui os hemisférios cerebrais e o segundo origina o tálamo, o hipotálamo e as vesículas ópticas. O mesencéfalo apenas aumenta de tamanho e o seu lúmen compõe o aqueduto cerebral. O rombencéfalo se subdivide em metencéfalo, que origina o cerebelo e a ponte, e em mielencéfalo que constitui o bulbo. A região posterior do tubo neural não sofre dilatação e origina a medula espinhal (Figura 4) (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; GILBERT; BARRESI, 2019).

Figura 4. Esquema das vesículas encefálicas primárias e secundárias.



Fonte: MOORE; PERSAUD; TORCHIA (2016).

Após o fechamento do tubo neural, um grupo de células migra a partir de sua porção dorsal e origina uma massa achatada irregular, denominada de crista neural, entre o tubo neural e o ectoderma (WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019). As células da crista neural, que possuem uma notável capacidade proliferativa, migram para diferentes locais do embrião e originam diversos tipos de células. Esses incluem melanócitos, neurônios periféricos, células da glia e componentes dos tecidos esqueléticos e conjuntivos da cabeça (GILBERT; BARRESI, 2019; PRASAD et al., 2020).

No período em que o embrião apresenta entre 12 e 36 pares de somitos são formados os anexos embrionários, estruturas que desempenham importantes funções vitais, como digestão e respiração, uma vez que os órgãos em desenvolvimento ainda não são completamente funcionais. O âmnio e o cório são originados pela somatopleura (ectoderma e mesoderma), enquanto que o saco vitelínico e o alantoide são formados pela esplancnopleura (endoderma e mesoderma) (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; SILVA et al., 2017).

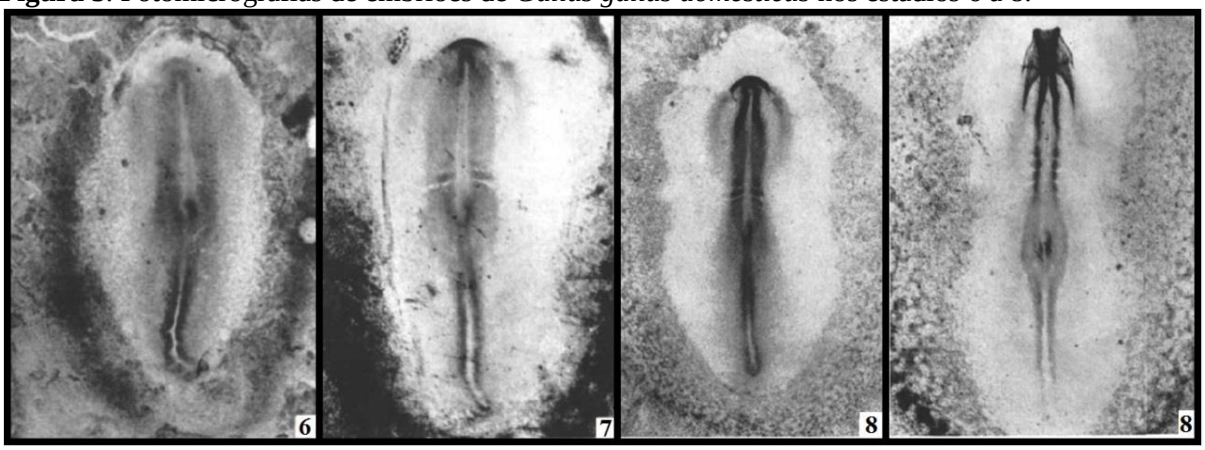
O âmnio corresponde a um fino saco membranoso, preenchido pelo líquido amniótico, que protege o embrião contra a desidratação e os choques mecânicos. O cório é a membrana extraembrionária mais externa e que fica aderida a casca viabilizando as trocas gasosas entre o ovo e o ambiente. O saco vitelínico representa o órgão nutritivo do embrião, pois permanece conectado ao intestino médio por meio de um pedúnculo, fornecendo o vitelo necessário para o completo desenvolvimento (GARCIA; FERNANDEZ, 2012). O alantoide armazena resíduos urinários e ao se fundir com o cório origina a membrana córioalantoide. Esta membrana realiza trocas gasosas e possibilita o transporte de cálcio da casca para o embrião, através dos seus vasos sanguíneos, contribuindo para a formação dos ossos e tornando a casca mais frágil para facilitar a eclosão (RIBATTI, 2017; GILBERT; BARRESI, 2019).

No terceiro dia de incubação o embrião apresenta entre 37 ou 40 pares de somitos localizados ao longo da sua região dorsal. Os membros anteriores possuem tamanho relativamente menor que os membros posteriores. A região cefálica apresenta-se grande em comparação a região caudal e a vesícula óptica demonstra uma pigmentação tênue (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; LI et al., 2019). No quarto dia de incubação, são observados os arcos faríngeos, os somitos atingem a extremidade caudal do embrião e os membros anteriores e posteriores apresentam tamanhos semelhantes. Além disso, a vesícula óptica demonstra pigmentação distinta e são evidenciadas as flexuras e a rotação do sistema nervoso central. No tempo restante de incubação o embrião cresce em tamanho e consequentemente seus órgãos internos se desenvolvem. Também ocorre a formação das estruturas características da espécie como o bico, as asas e as penas. Com 21 dias de incubação o ovo eclode e o pinto nasce (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019).

3.4 DETERMINAÇÃO DO ESTÁDIO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus domesticus*

A análise morfológica dos embriões de *Gallus gallus domesticus* segue o modelo de estadiamento, através da contagem dos pares de somitos, proposto por Hambuger e Hamilton (1951). Esse modelo de classificação permite enquadrar os embriões em estádios de desenvolvimento de acordo com as estruturas presentes como, por exemplo, somitos, tubo neural e vesículas encefálicas. Os embriões de 24h (Figura 5) podem apresentar características presentes nos estádios seis, sete e oito (Tabela 1). Os embriões de 30h (Figura 6) podem se enquadrar nos estádios oito e nove (Tabela 2) e os de 48h (Figura 7) podem apresentar a morfologia correspondente aos estádios 13, 14 e 15 (Tabela 3).

Figura 5. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* nos estádios 6 a 8.



Fonte: HAMBURGER E HAMILTON (1951).

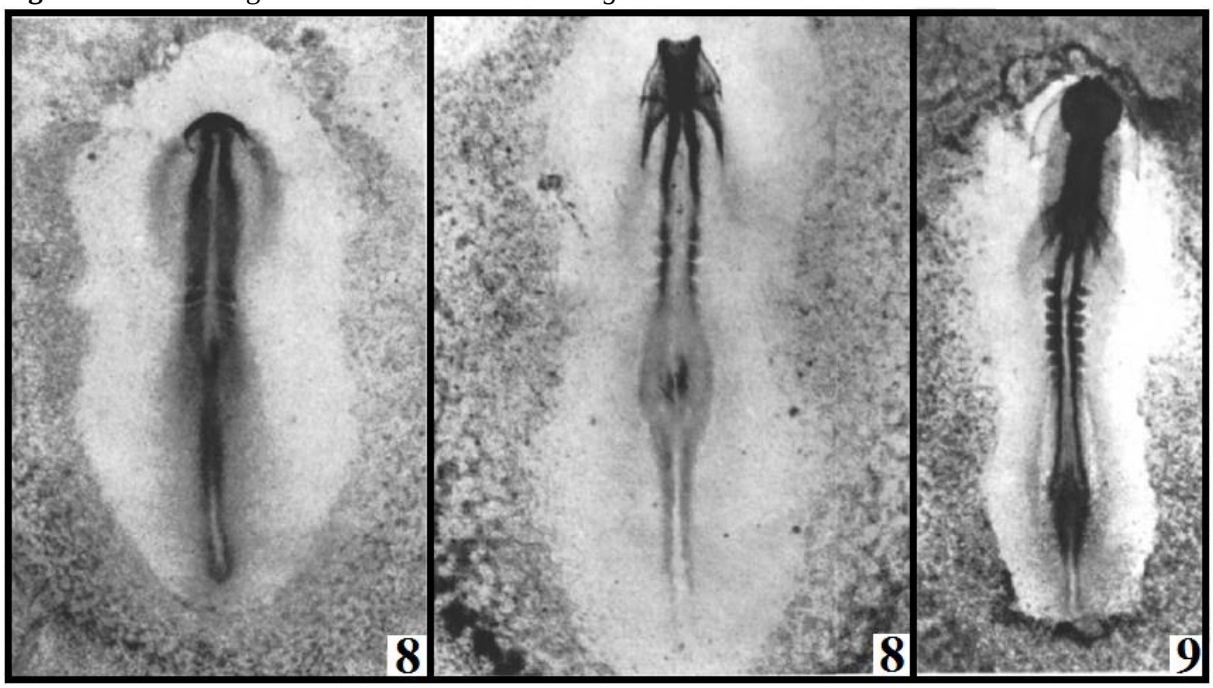
Tabela 1. Características dos embriões de *Gallus gallus domesticus* com aproximadamente 24h por estádio de desenvolvimento.

Estádio embrionário	**Características**
6	Dobra da Cabeça. (23-25 horas). Uma dobra definitiva do blastoderma anterior à notocorda agora marca a extremidade anterior do embrião propriamente dito. Nenhum somito apareceu ainda no mesoderma lateral à notocorda. Este é um estágio transitório, uma vez que a dobra da cabeça e o primeiro par de somitos se desenvolvem bem no tempo.
7	Um somito. (23-26 horas).

	O número um ainda não está claramente definido.
	As dobras neurais são visíveis na região da cabeça.
8	Quatro somitos.
	(26-29 horas).
	As dobras neurais encontram-se ao nível do mesencéfalo.
	As ilhas de sangue estão presentes na metade posterior do blastoderma.

Fonte: Adaptado de HAMBURGER E HAMILTON (1951).

Figura 6. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* nos estádios 8 e 9.



Fonte: HAMBURGER E HAMILTON (1951).

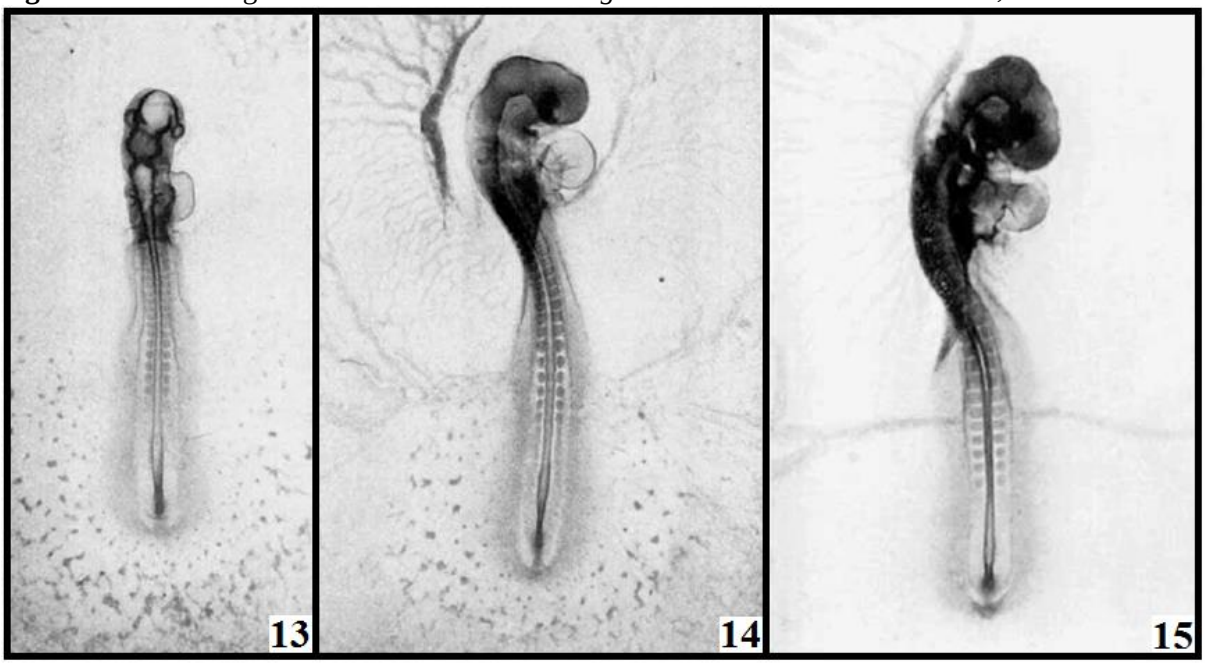
Tabela 2. Características dos embriões de *Gallus gallus domesticus* com aproximadamente 30h por estádio de desenvolvimento.

Estádio embrionário	**Características**
8	Quatro somitos.
	(26-29 horas).
	As dobras neurais encontram-se ao nível do mesencéfalo.
	As ilhas de sangue estão presentes na metade posterior do blastoderma.
9	Sete somitos.
	(29-30 horas)
	Vesículas ópticas primárias estão presentes.

	Primórdio do coração emparelhado começa a se fundir.

Fonte: Adaptado de HAMBURGER E HAMILTON (1951).

Figura 7. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* nos estádios 13, 14 e 15.



Fonte: HAMBURGER E HAMILTON (1951).

Tabela 3. Características dos embriões de *Gallus gallus domesticus* com aproximadamente 48h por estádio de desenvolvimento.

Estádio embrionário	**Características**
13	Dezenove somitos. (48-52 horas). A cabeça está parcialmente virada para a esquerda. As flexões craniana e cervical fazem curvas amplas. Aumento distinto do telencéfalo. Ligeiro estreitamento da abertura para o poço auditivo profundo. Nenhuma indicação de hipófise. Canal atrioventricular indicado por constrição. A dobra da cabeça do âmnion cobre o prosencéfalo, o mesencéfalo e a parte anterior do cérebro posterior.
14	Vinte e dois somitos. (50-53 horas). Flexões e rotação. Flexão craniana: os eixos do cérebro anterior e do

	cérebro posterior se formam em ângulo reto. Flexão cervical uma curva larga. Rotação do corpo para trás até 7 - 9. Atrás deste nível, uma leve flexão aparece, que será chamada de "flexão do tronco". Os arcos viscerais 1 e 2 e as fendas 1 e 2 são distintas. Arcos posteriores não distintos. A vesícula óptica primária começa a invaginar; lente-placóide é formada. Abertura do poço auditivo contraído. A bolsa de Rathke pode ser reconhecida. Alça ventricular do coração agora ventral ao canal átrio-ventricular. Âmnion se estende aos somitos 7 - 10. Além do estádio 14, o número de somitos se torna cada vez mais difícil de determinar com precisão. Isso se deve em parte à dispersão do mesoderma dos somitos mais anteriores e, em estágios posteriores, à curvatura da cauda. As contagens totais de somitos fornecidas para os seguintes estádios são típicas, mas suficientemente variáveis para não serem diagnósticas. Por esses motivos, os brotos dos membros, arcos viscerais e outras estruturas visíveis externamente são usados como critérios de identificação do estádio 15 em andamento.
15	Vinte e quatro a vinte e sete somitos. (50-59 horas). As dobras laterais do corpo se estendem até a extremidade anterior do nível da asa (somitos 15 - 17). Membro-primórdio: membro-plano prospectivo plano, ainda não demarcado. Condensação discreta do mesoderma no nível da asa. Âmnion se estende aos somitos 7-14. Flexões e rotação. Flexão craniana: os eixos do cérebro anterior e do cérebro posterior formam um ângulo agudo. Os contornos ventrais do cérebro anterior e do cérebro posterior são quase paralelos. Flexão cervical uma curva larga. O tronco é distinto. A rotação se estende aos somitos 11 a 13. Arcos viscerais: o arco visceral 3 e a fenda 3 são distintos. O último é mais curto que a fenda 2 e geralmente de forma oval. Olho: O copo óptico está completamente formado; contorno duplo distinto na região da íris.

Fonte: Adaptado de HAMBURGER E HAMILTON (1951).

3.5 EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus* COMO MODELO PARA TESTES DE EMBRIOTOXICIDADE

A embriotoxidade compreende o efeito de substâncias que acarretam perturbação no desenvolvimento nos períodos embrionários e fetal. Essas substâncias são definidas como teratógenos, seus efeitos são dependentes da dose e tempo de exposição do concepto e genótipo materno fetal (ARAUJO, 1998; SCHÜLER-FACCINI et al., 2002). Esses teratógenos podem ser estudados através de modelos embrionários, os embriões de aves, predominantemente a espécie *Gallus gallus domesticus*, devido a sua anatomia ter sido bem estudada e por serem acessíveis fora do corpo materno. As suas características morfológicas e moleculares têm muitas semelhanças com os embriões de mamíferos, portanto, também podem ser utilizados em diversas pesquisas comparativas (HICKMAN et al., 2016; KMECICK et al., 2019).

A área de embriotoxicologia possui alguns obstáculos como variabilidade na estrutura da placenta, duração do tempo de gestação e principalmente as diretrizes éticas que limitam a sua execução, utilizando por modelos alternativos. De fato, a literatura científica possui inúmeros estudos com embriões de galinha, nos quais foram avaliados os efeitos de fármacos (TURGUT et al., 2019), metais pesados (YAMAMOTO et al., 2012), corantes alimentares (OVALIOGLU et al., 2019), contaminantes ambientais, e os resultados obtidos nessas pesquisas podem evidenciar os riscos da exposição humana a essas substâncias (KOHL et al., 2019).

3.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Os seres vivos possuem como característica essencial a presença de atividade metabólica, sendo esta representada pelo conjunto de reações químicas que ocorre no interior de cada célula. No caso das plantas, os compostos químicos oriundos dessas reações, denominados de metabólitos, podem ser classificados como metabólitos primários e secundários (SHIH, 2018). Os compostos presentes no metabolismo primário possuem distribuição universal e incluem: aminoácidos, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e a clorofila. Estes desempenham funções essenciais para o crescimento e o desenvolvimento da planta, tais como respiração, fotossíntese e o transporte de solutos (ZAYNAB et al., 2019).

Por outro lado, os compostos provenientes do metabolismo secundário não possuem distribuição universal e são produzidos em menor quantidade, quando comparados aos

primários, pois nem sempre estão envolvidos em funções vitais. Embora o metabolismo secundário não seja necessário durante o ciclo de vida de uma planta, ele funciona como um importante mediador na interação planta-ambiente (AHMED et al., 2017).

Desse modo a produção dos compostos secundários tem por função beneficiar a planta na competição com outros vegetais, realizando a proteção contra o ataque de herbívoros e patógenos (ZAYNAB et al., 2018). Além disso, servem como atrativos para animais dispersores de sementes, polinizadores e microrganismos simbiontes, através da produção de aroma, cor e sabor. Somados a estes fatores bióticos, os metabólitos secundários também protegem a planta contra os estresses abióticos como variações de temperatura, disponibilidade de água, carência de nutrientes minerais e exposição a luz ultravioleta (TAKSHAK; AGRAWAL, 2019).

A síntese dos metabólitos secundários ocorre sob a influência de diversos fatores e com isso, a sua concentração nas diferentes partes da planta (raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes) pode sofrer variações (LI et al., 2020). Dentre esses fatores estão: poluição atmosférica, estresse hídrico, nutrientes, seca, salinidade, incidência de luz solar, altitude, estresse térmico e presença de metais pesados no solo. Por isso é importante, durante a coleta de material vegetal, caracterizar o habitat no qual a planta está inserida, pois todos esses fatores abióticos podem alterar a produção dessas substâncias (MAHAJAN; KUIRY; PAL, 2020).

Os metabólitos secundários das plantas podem ser divididos em três grupos: terpenos, alcaloides e compostos fenólicos. Esses metabólitos, que desempenham importantes funções na defesa contra os estresses bióticos e abióticos, também possuem inúmeras propriedades terapêuticas (ZAYNAB et al., 2018; MAHAJAN; KUIRY; PAL, 2020).

Os terpenos, representados principalmente pelos óleos essenciais, atuam na produção dos odores florais para atrair polinizadores e nos sistemas de defesa e sinalização entre plantas vizinhas (ZHOU; PICHERSKY, 2020). Os terpenos são hidrocarbonetos formados a partir do esqueleto estrutural de isopreno (C5H8), sendo classificados em: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (carotenoides) (MEWALAL et al., 2017). Suas atividades biológicas incluem: ação analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e anticâncer. Além disso, também podem ser utilizados na fabricação de repelentes contra insetos (FERREIRA; BARROS, 2019).

Os alcaloides correspondem a um grupo de compostos nitrogenados, que podem conter um ou mais átomos de nitrogênio dentro do anel heterocíclico com características de

aminas primárias, secundárias ou terciárias. Muitos desses compostos são tóxicos e com isso são usados pelas plantas como mecanismo de defesa contra a agressão de outros organismos. As suas atividades farmacológicas incluem: ação analgésica, anticâncer, anti-inflamatória, antiparasitária, antimicrobiana, antinociceptiva, antioxidante e anti-hipertensiva (DEBNATH et al., 2018).

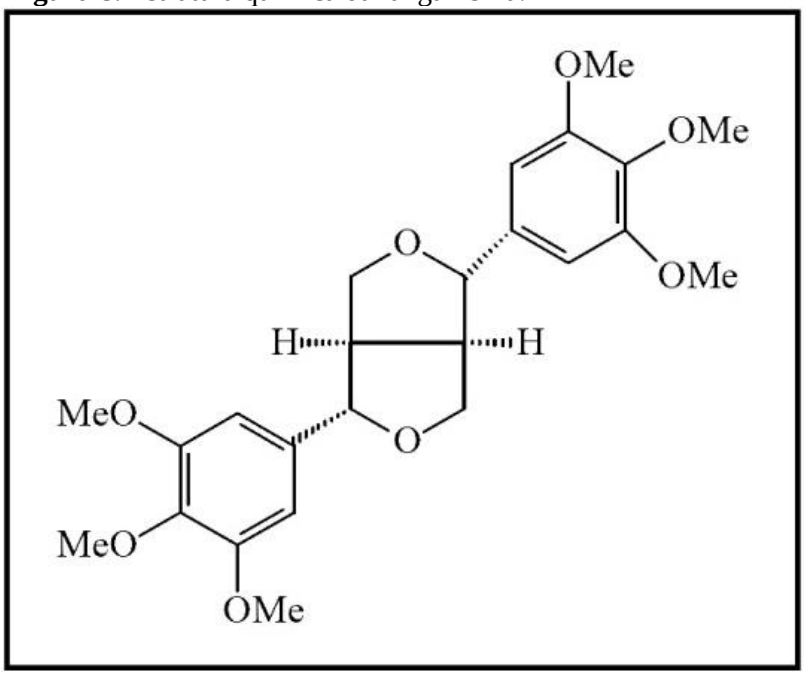
Os compostos fenólicos conferem sabor, odor e a coloração das plantas. São constituídos de anéis aromáticos ligados a uma ou mais hidroxilas, sendo classificados em: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. Os seus efeitos farmacológicos incluem: proteção antitumoral, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, cardíaca e gastrointestinal (ARNOSO; COSTA; SCHMIDT, 2019; CAMPOS, 2019).

3.7 CARACTERÍSTICAS DA LIGNANA IANGAMBINA

Em plantas, as micromoléculas, provenientes do metabolismo secundário, que possuem na sua estrutura química exclusivamente o grupo fenilpropânico (C6C3)n são denominadas de lignoides (POHMAKOTR et al., 2017). A partir das variações biogenéticas que ocorrem no acoplamento oxidativo entre as unidades fenilpropânicas, estes lignoides são classificados em: lignanas, neolignanas, norlignanas, alolignanas, heterolignoides e oligolignoides. Dentre esses tipos de lignoides, depois da celulose, as lignanas são as substâncias mais presentes (TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016; ZÁLEŠÁK; BON; POSPÍŠIL, 2019). Baseadas na forma em que o oxigênio é incorporado ao esqueleto principal e no padrão de ciclização, as lignanas podem ser subdivididas em: furano, furofurano, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, dibenzociclooctadieno e dibenzilbutirolactol (SUZUKI; UMEZAWA, 2007; TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016).

As lignanas se acumulam na parede das células vegetais e conferem rigidez principalmente em espécies lenhosas. Além disso, também se acumulam em caules, em situações que envolvem ferimentos mecânicos e invasão de fungos ou bactérias (SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012). Nas folhas de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil (Lauraceae) é encontrada em abundância uma lignana furofurânica, denominada Iangambina (Figura 8), que constitui a maior fração de lignoides da espécie (LI et al, 2018; ANTONIO; VEIGA-JUNIOR; WIEDEMANN, 2020).

Figura 8. Estrutura química da Iangambina.



Fonte: MORI; FURUTA; WATANABE, 2016.

Diversas atividades biológicas são atribuídas a Iangambina: atividade depressora do sistema nervoso central (PACHÚ; ALMEIDA; BARBOSA-FILHO, 1993; SOUSA et al., 2005), antagonista específico do fator de agregação plaquetária (CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995a; CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995b; HERBERT et al, 1997; JESUS-MORAIS et al., 2000), atividade analgésica (ALMEIDA; PACHÚ; BARBOSA-FILHO, 1995), propriedades antialérgicas (SERRA et al., 1997), propriedades cardiovasculares (TIBIRIÇÁ et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; TIBIRIÇÁ, 2001), indutora de apoptose em células tumorais (HAUSOTT; GREGER; MARIAN, 2003), vasorrelaxante e hipotensiva (ARAÚJO et al., 2014), atividade anti-inflamatória (KIM et al., 2009) e atividade antiparasitária (anti-leishmania) (MONTE-NETO et al., 2007; MONTE-NETO et al., 2011). Além disso, apresenta baixa toxicidade e não é mutagênica, tornando-se, portanto, uma molécula promissora na prospecção de fármacos (MARQUES et al., 2003; MONTE-NETO et al., 2008; CASTRO et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMISSÃO DE ÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Ofício n.º 37/18, registrada com o número 23076.010939/2018-31 (Anexo A).

4.2 AQUISIÇÃO DOS OVOS FERTILIZADOS

Os ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus*, da linhagem COBB, foram cedidos gentilmente pela G3 Agroavícola, localizada na Fazenda Santa Teresinha, Rod. PE 95 km 20, Riacho das Almas – PE/Brasil (8°08'23.0"S 35°51'52.1"W).

4.3 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O procedimento de manejo dos embriões e a técnica embriológica de montagem total foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), do Departamento de Histologia e Embriologia, do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A etapa do processo de emblocamento foi realizada no Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia - CCS/UFPE e o procedimento histológico de cortes transversais foi realizado no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Histologia e Embriologia - CB/UFPE.

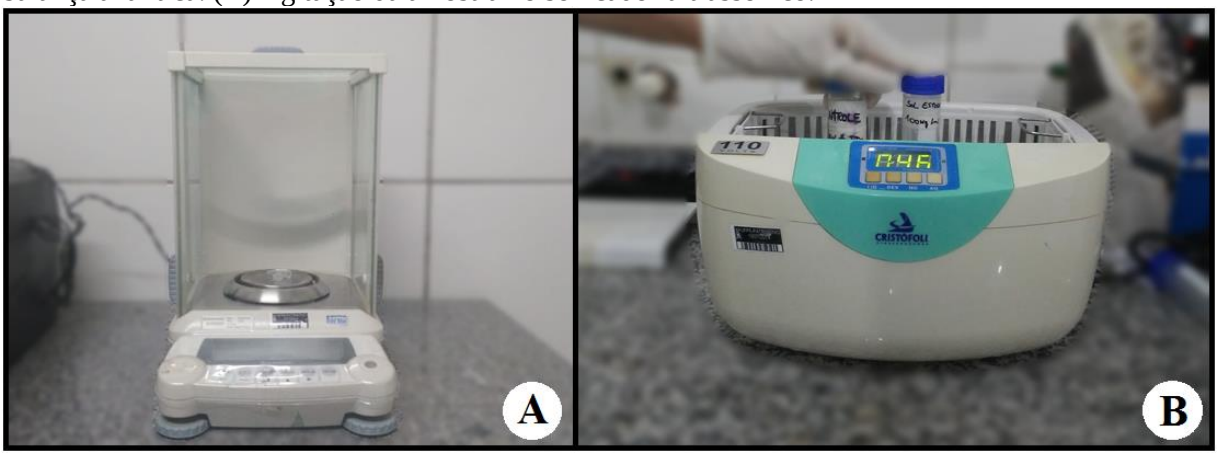
4.4 AQUISIÇÃO DA IANGAMBINA

O composto iangambina, uma lignana furofurânica, obtido a partir de folhas de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil, foi caracterizado e isolado por Maria Isabel de Assis Lima Castro, sob orientação do Professor Dr. José Maria Barbosa Filho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF-UFPB) de acordo com os procedimentos descritos por Castro et al (2020). O material botânico foi coletado no município de Santa Rita - PB e uma exsicata foi depositada na UFPB (AGRA 4309).

4.5 PREPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DA IANGAMBINA

Para o grupo controle (G1), 100 µL de tween 80 foram colocados em um tubo tipo Falcon e adicionado PBS (pH 7,0) até completar 10 ml. Para o grupo da amostra teste, 1 mg da iangambina em pó foi dissolvido com 100 µL de tween 80. Em seguida, a amostra foi homogeneizada utilizando um sonicador ultrassônico (Figura 9). A amostra foi diluída em PBS até completar 10 ml, constituindo assim a solução estoque com concentração de 100 µg/ml. Para o grupo dois (G2), foi preparado uma solução de 50 µg/ml e para o grupo três (G3) uma solução 65 µg/ml, a partir da solução estoque de iangambina. A escolha destas concentrações ocorreu a partir da análise de dois estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), nos quais a iangambina demonstrou atividade leishmanicida quando testada em parasitas promastigotas, apresentando valores de IC50 de 49,9 µg/ml para *L. chagasi* e de 64,9 µg/ml para *L. amazonensis* (MONTE-NETO et al., 2007; MONTE-NETO et al., 2011).

Figura 9. Preparação das concentrações da Iangambina. (A) Pesagem da Iangambina em pó em uma balança analítica. (B) Agitação da amostra no sonicador ultrassônico.



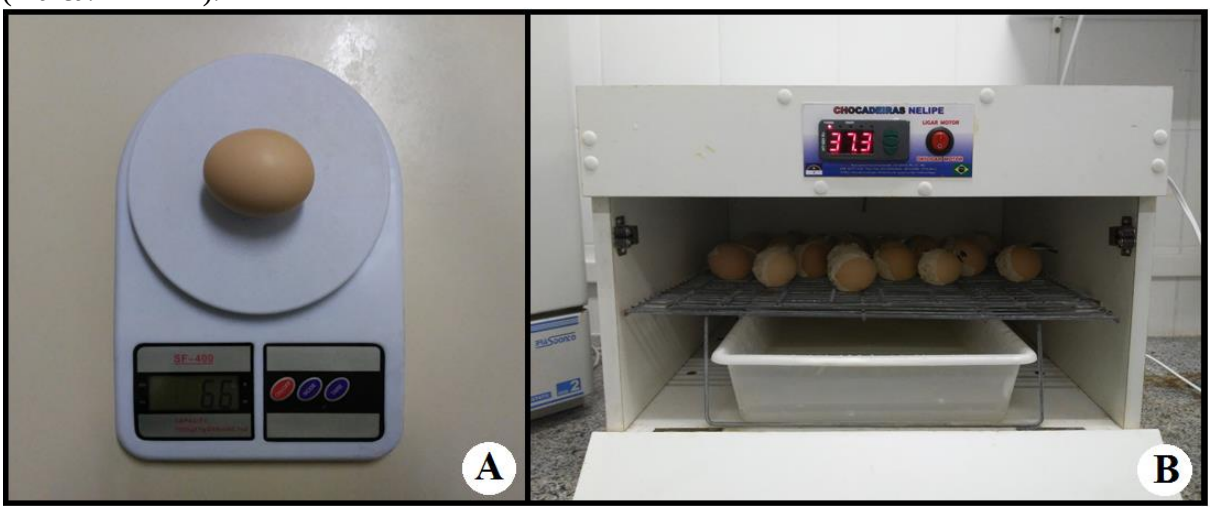
Fonte: O autor.

4.6 GRUPO EXPERIMENTAL

Para o presente estudo foram utilizados 225 ovos fertilizados, da espécie *Gallus gallus domesticus*, onde 165 foram destinados para a técnica de montagem total e 60 para os cortes transversais. Os ovos foram colocados para desenvolver por 24h, 30h e 48 horas, sendo necessário repetir os experimentos de acordo com a capacidade da incubadora (60 ovos). Foram selecionados ovos que apresentavam a casca íntegra, para que nenhum agente externo pudesse ter influência durante o experimento. Ao chegar da granja, os ovos foram colocados

no laboratório por 12 horas em temperatura de 22ºC, visando amenizar o estresse decorrente do deslocamento dos embriões e estacionar o processo de desenvolvimento. Após esse período, a casca foi higienizada com papel toalha levemente umedecido com etanol 70% e os ovos foram pesados em uma balança. Os ovos fertilizados, com peso médio de 67g, 60g e 62g foram selecionados para incubação artificial por 24, 30 e 48 horas, respectivamente. Para retomar o processo de desenvolvimento, os ovos foram colocados por duas horas em uma incubadora automática (Marca: NELIPE), com temperatura de aproximadamente 37,5ºC e umidade relativa de 65% a 75% mantida por um recipiente de 1L de água (Figura 10).

Figura 10. Avaliação inicial dos ovos fertilizados. (A) Pesagem dos ovos. (B) Ovos na incubadora (Marca: NELIPE).



Fonte: O autor.

4.6.1 Grupo experimental para a técnica de montagem total

Após o período de duas horas de incubação, os ovos foram retirados da incubadora e divididos em três grupos: G1 (PBS pH 7,0 + 0,1% Tween 80, grupo controle), G2 (50 μg/ml de Iangambina) e G3 (65 μg/ml de Iangambina) (Tabela 4). Uma lanterna foi utilizada para realizar o procedimento de ovoscopia, que possibilitou a visualização da câmara de ar. Neste local, uma perfuração foi realizada com o auxílio de uma agulha de ponta grossa, para assim facilitar a posterior entrada de uma agulha de insulina. Com a seringa de insulina foram injetados 100 μL das soluções em estudo. Em seguida, os ovos foram selados com fita adesiva, identificados (Figura 11) e colocados por 24, 30 e 48 horas na incubadora.

Tabela 4. Quantidade de ovos utilizados por grupo experimental para a técnica de montagem total.

Grupos	**Número de ovos**		
	24 horas	**30 horas**	**48 horas**
G1: PBS pH 7,0 + 0,1% Tween 80	15	20	20
G2: 50 μg/ml de Iangambina	15	20	20
G3: 65 μg/ml de Iangambina	15	20	20
Total	**45**	**60**	**60**

Fonte: O autor.

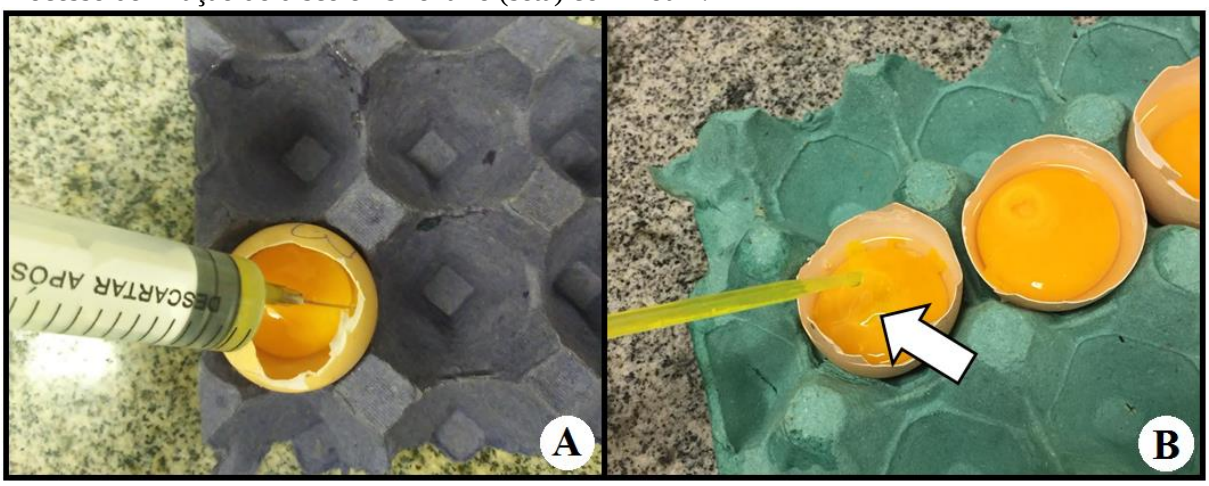
Figura 11. Procedimento de injeção das substâncias nos ovos fertilizados. (A) Utilização de agulha de insulina para injetar 100 μL das amostras na região da câmara de ar (seta). (B) Ovos selados com a identificação dos grupos experimentais.

Fonte: O autor.

4.7 PROCESSAMENTO DOS OVOS FERTILIZADOS

Após incubação em temperatura e umidade controladas, todos os ovos fertilizados foram retirados simultaneamente da incubadora a cada experimento e colocados por 30 minutos na geladeira, para que os embriões fossem dessensibilizados. A fita adesiva foi removida da região do orifício da casca, para que a albumina pudesse ser retirada com uma seringa. As cascas dos ovos foram quebradas com o auxílio de uma tesoura, sendo observada a presença do disco embrionário, onde foi adicionado o fixador Bouin e aguardado o intervalo de um minuto (Figura 12).

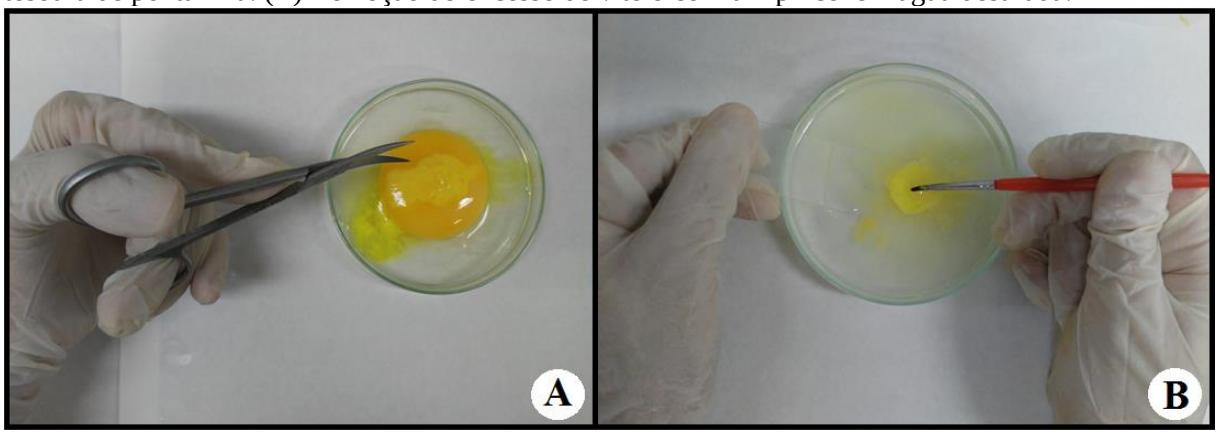
Figura 12. Processamento dos ovos fertilizados. (A) Remoção da albumina com uma seringa. (B) Processo de fixação do disco embrionário (seta) com Bouin.



Fonte: O autor.

Cada disco embrionário foi retirado com uma tesoura de ponta fina e transferido para uma placa de Petri contendo água destilada, visando a remoção do excesso de vitelo e retirada das membranas embrionárias, com o auxílio de um pincel (Figura 13). Em seguida, os embriões foram transferidos para uma placa de Petri contendo o fixador Bouin, por duas horas, em temperatura ambiente. Após esse período, os embriões foram armazenados em tubos tipo Falcon contendo etanol 70%, onde permaneceram até a realização da técnica de montagem total.

Figura 13. Procedimento de coleta dos embriões. (A) Remoção do disco embrionário com uma tesoura de ponta fina. (B) Remoção do excesso de vitelo com um pincel em água destilada.



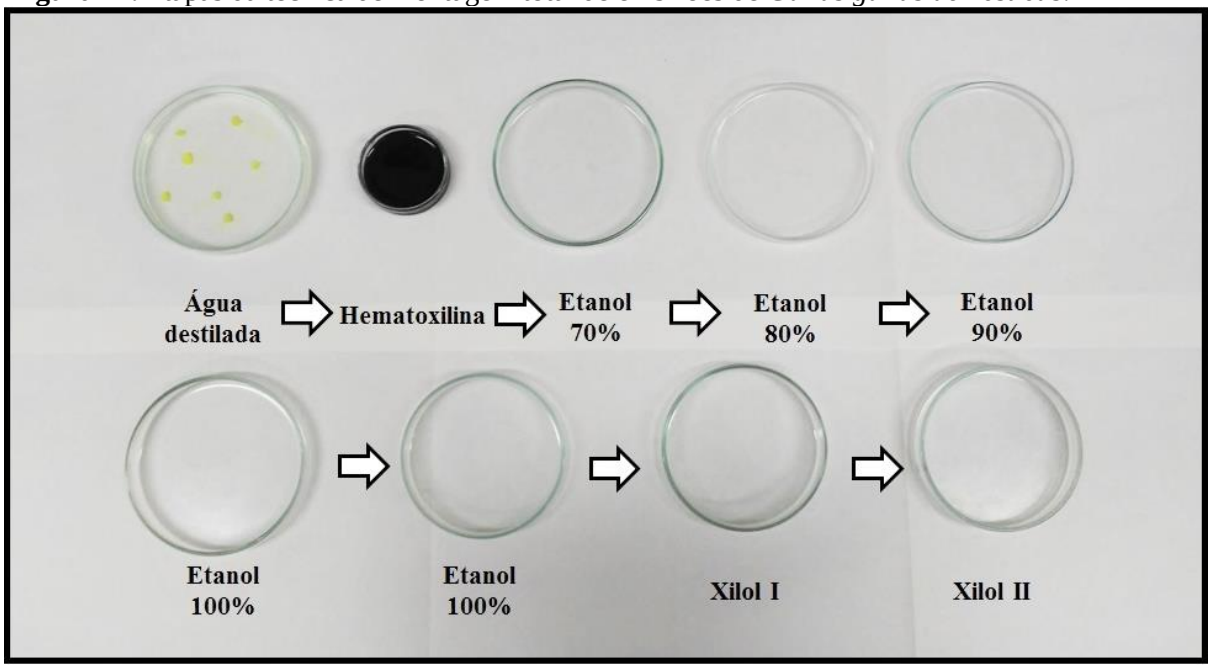
Fonte: O autor.

4.8 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

4.8.1 Técnica de montagem total

A técnica de montagem total foi realizada com os embriões após o processamento descrito no item 4.7. Os embriões foram hidratados com água destilada, imersos no corante Hematoxilina por 30 segundos e lavados novamente para remoção do excesso do corante. Logo após, foi realizada a desidratação dos embriões através de uma bateria crescente de etanol (70%, 80%, 90% e duas de 100%), por dez minutos cada. No processo de diafanização, os embriões receberam dois banhos consecutivos de xilol, com duração de dez minutos cada (Figura 14). Os embriões foram transferidos das placas de Petri para lâminas, onde tiveram o excesso de umidade removido com papel toalha. Para a montagem das preparações, foi adicionado o Bálsamo do Canadá e em seguida a lamínula foi colocada levemente, para que não houvesse a formação de bolhas. No processo de secagem, as preparações foram colocadas em uma estufa com temperatura de aproximadamente 50ºC por duas semanas.

Figura 14. Etapas da técnica de montagem total de embriões de *Gallus gallus domesticus*.



Fonte: O autor.

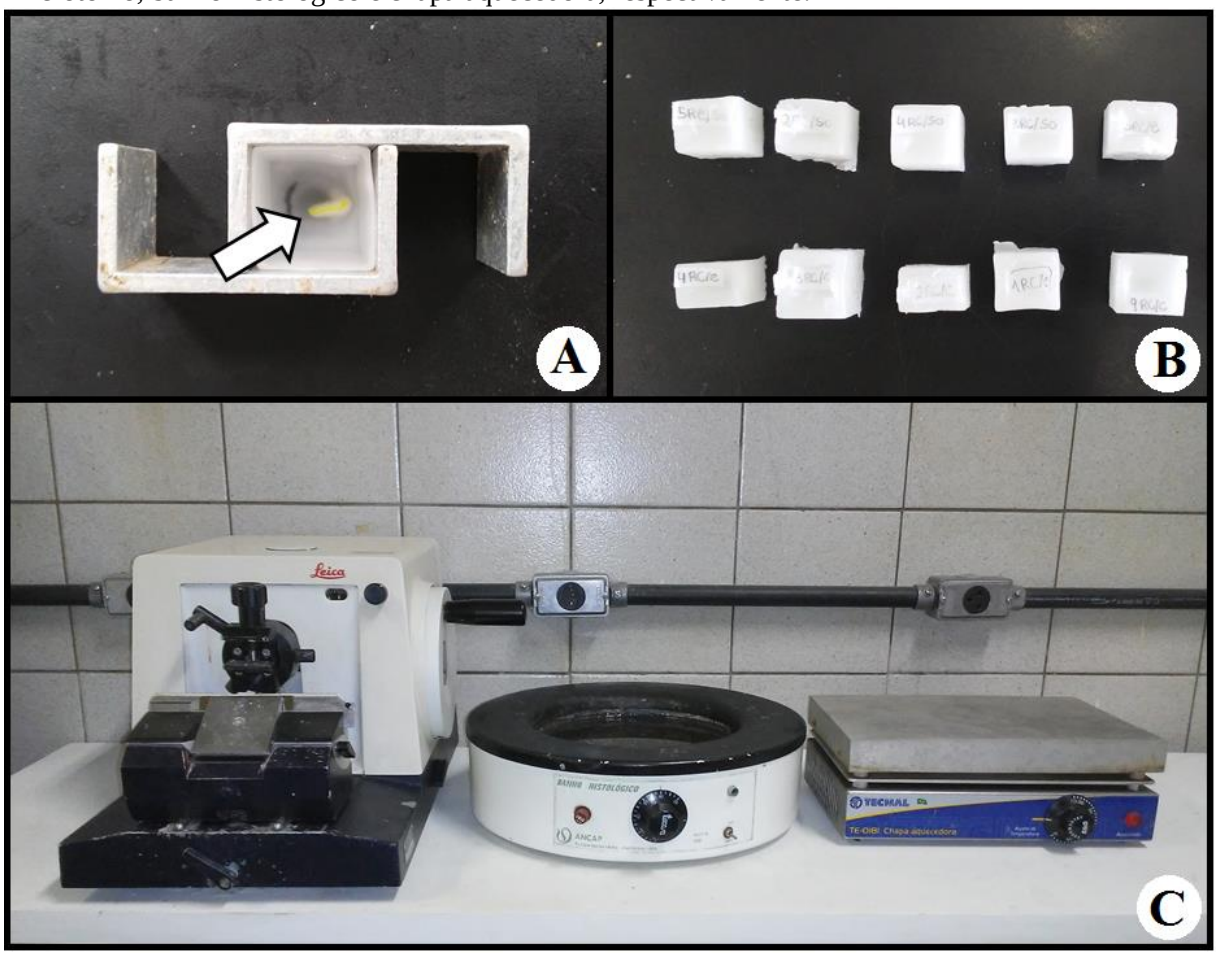
4.8.2 Técnica de corte transversal

Para a realização dos cortes transversais dos embriões de *Gallus gallus domesticus* foram incubados 60 ovos com peso médio de 62g, por 48 horas, divididos em três grupos (G1, G2 e G3) contendo 20 ovos cada. Após o processamento descrito no item 4.7, os embriões permaneceram armazenados em tubos tipo Falcon contendo etanol 70%. Para o procedimento histológico, os embriões foram submetidos a uma bateria crescente de etanol, 70% por 20 minutos e 80%, 90% e 100% por dez minutos cada, com o intuito de remover gradativamente a água presente nas células. Logo em seguida os embriões foram colocados no xilol por dez minutos e foram impregnados em parafina líquida na estufa, com a temperatura de aproximadamente 60ºC por dez minutos.

No processo de emblocamento (Figura 15), cada embrião foi retirado da estufa e imerso em parafina líquida com o auxílio de uma pinça, e para moldar os blocos foram utilizados os esquadros de Leuckart. Cada bloco foi identificado, colocado na bancada para secar em temperatura ambiente por 30 minutos e retirado do molde. Para obter as secções transversais dos embriões os blocos foram colocados no micrótomo, onde foram realizados cortes com 4µm de espessura. Em seguida, cada corte foi colocado no banho histológico com a temperatura de 40ºC, para promover o nivelamento, e capturado com uma lâmina posicionada diagonalmente de maneira a formar um ângulo de 45º.

Para iniciar a etapa de coloração, as lâminas foram colocadas na chapa aquecedora na temperatura de 60ºC para derreter a parafina. Após o derretimento, as lâminas foram imersas em dois banhos de xilol, por cinco minutos cada, e em seguida em uma solução de etanol 100% e xilol por 30 segundos e logo após uma bateria etanólica decrescente (100%, 90% e 70%), por 30 segundos cada. As lâminas foram imersas em água por 30 segundos e em seguida na hematoxilina, por três minutos, na eosina por dois minutos e colocadas novamente na água, por um minuto, para remover o excesso dos corantes. Para realizar uma desidratação dos cortes foi realizada uma bateria crescente de etanol (70%, 90% e 100%) por 30 segundos cada, em seguida houve a imersão das lâminas em uma solução de etanol 100% e xilol por 30 segundos. No processo de diafanização as lâminas receberam dois banhos consecutivos de xilol com duração de 30 segundos cada. Para a montagem das preparações foi adicionado Entellan® sobre os cortes transversais dos embriões e a lamínula foi colocada levemente, sem pressionar a amostra, para que não ocorresse a formação de nenhum artefato de técnica.

Figura 15. Etapas do corte transversal dos embriões de *Gallus gallus domesticus*. (A) Esquadro de Leuckart com um embrião (seta) imerso em parafina. (B) Blocos de parafina finalizados. (C) Micrótomo, banho histológico e chapa aquecedora, respectivamente.

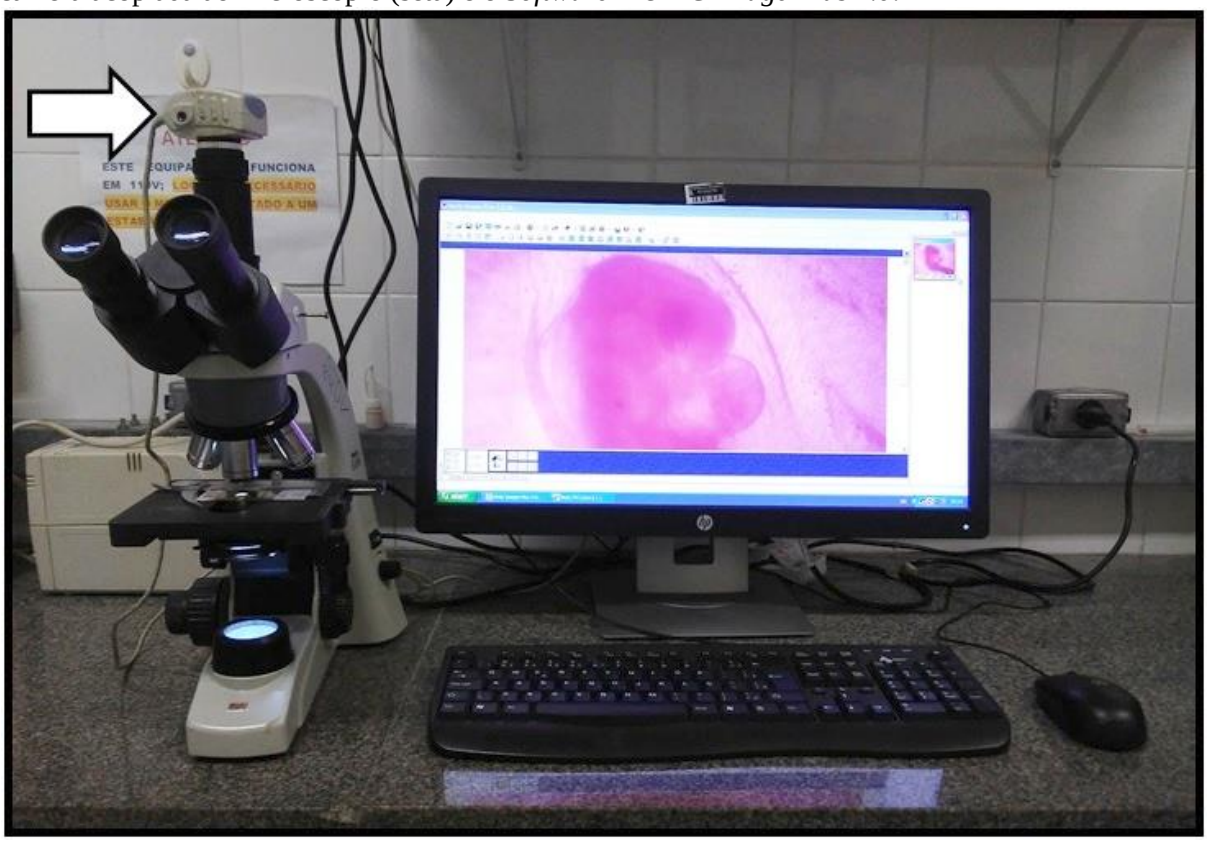


Fonte: O autor.

4.9 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA

A captura das imagens para a análise morfológica dos embriões foi realizada em um microscópio óptico com câmera digital acoplada (MOTICAM 1000 1.3M Pixel–USB 2.0, QUIMIS), utilizando o *Software MOTIC Image Plus 2.0* (Figura 16). O estadiamento dos embriões foi realizado de acordo com o modelo de Hamburger e Hamilton (1951) como descrito no item 3.4.

Figura 16. Captura das fotomicrografias dos embriões de *Gallus gallus domesticus*. Utilização de câmera acoplada ao microscópio (seta) e o *Software MOTIC Image Plus 2.0*.

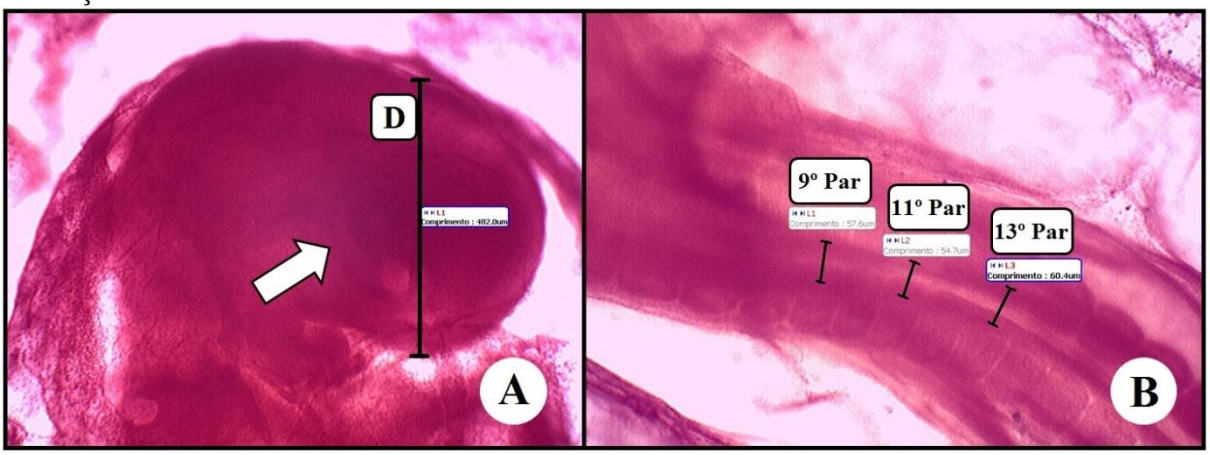


Fonte: O autor.

4.10 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica foi realizada utilizando o *Software MOTIC Image Plus 2.0*. A largura do tubo neural foi mensurada em todos os embriões de 48 horas, pertencentes ao estádio 14, na altura dos pares de somitos 9º, 11º e 13º com a finalidade de padronizar a análise. A largura da região cefálica foi medida em todos os embriões do estádio 14, tendo como referência o diencéfalo e a vesícula óptica em formação. As fotomicrografias da montagem total foram realizadas com o aumento de 100x (Figura 17).

Figura 17. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* para demonstrar o procedimento da análise morfométrica. (A) Fotomicrografia da região cefálica; nota-se uma linha reta partindo do diencéfalo (D) até a outra extremidade da região cefálica, passando pela vesícula óptica indicada pela seta. (B) Fotomicrografia do tubo neural indicando os pares de somitos: 9º, 11º e 13º. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x.



Fonte: O autor.

4.11 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados provenientes da morfometria foi realizada através do programa GraphPad Prism 7.0. Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embriões de *Gallus gallus domesticus* têm sido descritos na literatura científica como um modelo experimental eficiente em investigações morfológicas, no que concerne ao desenvolvimento embrionário sob estresse químico (ERTEKIN et al., 2019; TURGUT et al., 2019). Este trabalho utilizou o modelo de embrião de *Gallus gallus domesticus* para investigar os efeitos da iangambina, um composto fenólico isolado de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil.

As incubações realizadas por períodos de 24, 30 e 48 horas dos ovos fertilizados, resultaram em ovos embrionados e não embrionados. No período de 24 horas foram incubados 45 ovos fertilizados, com aquisição de 35 ovos embrionados e dez ovos não embrionados. Dos 35 ovos embrionados que foram processados, ocorreu perda de 42,9% (15 ovos). No período de 30 horas, foram incubados 60 ovos fertilizados, sendo obtidos 16 ovos não embrionados e 44 ovos embrionados. Dos 44 ovos embrionados que foram processados ocorreu perda de 20,4% (9 ovos). No período de 48 horas foram incubados 60 ovos fertilizados, resultando em 11 ovos não embrionados e 49 ovos embrionados. Destes 49 ovos embrionados que foram processados houve perda de 8,2% (4 ovos). A perda dos embriões durante o processamento histológico foi provocada pela manipulação, em decorrência da delicadeza das membranas embrionárias. Foram realizados três ensaios de incubações, seguidos de processamentos histológicos dos embriões, nos quais podemos observar que a perda foi maior no primeiro ensaio, seguindo uma diminuição da perda de embriões durante o processamento das demais amostras. Este comportamento aponta para diminuição de perdas de embriões, que foi inversamente proporcional ao aumento da habilidade na manipulação das membranas embrionárias.

Ertekin et al. (2019) utilizaram 75 ovos divididos em cinco grupos, com 15 ovos cada, para avaliar os efeitos do diclofenaco de sódio, um medicamento anti-inflamatório, sobre a morfogênese do tubo neural. Além disso, Atay et al. (2020) ao avaliarem os efeitos do bisfenol A, um produto químico industrial, em embriões de galinha, utilizaram uma quantidade menor de ovos fertilizados, sendo três grupos contendo dez ovos cada. Isso demonstra que não é necessário utilizar uma quantia elevada de embriões para obter resultados considerados aceitáveis, corroborando com a quantidade de ovos fertilizados e o número de embriões processados neste experimento.

Os ovos foram provenientes de matrizes Cobb com 34 semanas de idade e o aproveitamento de ovos embrionados foi de 77,8%, 73,4% e 81,7% nos períodos de 24h, 30h e 48 horas de incubação, respectivamente. De acordo com Araújo et al. (2016), as taxas de

rendimento da incubação variam devido a alguns fatores como fertilidade dos ovos, condições das incubadoras e manejo do incubatório. A fertilidade dos ovos é um fator influenciado pela granja, pois a incubação é realizada com o intuito de desenvolver os embriões, não sendo capaz de modificar a fertilidade dos ovos (GUIA DE MANEJO DE INCUBAÇÃO COBB, 2008), o que justifica as variações da presença de embriões nesse experimento, pois os parâmetros de incubação foram os mesmos para todos os três ensaios.

5.1 ESTADIAMENTO DOS EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*

Os 20 embriões obtidos na incubação de 24 horas e processados pela técnica de montagem total foram estadiados segundo Hamburger e Hamilton (1951). No grupo G1 (PBS + Tween 80), foram evidenciados os estádios sete (28,6%) e oito (71,4%), no G2 (50 µg/ml Iangambina) foram encontrados os estádios seis (33,3%) e oito (66,7%) e no G3 (65 µg/ml Iangambina) os embriões apresentaram características dos estádios sete (42,9%) e oito (57,1%) (Tabela 5).

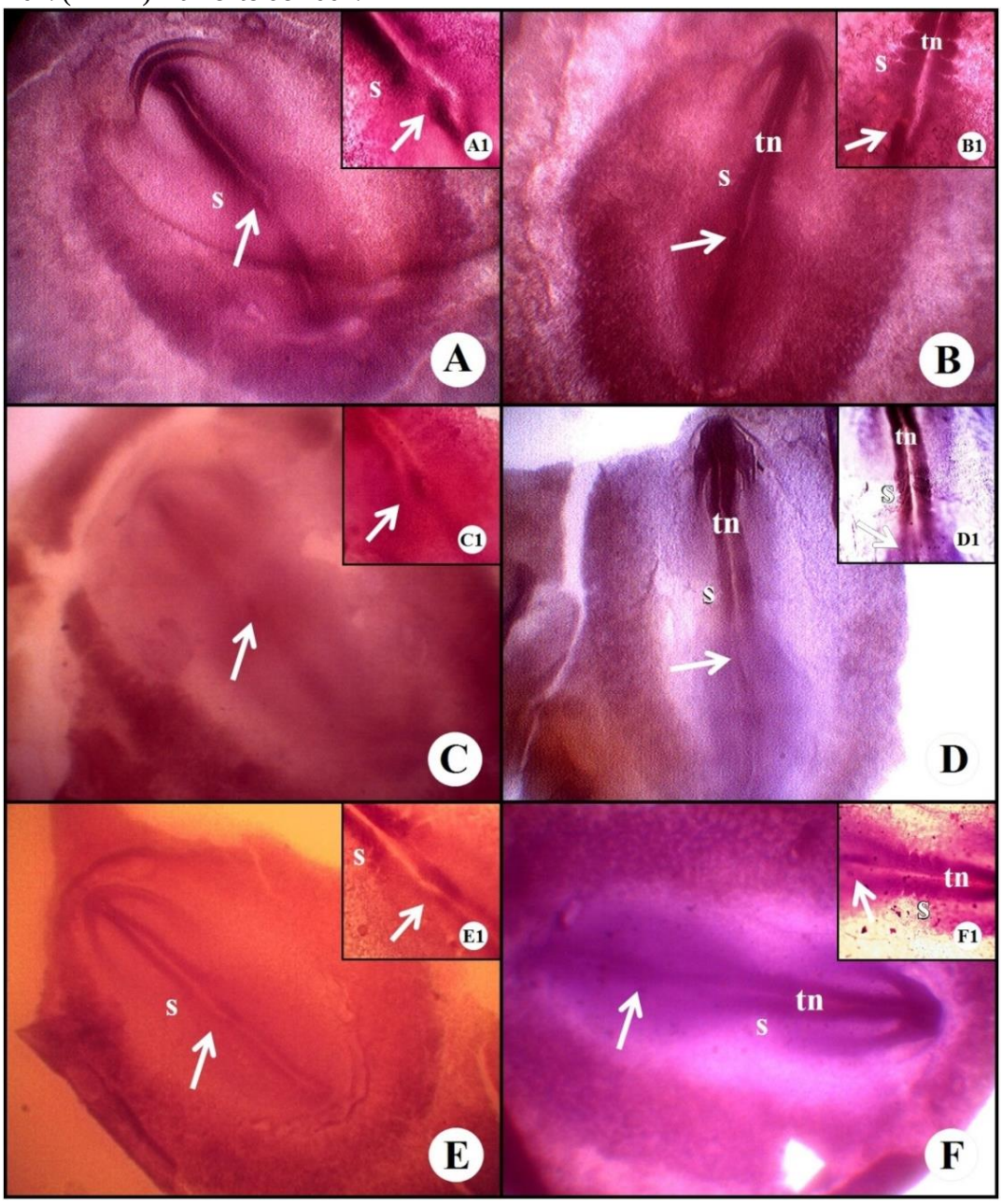
Tabela 5. Estadiamento de embriões de *Gallus gallus domesticus* em percentuais dos diferentes grupos experimentais, com 24 horas de desenvolvimento, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

Grupos	**Embriões**	**Estádios de desenvolvimento**		
	N.º Total	**6**	**7**	**8**
G1: PBS pH 7,0 + 0,1 % Tween 80	7	---	2	5
	%	---	28,6%	71,4%
G2: 50 µg/ml de Iangambina	6	2	---	4
	%	33,3%	---	66,7%
G3: 65 µg/ml de Iangambina	7	---	3	4
	%	---	42,9%	57,1%

(---) Ausente.
Fonte: O autor.

As estruturas morfológicas identificadas nos embriões do estádio seis (G2) foram a linha primitiva e o nó de Hensen, e nos embriões do estádio sete (G1 e G3) o nó de Hensen, a linha primitiva e a formação do primeiro par de somitos. No estádio oito, presente em todos os grupos experimentais (G1, G2 e G3), todos os embriões possuíam quatro pares de somitos segmentados ou em processo de segmentação, sendo essas características esperadas para o respectivo estádio (Figura 18).

Figura 18. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 24 horas. G1: estádios 7 (A-A1) e 8 (B-B1). G2: estádios 6 (C-C1) e 8 (D-D1). G3: estádios 7 (E-E1) e 8 (F-F1). Somitos (s). Tubo neural (tn). A seta indica o nó de Hensen. Coloração hematoxilina. (A-F) Aumento de 40x. (A1-F1) Aumento de 100x.



Fonte: O autor.

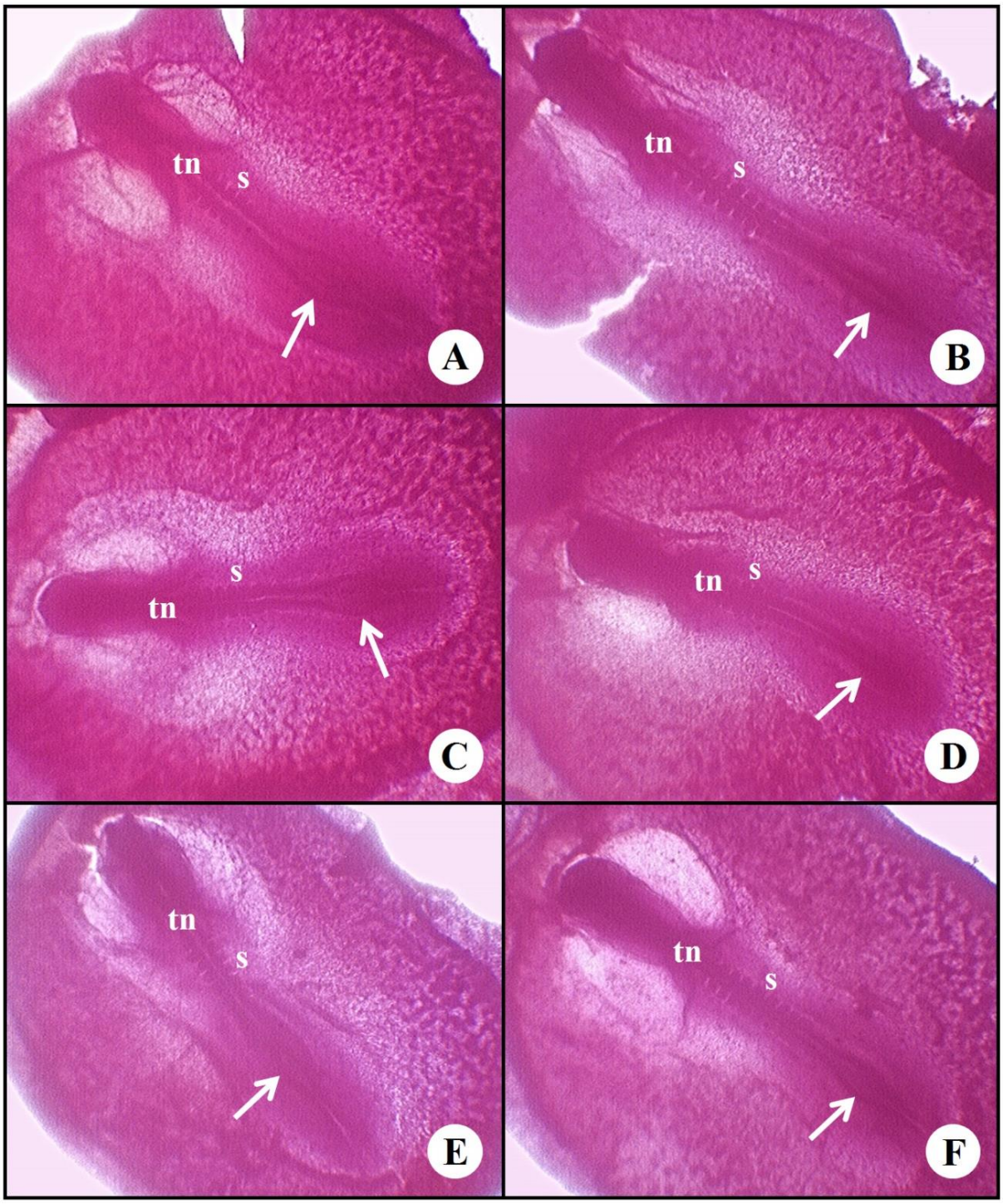
Nos 35 embriões provenientes da incubação por 30 horas, foram evidenciados os estádios oito e nove. No G1, seis embriões (40%) foram classificados no estádio oito e nove (60%) no estádio nove. No G2, cinco embriões (50%) foram identificados no estádio oito e cinco (50%) no estádio nove. No G3, quatro embriões (40%) pertenciam ao estádio oito e seis (60%) ao estádio nove (Tabela 6). Os embriões dos diferentes grupos que foram identificados no estádio oito, apresentaram entre quatro e seis pares de somitos e no estádio nove foram sete pares de somitos (Figura 19).

Tabela 6. Estadiamento de embriões de *Gallus gallus domesticus* em percentuais dos diferentes grupos experimentais, com 30 horas de desenvolvimento, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

Grupos	**Embriões**	**Estádios de desenvolvimento**	
	N.º Total	**8**	**9**
G1: PBS pH 7,0 + 0,1 % Tween 80	15	6	9
	%	40%	60%
G2: 50 μg/ml de Iangambina	10	5	5
	%	50%	50%
G3: 65 μg/ml de Iangambina	10	4	6
	%	40%	60%

Fonte: O autor.

Figura 19. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 30 horas. G1: estádios 8 (A) e 9 (B). G2: estádios 8 (C) e 9 (D). G3: estádios 8 (E) e 9 (F). Somitos (s). Tubo neural (tn). A seta indica o nó de Hensen. Coloração hematoxilina. Aumento de 40x.



Fonte: O autor.

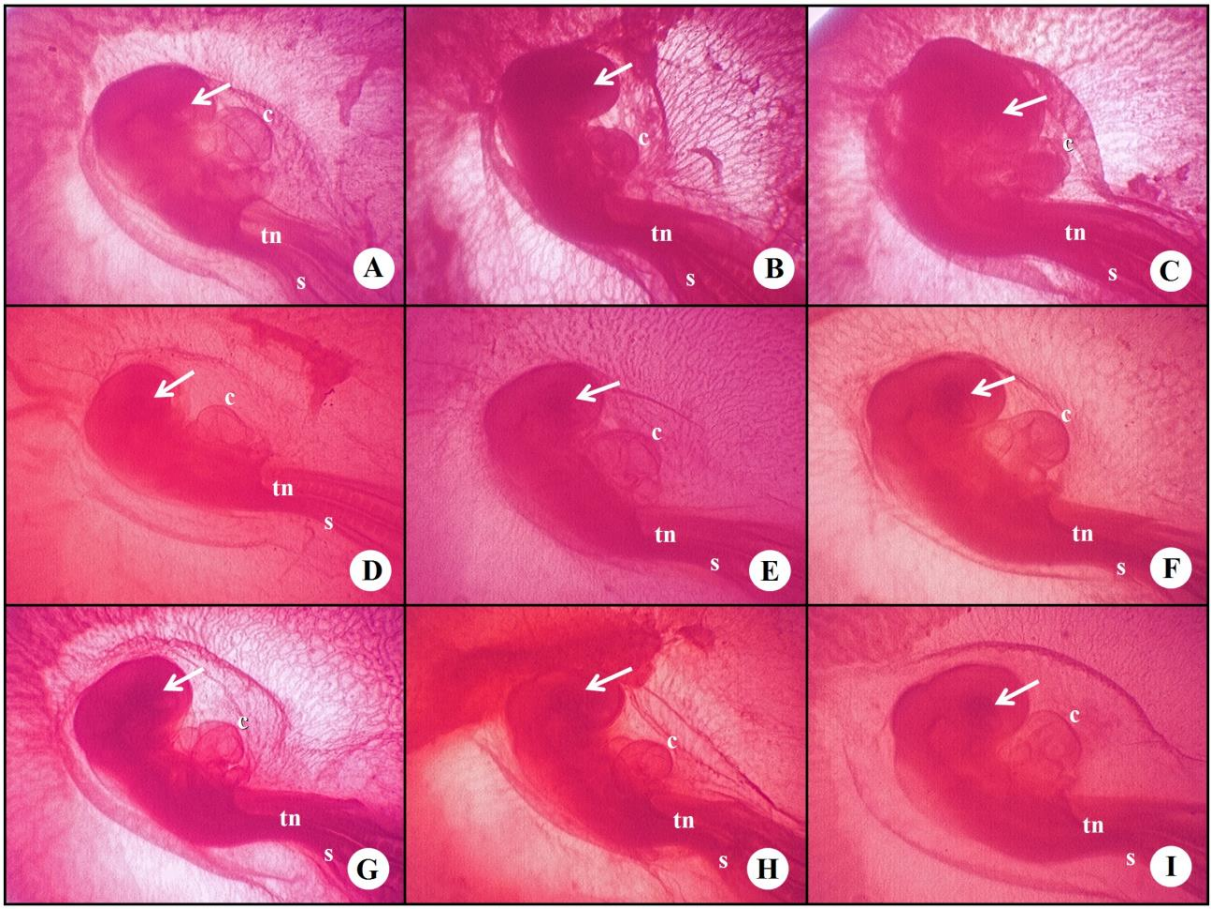
Nos 45 embriões provenientes da incubação por 48 horas, foram evidenciados os estádios 13, 14 e 15 (Figura 20). No G1, um embrião no estádio 13 (6,7%), oito no 14 (53,3%) e seis no estádio 15 (40%). No G2, três embriões foram identificados no estágio 13 (20%), oito no 14 (53,3%) e quatro no 15 (26,7%). No G3, quatro embriões foram identificados no estágio 13 (26,7%), seis no 14 (40%) e cinco no 15 (33,3 %) (Tabela 7).

Tabela 7. Estadiamento de embriões de *Gallus gallus domesticus* em percentuais dos diferentes grupos experimentais, com 48 horas de desenvolvimento, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

Grupos	**Embriões**	**Estádios de desenvolvimento**		
	N.º Total	**13**	**14**	**15**
G1: PBS pH 7,0 + 0,1 % Tween 80	15	1	8	6
	%	6,7%	53,3%	40%
G2: 50 μg/ml de Iangambina	15	3	8	4
	%	20%	53,3%	26,7%
G3: 65 μg/ml de Iangambina	15	4	6	5
	%	26,7%	40%	33,3%

Fonte: O autor.

Figura 20. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 48 horas. G1: estádios 13 (A), 14 (B) e 15 (C). G2: estádios 13 (D), 14 (E) e 15 (F). G3: estádios 13 (G), 14 (H) e 15 (I). Coração (c). Somitos (s). Tubo neural (tn). Vesícula óptica (seta). Coloração hematoxilina. Aumento de 40x.



Fonte: O autor.

Em cada período de incubação (24, 30 e 48 horas) foram identificadas variações de estádio. Nossos achados corroboram com a pesquisa de Wirth et al. (2020) que, ao analisarem embriões de *Gallus gallus domesticus* com sete a 18 dias de desenvolvimento, encontraram uma margem de três estádios para cada dia de incubação. Essa variação pode ser ainda maior, como demonstrado por Kmecick et al. (2019) que, ao avaliarem os efeitos do ácido perfluorooctanóico e do cádmio, em embriões com 72 horas de desenvolvimento, identificaram a presença dos vários estádios (16, 17, 18 e 19). Isso demonstra que, apesar de toda a cautela em proporcionar um ambiente ideal, é comum ocorrerem variações entre os embriões, devido a alguns fatores como a janela de tempo entre o armazenamento, a postura e a incubação dos ovos, tamanho da incubadora e as oscilações na sua temperatura, peso e tamanho dos ovos e também pela própria genética da espécie (POKHREL et al., 2017; POKHREL et al., 2018).

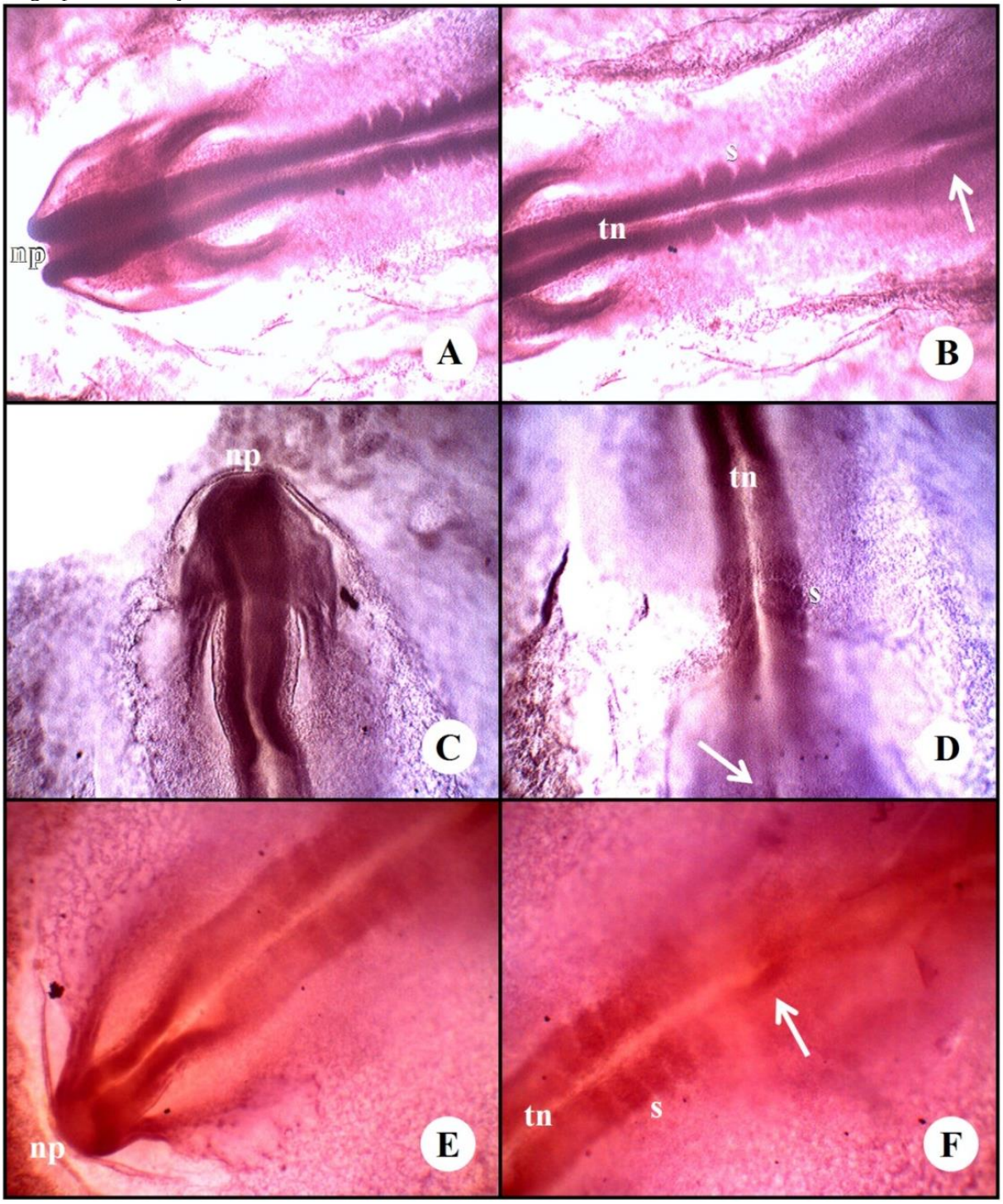
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*

A análise morfológica dos embriões incubados por 24 horas foi realizada com os embriões pertencentes ao estádio oito, por este estar presente em todos os grupos, possibilitando a realização de uma análise comparativa do tubo neural e dos somitos em desenvolvimento. Em todos os embriões analisados, independentemente dos grupos, não foram observadas malformações no tubo neural, tanto na região cefálica quanto na região caudal, em comparação com o grupo controle. Os quatro pares de somitos, presentes em todos os embriões, estavam segmentados ou em processo de segmentação, sendo ambas as características esperadas para o referido estádio (Figura 21).

O primeiro sinal visível de segmentação nos embriões ocorre durante a formação dos somitos a partir do mesoderma paraxial (pré-somítico). Após esse processo, os somitos são caracterizados como estruturas cuboides mesenquimais dispostas aos pares em ambos os lados do tubo neural e da notocorda (WARD et al., 2018). Em embriões de galinha, cada par de somitos é segmentado em intervalos de 90 minutos no sentido anteroposterior (POURQUIÉ, 2018).

Os resultados obtidos nesta análise sugerem que a iangambina não desempenha efeitos no início do processo de somitogênese. A ocorrência de efeitos ocasionados por substâncias químicas pode desencadear falhas na sinalização ou formação de somitos durante o desenvolvimento embrionário, resultando em segmentação vertebral irregular ou malformações esqueléticas axiais (DRAGA et al., 2019; DUESS et al., 2020). Investigações morfológicas desse tipo acerca dos somitos em desenvolvimento têm grande relevância, pois estas estruturas correspondem a precursores embrionários dos segmentos ósseo e muscular em adultos.

Figura 21. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 24 horas, no estádio 8, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) nota-se o neuróporo anterior (np) aberto, correspondendo a morfologia esperada para o referido estádio. Na região caudal do tubo neural (tn) (B, D e F) são evidenciados 4 pares de somitos (s) segmentados (B) e em processo de segmentação (D e F), sendo ambas características consideradas dentro da normalidade. A seta indica o nó de Hensen, localizado mais próximo da região caudal do embrião, demonstrando que houve regressão da linha primitiva em todos os grupos. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x.



Fonte: O autor.

Todos os embriões incubados por 30 horas apresentaram as suas estruturas preservadas, com similaridade morfológica entre os grupos e ausência de malformações, tanto na região cefálica como também na região caudal (Figura 22).

Na região cefálica, nos diferentes grupos, o neuróporo anterior de todos os embriões dos estádios oito e nove estava aberto. Segundo Hamburger e Hamilton (1951), esta característica configura um desenvolvimento normal da região anterior do tubo neural, pois a oclusão do neuróporo anterior tem início no estádio 11, com fechamento completo no estádio 12.

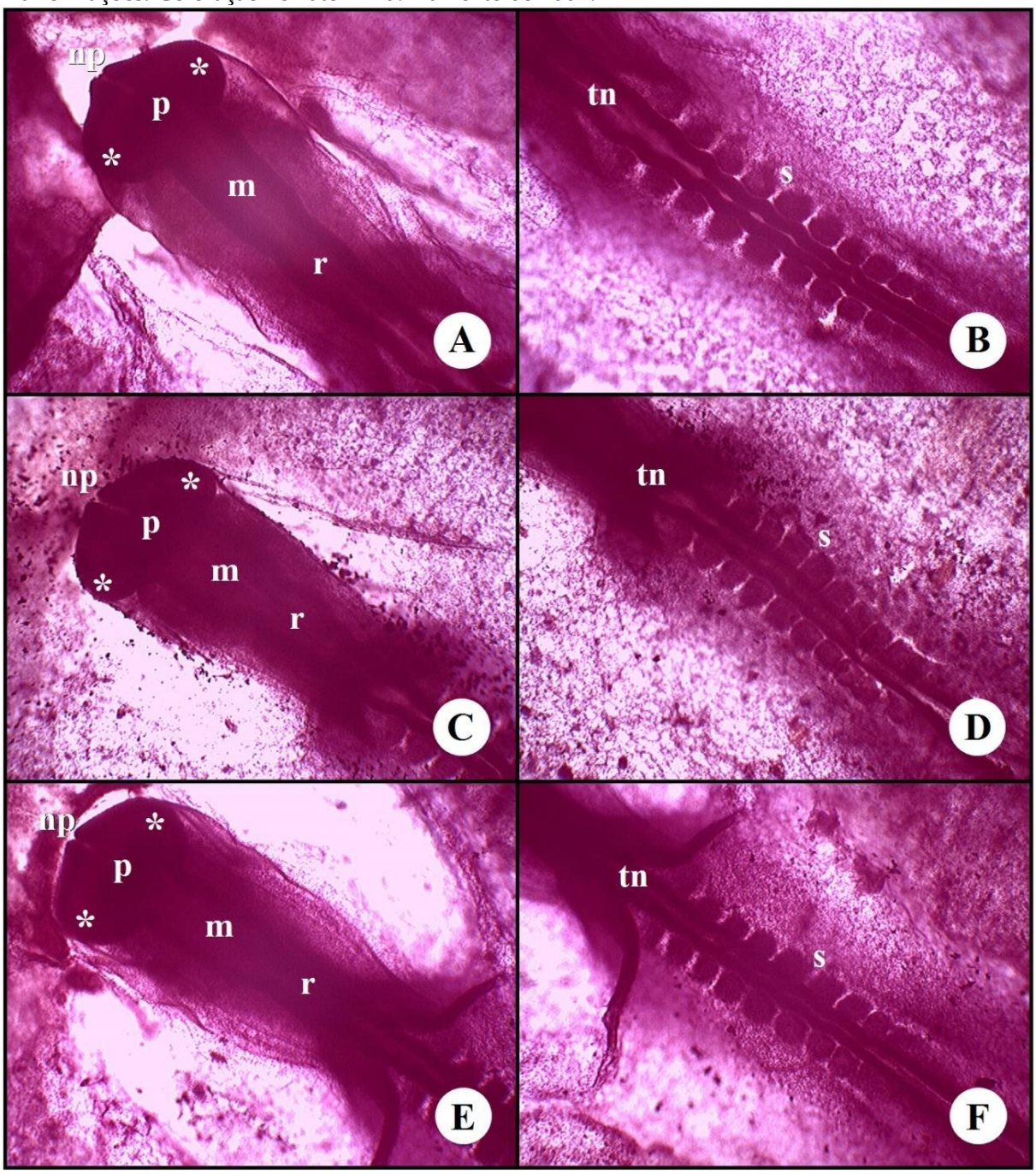
Os embriões do estádio nove apresentaram delimitações normais na região anterior do tubo neural, sendo identificadas pela presença de três vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, corroborando com a morfologia descrita por Garcia et al. (2017).

A importância de investigar a morfologia das vesículas encefálicas primárias se justifica em razão destas estruturas serem cruciais ao desenvolvimento do cérebro. De acordo com Xu et al. (2010), a ocorrência de malformações nas vesículas está relacionada a distúrbios neurológicos graves como a hidrocefalia, na qual ocorre um aumento anormal da vesícula provocado pelo acúmulo excessivo de líquido cefalorraquidiano. Além disso, também pode ocorrer a anencefalia, caracterizada pela ausência da maior parte do cérebro e do crânio, causada por um defeito no fechamento do tubo neural, como observado por Özeren et al. (2015) ao avaliarem os efeitos do flurbiprofeno em embriões de *Gallus gallus domesticus*.

As vesículas ópticas de todos os embriões, caracterizadas como duas protuberâncias localizadas lateralmente ao prosencéfalo, estavam bem delimitadas, demonstrando características semelhantes entre os grupos, corroborando com a morfologia descrita por Bovolenta e Martinez-Morales (2019).

Diferente do nosso estudo, Ma et al. (2014) ao analisarem embriões pertencentes ao estádio nove, tratados com 15 μmol de cafeína (alcaloide xantina), observaram um desenvolvimento anormal das vesículas ópticas, caracterizado pela perda nas suas delimitações. Além disso, também foi identificada a ocorrência de microftalmia unilateral no nono dia de incubação. Isso justifica a importância de analisar as vesículas ópticas no estádio nove, pois a presença de malformações nessas estruturas pode indicar possíveis anomalias congênitas como a anoftalmia, na qual o olho é completamente ausente, e a microftalmia, onde o olho apresenta o tamanho reduzido (JOMAA, et al., 2020).

Figura 22. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 30 horas, no estádio 9, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) nota-se que o neuróporo anterior (np) iniciou o seu fechamento; é possível observar que o tubo neural expandiu-se em três vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo (p), mesencéfalo (m) e rombencéfalo (r) que apresentam morfologia normal, não diferindo entre os grupos; as vesículas ópticas (*) encontram-se projetadas lateralmente ao prosencéfalo. Na região caudal do embrião (B, D e F) os somitos encontram-se segmentados e o tubo neural (tn) não possui malformações. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x.



Fonte: O autor.

Os embriões de todos os estádios, no período de 48 horas de incubação, apresentaram as cinco vesículas encefálicas secundárias (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo) (Figura 23). De acordo com Ishikawa et al. (2012), o desenvolvimento padrão

do sistema nervoso central envolve o surgimento em sequência de vesículas encefálicas primárias e posteriormente secundárias, como foi observado neste ensaio, sinalizando a não interferência da iangambina nos primórdios do neurodesenvolvimento.

Na região cefálica de todos os embriões, o neuróporo anterior se fechou completamente, corroborando com a morfologia descrita por Hamburger e Hamilton (1951). Diferente do nosso estudo, Jiao et al. (2019) ao analisarem embriões tratados com 100 nM de ácido okadaico, filotoxina produzida por microalgas, observaram um fechamento irregular do neuróporo anterior. Segundo Liu et al. (2020), uma das consequências decorrentes do fechamento incompleto do tubo neural na região cefálica é a anencefalia, uma malformação congênita invariavelmente fatal, o que justifica a necessidade de investigar o fechamento do neuróporo anterior.

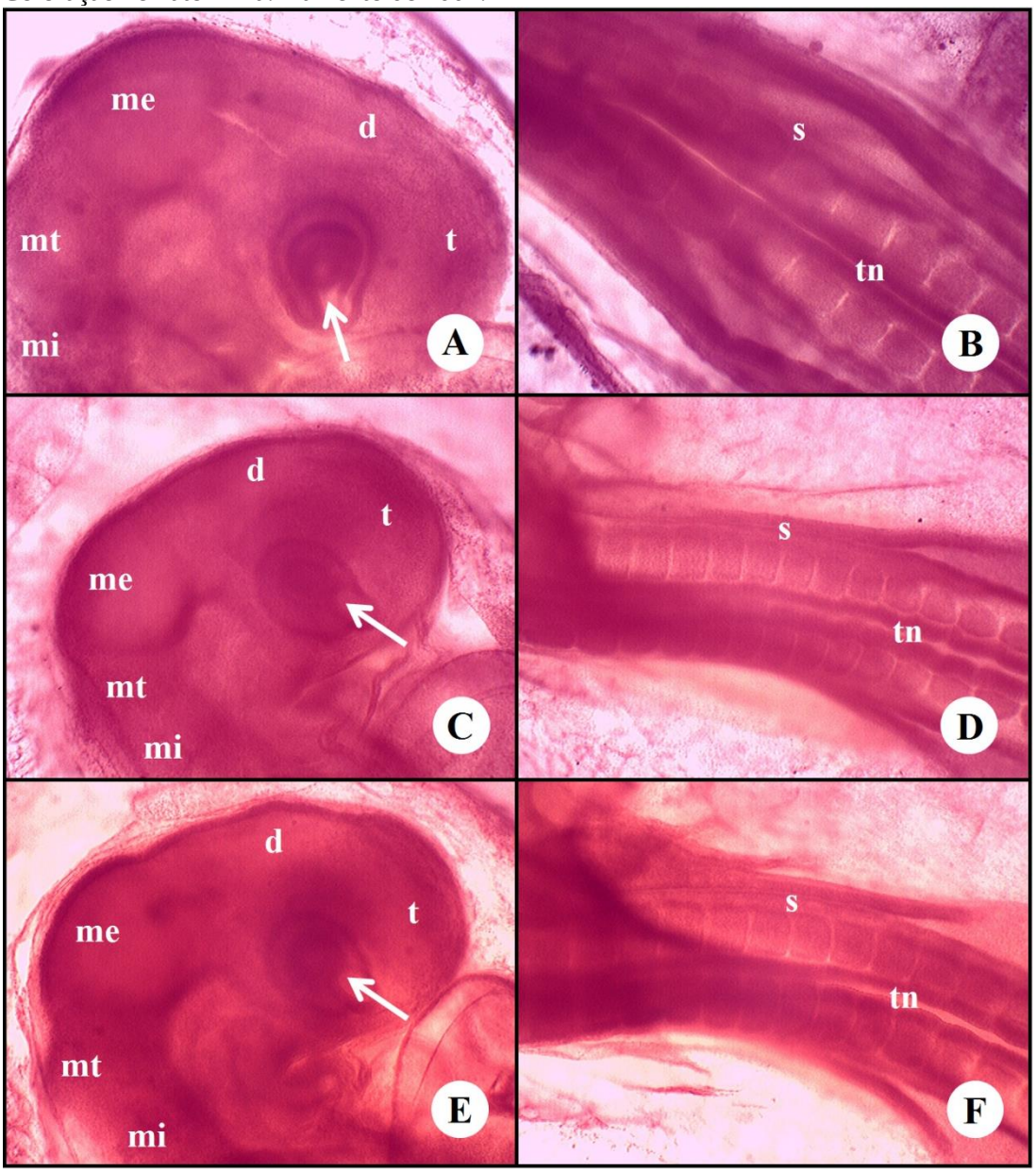
As vesículas ópticas de todos os embriões também apresentaram morfologia normal, como descrito por Hamburger e Hamilton (1951). De acordo com Hosseini e Taber (2018), no estádio 14 as vesículas ópticas, juntamente com o ectoderma de superfície, começam a invaginar para formar o placódio da lente, estrutura também denominada de cristalino. A ocorrência de malformações da lente pode desencadear defeitos congênitos, como microfacia (lente pequena), lente ectópica (posição anormal da lente), catarata congênita (lente opaca) e afacia (ausência da lente) demonstrando, portanto, a importância de analisar a morfologia das vesículas ópticas no referido estádio (OLTEAN; TABER, 2018).

Em toda a extensão da região caudal do tubo neural não foi evidenciada nenhuma anormalidade em todos os grupos, com somitos apresentando segmentação normal. Resultados semelhantes foram observados por Emon et al. (2015) ao avaliarem os efeitos do benzoato de sódio, um conservante alimentício, nos quais não foram evidenciados defeitos no tubo neural e os somitos apresentaram delimitações normais. De acordo com Lee e Gleeson (2020), o fechamento incompleto do tubo neural na região caudal ocasiona uma anomalia congênita denominada espinha bífida. Segundo Tsujimura et al. (2011), esta malformação é caracterizada pela protusão da medula espinhal e provoca deficiências físicas no pós-natal, como paralisia das pernas, além de anormalidades no quadril, joelho e pé, o que justifica a necessidade de investigar a morfologia da região caudal do tubo neural.

Na extremidade da região caudal, o nó de Hensen regrediu em todos os embriões, portanto, não ocorreu persistência da linha primitiva em nenhum grupo. De acordo com Cinelli et al. (2021), falhas no processo de regressão da linha primitiva originam um tumor raro na base do cóccix, denominado teratoma sacrococcígeo, constituído por derivados dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. Segundo Nakamura et al.

(2020), as complicações referentes a presença do teratoma sacrococcígeo incluem dificuldades de locomoção, comprometimento das funções intestinais, além de complicações urológicas, o que demonstra a relevância de analisar os efeitos da iangambina sobre o processo de regressão da linha primitiva.

Figura 23. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de montagem total, incubados por 48 horas, no estádio 14, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) nota-se a presença das vesículas encefálicas secundárias: telencéfalo (t), diencéfalo (d), mesencéfalo (me), metencéfalo (mt) e mielencéfalo (mi) que apresentam morfologia normal em ambos os grupos; também podem ser visualizadas as vesículas ópticas indicadas pela seta. Na região caudal do embrião (B, D e F) os somitos (s) encontram-se segmentados e o tubo neural (tn) não possui malformações. Coloração hematoxilina. Aumento de 100x.



Fonte: O autor.

Dos 60 ovos reservados para a técnica histológica de corte transversal, 48 continham embriões, e destes, 36 foram analisados morfologicamente.

Em todos os embriões analisados, a aorta dorsal e os folhetos embrionários apresentaram morfologia normal.

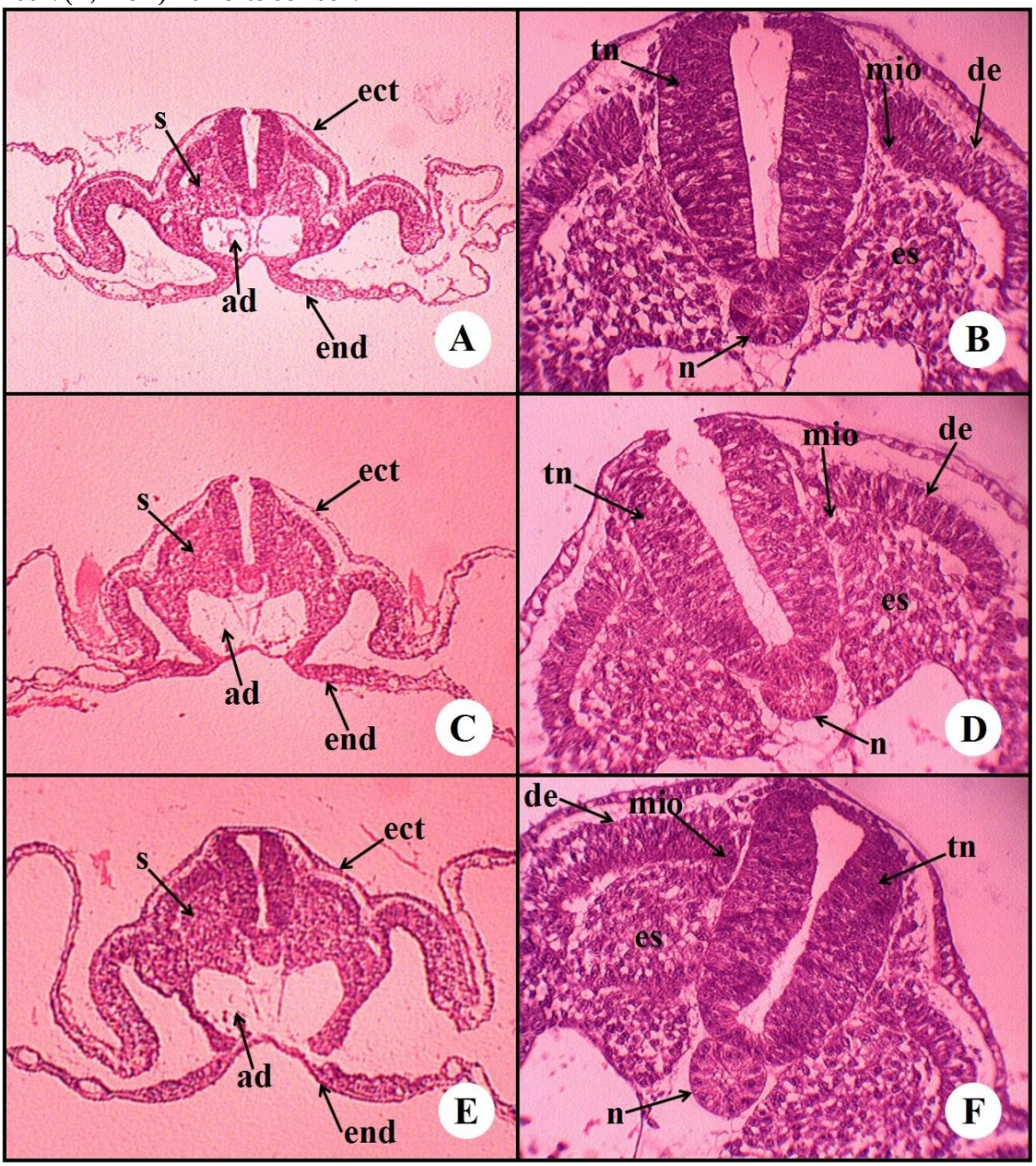
Segundo Seco et al. (2020), em embriões aviários a aorta surge como dois cordões longitudinais de células precursoras endoteliais (angioblastos), provenientes do mesoderma lateral esplâncnico, que coalescem formando dois vasos endoteliais. A fusão destes dois vasos transforma a aorta em um tubo único, no qual as células do teto e das laterais são derivadas dos somitos e as células do assoalho são provenientes do mesoderma lateral esplâncnico (JAFFREDO et al., 2013). A ocorrência de falhas no processo de formação da aorta pode comprometer o desenvolvimento embrionário, visto que este importante vaso sanguíneo estabelece uma conexão com a rede vascular extraembrionária, possibilitando a circulação sanguínea e consequentemente o fornecimento de nutrientes do saco vitelino para o embrião (TAKASE; TAKAHASHI, 2019).

O tubo neural de todos os embriões também demonstrou características dentro da normalidade, como o teto e o assoalho mais delgados do que as paredes laterais, não sendo identificada a ocorrência de defeitos, e a notocorda apresentou o seu característico formato arredondado. Diferente do nosso estudo, Ovalioglu et al. (2019) ao avaliarem embriões tratados com eritrosina, um corante alimentar, observaram defeitos no tubo neural de maneira dependente da dose.

Em todos os grupos (G1, G2 e G3), a estrutura dos somitos continuou preservada, sendo possível visualizar claramente as delimitações entre dermátomo, miótomo e esclerótomo (Figura 24). Diferente do nosso estudo, Duess et al. (2020) ao avaliarem os efeitos do composto Y-27632, um derivado da piridina, observaram somitos com suas delimitações definidas, em contrapartida houve morte celular elevada e o esclerótomo apresentou suas células mais dissociadas.

Segundo WOOD et al. (2020), com a maturação dos somitos, as suas células passam por um processo de diferenciação e formam o esclerótomo, o miótomo e o dermátomo, que são precursores das vértebras e costelas, dos músculos, e da derme, respectivamente. O que foi observado nos embriões de 48 horas, demonstrando que possivelmente não ocorreu nenhuma interferência da iangambina na diferenciação das estruturas dos somitos.

Figura 24. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de corte transversal, incubados por 48 horas, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Em (A, C e E) podem ser visualizados os folhetos embrionários: ectoderma (ect) e endoderma (end), e o somito (s) em processo de diferenciação com morfologia normal, e a aorta dorsal (ad) em processo de formação. Em (B, D e F) nota-se o teto e o assoalho do tubo neural (tn) com espessura delgada; a notocorda (n) apresenta uma delimitação normal; também é possível visualizar o somito dividido em dermátomo (de), miótomo (mio) e esclerótomo (es). Coloração hematoxilina - eosina. (A, C e E) Aumento de 100x. (B, D e F) Aumento de 400x.



Fonte: O autor.

5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*

A análise estatística realizada a partir dos dados morfométricos do tubo neural e da região cefálica demonstrou que os embriões incubados por 48 horas dos grupos G1, G2 e G3, pertencentes ao estádio 14, não apresentaram diferenças significativas (Figura 25).

No tubo neural, na altura do 9º par de somitos, o G1 apresentou uma largura média de 56,95 µm (± 1,961), o G2 60,58 µm (± 4,89) e o G3 57,98 µm (± 5,018). Não houve diferença estatística entre os grupos, sendo G1 vs G2 (p= 0,2077), G1 vs G3 (p = 0,8879) e G2 vs G3 (p= 0,4854).

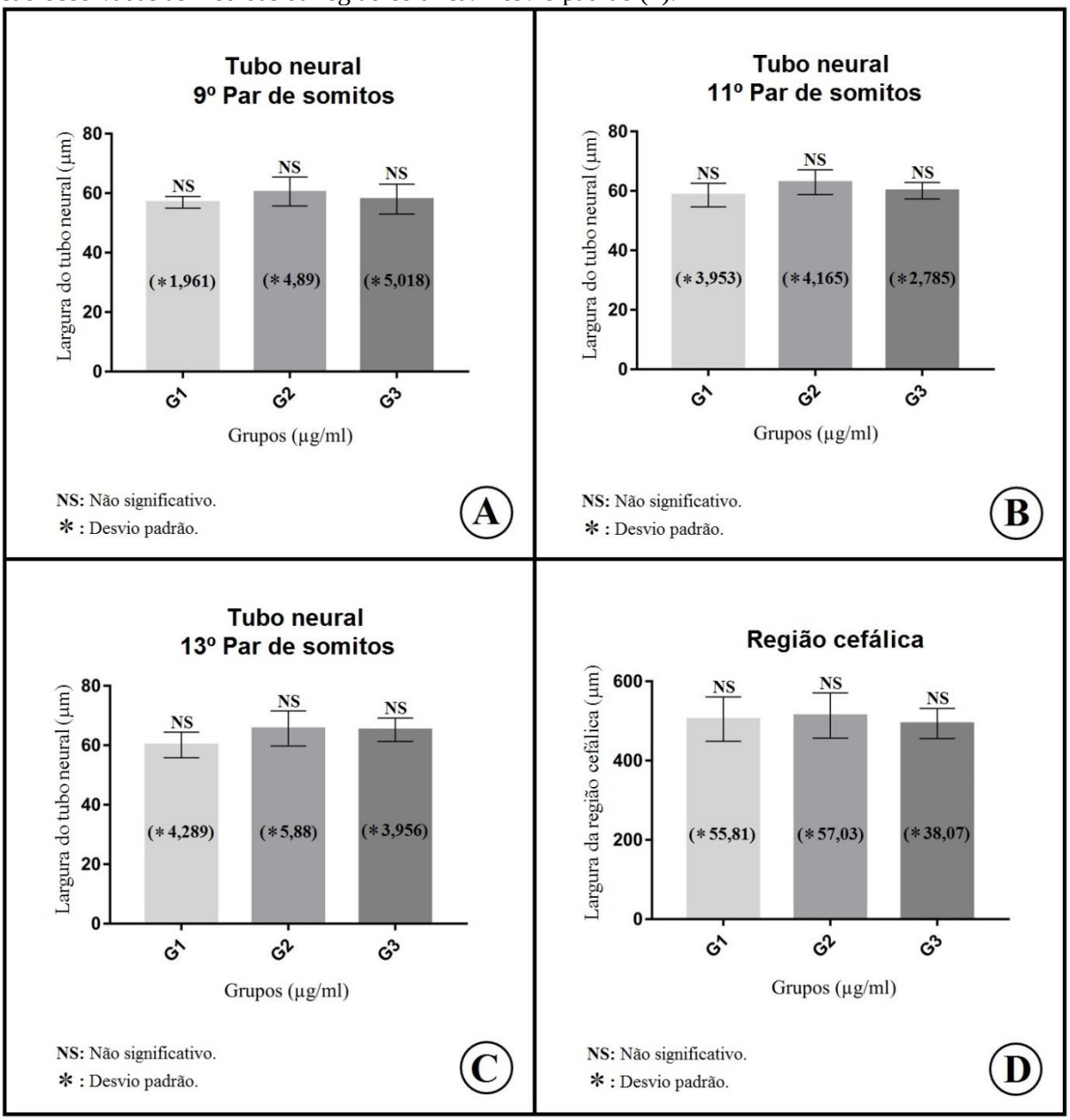
Na altura do 11º par de somitos do tubo neural, o G1 apresentou uma largura média de 58,6 µm (± 3,953), o G2 62,91 µm (± 4,165) e o G3 60,07 µm (± 2,785). Não houve diferença estatística entre os grupos, sendo G1 vs G2 (p= 0,0818), G1 vs G3 (p = 0,7543) e G2 vs G3 (p= 0,3613).

No tubo neural, na altura do 13º par de somitos, o G1 demonstrou uma largura média de 60,15 µm (± 4,289), o G2 65,66 µm (± 5,88) e o G3 65,23 µm (± 3,956). Não houve diferença estatística entre os grupos, sendo G1 vs G2 (p= 0,0853), G1 vs G3 (p = 0,1559) e G2 vs G3 (p= 0,9854).

A região cefálica do G1 apresentou uma largura média de 504,7 µm (± 55,81), o G2 513,9 µm (± 57,03) e o G3 493,6 µm (± 38,07). Não houve diferença estatística entre os grupos, sendo G1 vs G2 (p= 0,9341), G1 vs G3 (p = 0,9182) e G2 vs G3 (p= 0,7545).

Os resultados estatísticos da morfometria foram coerentes com os dados de observação da morfologia. Diferente do nosso estudo, Lima et al. (2017) ao observarem embriões tratados com a riparina III, um alcaloide isolado de *Aniba riparia* (Lauraceae), não detectaram a presença de defeitos no tubo neural através da análise morfológica. Em contrapartida, na análise morfométrica, identificaram um aumento na largura do tubo neural estatisticamente significante em todas as concentrações testadas, quando em comparação ao grupo controle. Em nosso estudo, a correlação entre os achados da morfologia e da morfometria sugerem que a iangambina não exerce influência no neurodesenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* nos experimentos realizados.

Figura 25. Análise estatística da morfometria do tubo neural e da região cefálica dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, incubados por 48 horas, no estádio 14. Em A, B e C são observadas as medidas da largura do tubo neural na altura do 9º, 11º e 13º par de somitos, respectivamente. Em D são observadas as medidas da região cefálica. Desvio padrão (*).



Fonte: O autor.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados morfológicos e morfométricos a iangambina não alterou o neurodesenvolvimento de embriões de *Gallus gallus domesticus* nas condições experimentais adotadas e mais estudos devem ser realizados para ampliar as investigações com relação aos mecanismos de ação da iangambina.

REFERÊNCIAS

AHMED, E.; ARSHAD, M.; KHAN, M. Z.; AMJAD, M. S.; SADAF, H. M.; RIAZ, I.; SABIR, S.; SABAOON, N. A. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, p. 205-214, 2017.

ALMEIDA, R. N.; PACHÚ, C. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida da *Ocotea duckei* Vattimo. **Revista Ciência Cultura e Saúde**, v.14, p. 7-10, 1995.

AMINI, H. R.; PAKDEL, A.; SHAHR-BABAK, H. M.; EGHBALSAIED, S. Developing a puncture-free in ovo chicken transfection strategy based on bypassing albumen nucleases. **Theriogenology**, v. 91, p. 90-97, 2017.

ANTONIO, A. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; WIEDEMANN, L. S. M. *Ocotea* complex: A metabolomic analysis of a lauraceae genus. **Phytochemistry**, v. 173, n. 112314, 2020.

ARAÚJO, I. C. S.; LEANDRO, N. S. M.; MESQUITA, M. A.; CAFÉ, M. B.; MELLO, H. H. C.; GONZALES, E. Effect of incubator type and broiler breeder age on hatchability and chick quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, n. spe2, p. 17-25, 2016.

ARAÚJO, I. G.; A.; SILVA, D. F.; ALUSTAU, M. C.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M.; CORREIA, N. A.; MEDEIROS, I. A. Calcium influx inhibition is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by yangambin. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6863-6876, 2014.

ARAUJO, R.C. Estudo toxicológico das drogas. Correlação clinicopatologia. *In*: SILVA, P. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.20, p.131-50.

ARNOSO, B. J. M.; COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

ATAY, E.; ERTEKIN, A.; BOZKURT, E.; ASLAN, E. Impact of Bisphenol A on neural tube development in 48-hr chicken embryos. **Birth Defects Research**, v. 112, n. 17, p. 1386-1396, 2020.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S.; MORAIS, L. C. S. L.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 231-238, 1999.

BARONE, R. P.; KNITTEL, D. K.; OOKA, J. K.; PORTER, L. N.; SMITH, N. T.; OWENS, D. K. The production of plant natural products beneficial to humanity by metabolic engineering. **Current Plant Biology**, n. 100121, 2019.

BEZERRA, J. W. A.; RODRIGUES, F. C.; COSTA, A. R.; CUNHA, F. A. B.; SILVA, V. B.; BOLIGON, A. A.; ANRAKU, M. M. *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (bamburral): Planta medicinal com potencial antioxidante e rica em polifenóis. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 24, n. 1, 2019.

BIRCHFIELD, A. S.; MCINTOSH, C. A. Metabolic Engineering and Synthetic Biology of Plant Natural Products – A Minireview. **Current Plant Biology**, n. 100163, 2020.

BOLIN, G.; DUBANSKY, B.; BURGGREN, W. W. Incubation relative humidity induces renal morphological and physiological remodeling in the embryo of the chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 204, p. 185-196, 2017.

BOVOLENTA, P.; MARTINEZ-MORALES, J. R. Genetics of congenital eye malformations: insights from chick experimental embryology. **Human genetics**, v. 138, n. 8, p. 1001-1006, 2019.

BOY, H. I. A.; RUTILLA, A. J. H.; SANTOS, K. A.; TY, A. M. T.; YU, A. I.; MAHBOOB, T.; TANGPOONG, J.; NISSAPATORN, V. Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**, v. 1, n. 2, p. 131-142, 2018.

CAMPOS, M. R. S. (Ed.). **Bioactive compounds**: health benefits and potential applications. Oxford: Woodhead Publishing, 2019.

CASTRO, M. I. A. L.; LUCENA, M. G. S.; SILVA, C. V. N. S.; XAVIER, Y. K. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TELES, M. M. R. S.; PEIXOTO, L. R.; SOUZA, I. A.; SILVA, E. C. Acute toxicity and cytogenotoxicity of yangambin isolated from *Ocotea duckei* vattimo-gil. **Pharmacognosy Research**, v. 12, n. 4, p. 444, 2020.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.; CRUZ, H. N.; SILVA, C. L. M.; VIOLANTE, F. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; THOMAS, G.; MARTINS, M. A.; TIBIRIÇÁ, E. V.; NOEL, F.; CORDEIRO, R. S. B. Yangambin: a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and in vitro functional studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 101-105, 1995a.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ARAUJO, C. V.; MOREIRA, S.; BOZZA, P. T.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRIÇÁ, E. V. Yangambin: a new naturally occuring platelet activating factor receptor antagonist: in vivo pharmacological studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 106-112, 1995b.

CINELLI, D. P.; STOICA, I.; ATWAN, F. PARAN, S. A rare presentation of Sacrococcygeal Teratoma as recurrent natal cleft abscess in childhood. **Journal of Pediatric Surgery Case Reports**, v. 64, p. 101727, 2021.

COBB-VANTRESS (2008) **Guia de Manejo de Incubação Cobb**. COBB: p. 1 – 46.

DEBNATH, B.; SINGH, W. S.; DAS, M.; GOSWAMI, S.; SINGH, M. K.; MAITI, D.; MANNA, K. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials today chemistry**, v. 9, p. 56-72, 2018.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

DRAGA, M.; HEIM, K.; BATKE, R.; WEGELE, M.; PRÖLS, F.; SCAAL, M. Somite development in the avian tail. **Journal of Anatomy**, v. 235, n. 4, p. 716-724, 2019.

DUESS, J. W.; GOSEMANN, J. H.; PURI, P.; THOMPSON, J. Teratogenesis in the chick embryo following post-gastrulation exposure to Y-27632-effect of Y-27632 on embryonic development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 409, p. 115277, 2020.

EMON, S. T.; ORAKDOGEN, M.; USLU, S.; SOMAY, H. Effects of the popular food additive sodium benzoate on neural tube development in the chicken embryo. **Turkish Neurosurgery**, v. 25, n. 2, p. 294-297, 2015.

ERTEKIN, T.; BILIR, A.; ASLAN, E.; KOCA, B.; TURAMANLAR, O.; ERTEKIN, A.; ALBAY, S. The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. **Folia morphologica**, v. 78, n. 2, p. 307-313, 2019.

FERREIRA, C. F. R. I.; BARROS, L. (Ed.). **Functional Food Ingredients from Plants**. Oxford: Academic Press, 2019.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JR., A. A.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M. et al. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39-45, 2012.

GARCIA, S.M.L.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

GARCIA, K. E.; OKAMOTO, R. J.; BAYLY, P. V.; TABER, L. A. Contraction and stress-dependent growth shape the forebrain of the early chicken embryo. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 65, p. 383-397, 2017.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. **A series of normal stages in the development of the chick embryo**. Journal of Morphology, v.88, p.49-92, 1951.

HAUSOTT, B.; GREGER, H.; MARIAN, B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 10, p. 569-576, 2003.

HERBERT, J. M.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BARBOSA, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRICA, E. Pharmacological evidence for the putative existence of two different subtypes of PAF receptors on platelets and leukocytes; studies with yangambin. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 1997.

HICKMAN, C. P. Jr.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A.; I'ANSON, H. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

HOSSEINI, H. S.; TABER, L. A. How mechanical forces shape the developing eye. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 137, p. 25-36, 2018.

HUTCHINS, E. J.; BRONNER, M. E. Draxin alters laminin organization during basement membrane remodeling to control cranial neural crest EMT. **Developmental biology**, v. 446, n. 2, p. 151-158, 2019.

ISHIKAWA, Y.; YAMAMOTO, N.; YOSHIMOTO, M.; ITO, H. The primary brain vesicles revisited: are the three primary vesicles (forebrain/midbrain/hindbrain) universal in vertebrates. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 79, n. 2, p. 75-83, 2012.

JAFFREDO, T.; LEMPEREUR, A.; RICHARD, C.; BOLLEROT, K.; GAUTIER, R.; CANTO, P. Y.; DREVON, C.; SOUYRI, M.; DURAND, C. Dorso-ventral contributions in the formation of the embryonic aorta and the control of aortic hematopoiesis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 51, n. 4, p. 232-238, 2013.

JESUS-MORAIS, C. M. Q.; ASSIS, E. F.; CORDEIRO, R. S. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, W. T.; SILVA, Z. L.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei* differentiates putative PAF receptor subtypes in the gastrointestinal tract of rats. **Planta Medica**, v. 66, n. 03, p. 211,216, 2000.

JIAO, Y. H.; LIU, M.; WANG, G.; LI, H. Y.; LIU, J. S.; YANG, X.; YANG, W. D. EMT is the major target for okadaic acid-suppressed the development of neural crest cells in chick embryo. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 180, p. 192-201, 2019.

JOMAA, J.; MARTÍNEZ-VARGAS, J.; ESSAILI, S.; HAIDER, N.; ABRAMYAN, J. Disconnect between the developing eye and craniofacial prominences in the avian embryo. **Mechanisms of Development**, v. 161, p. 103596, 2020.

KIM, J. Y.; LIM, H. J.; LEE, D. Y.; KIM, J. S.; KIM, D. H.; LEE, H. J.; KIM, H. D.; JEON, R.; RYU, J.-H. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 937- 940, 2009.

KMECICK, M.; COSTA, M. C. V.; RIBEIRO, C. A. O.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019.

KOHL, A.; GOLAN, N.; CINNAMON, Y.; GENIN, O.; CHEFETZ, B.; SELA-DONENFELD, D. A proof of concept study demonstrating that environmental levels of carbamazepine impair early stages of chick embryonic development. **Environment international**, v. 129, p. 583-594, 2019.

LEE, S.; GLEESON, J. G. Closing in on Mechanisms of Open Neural Tube Defects. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 7, p. 519-532, 2020.

LI, S.; BAI, S.; QIN, X.; ZHANG, J.; IRWIN, D. M.; ZHANG, S.; WANG, Z. Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*). **Poultry science**, v. 98, n. 8, p. 3278-3291, 2019.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

LI, Y.; XIE, S.; YING, J.; WEI, W.; GAO, K. Chemical structures of lignans and neolignans isolated from Lauraceae. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3164, 2018.

LIMA, L. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, R. M. P. L.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C. Riparin III effect on the development of neural tube embryos of *Gallus gallus*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 14, p. 178-185, 2017.

LIU, M.; JIN, L.; YU, J.; SU, Z.; SUN, Y.; LIU, Y.; XIE, Q.; LI, Z.; WANG, L.; REN, A. Essential trace elements in umbilical cord tissue and risk for neural tube defects. **Reproductive Toxicology**, v. 98, p. 149-156, 2020.

LØTVEDT, P.; JENSEN, P. Effects of hatching time on behavior and weight development of chickens. **PloS one**, v. 9, n. 7, 2014.

MA, Z. L.; WANG, G.; CHENG, X.; CHUAI, M.; KURIHARA, H.; LEE, K. K. H.; YANG, X. Excess caffeine exposure impairs eye development during chick embryogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1134-1143, 2014.

MAHAJAN, M.; KUIRY, R.; PAL, P. K. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 100255, 2020.

MARQUES, R. C. P.; DE MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. D.; BARBOSA, J. M.; AGNEZ-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1-2, p. 117-120, 2003.

MATSUTANI, K.; IKEGAMI, K.; AOYAMA, H. An in vitro model of region-specific rib formation in chick axial skeleton: Intercellular interaction between somite and lateral plate cells. **Mechanisms of development**, v. 159, p. 103568, 2019.

MEWALAL, R.; RAI, D. K.; KAINER, D.; CHEN, F.; KULHEIM, C.; PETER, G. F.; TUSKAN, G. A. Plant-derived terpenes: A feedstock for specialty biofuels. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 227-240, 2017.

MONTE-NETO, R. L.; BARBOSA, J. M.; SOUSA, L. M.; ATHAYDE, P. F.; DIAS, C. S.; OLIVEIRA, M. R. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v. 62c, p. 348-352, 2007.

MONTE-NETO, R. L ; SOUSA, L. M. A. ; DIAS, C. S. ; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, M. R. Yangambin cytotoxicity: a pharmacologically active lignan obtained from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v. 63, p. 681-686, 2008.

MONTE-NETO, R. L.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Morphological and physiological changes in Leishmania promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215-221, 2011.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MORI, N.; FURUTA, A.; WATANABE, H. Electochemical asymmetric dimerization of cinnamic acid derivatives and application to the enantioselective syntheses of furofuran lignans. **Tetrahedron**, v. 72, n. 51, p. 8393-8399, 2016.

MUHAMMAD, A.; FENG, X.; RASOOL, A.; SUN, W.; LI, C. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. 107555, 2020.

NAKAMURA, M.; MORIYA, K.; HONDA, S.; ARA, M.; NISHIMURA, Y.; KON, M.; CHIBA, H.; KITTA, T.; SHINOHARA, N. Congenital urogenital sinus anomaly in a patient with sacrococcygeal teratoma. **Journal of Pediatric Surgery Case Reports**, v. 61, p. 101587, 2020.

NYS, Y.; GUYOT, N. Egg formation and chemistry. *In*: **Improving the safety and quality of eggs and egg products**. Woodhead Publishing, 2011. p. 83-132.

OLTEAN, A.; TABER, L. A. Apoptosis generates mechanical forces that close the lens vesicle in the chick embryo. **Physical biology**, v. 15, n. 2, p. 025001, 2018.

OVALIOGLU, A. O.; OVALIOGLU, T. C.; ARSLAN, S.; CANAZ, G.; AYDIN, A. E.; SAR, M.; EMEL, E. Effects of Erythrosine on Neural Tube Development in Early Chicken Embryos. **World neurosurgery**, v. 134, p. e822-e825, 2019.

OYÁ. Intérprete: Samico. Compositores: Samico; Barro; R. Félix. *In*: SAMICO. Intérprete: Samico. Recife: Tratore, 2019. 1 CD, faixa 7.

ÖZEREN, E.; ER, U.; GÜVENÇ, Y.; DEMIRCI, A.; ARIKÖK, A. T.; ŞENVELI, E.; ERGÜN, R. B. The effect of flurbiprofen on the development of anencephaly in early stage chicken embryos. **British Journal of Neurosurgery**, v. 29, n. 2, p. 265-271, 2015.

PACHÚ, C. O.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Atividade depressora do sistema nervoso central pela iangambina. **Revista Ciência Cultura e Saúde**, v.12, p. 14-16, 1993.

PAULERT, R; PUJARRA, S.; OLIVEIRA, F. G.; ZONETTI, P. C.; RUPPELT, B. M. Utilização popular de plantas medicinais nos clubes de mães de Palotina-PR. **Revista Ciência em Extensão**, v. 10, n. 2, p. 55-64, 2014.

POHMAKOTR, M.; KUHAKARN, C.; REUTRAKUL, V.; SOORUKRAM, D. Asymmetric synthesis of furofurans. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 51, p. 4740-4746, 2017.

POKHREL, N.; BEN-TAL COHEN, E.; GENIN, O.; RUZAL, M.; SELA-DONENFELD, D.; CINNAMON, Y. Effects of storage conditions on hatchability, embryonic survival and cytoarchitectural properties in broiler from young and old flocks. **Poultry science**, v. 97, n. 4, p. 1429-1440, 2018.

POKHREL, N.; BEN-TAL COHEN, E.; GENIN, O.; SELA-DONENFELD, D.; CINNAMON, Y. (2017). Cellular and morphological characterization of blastoderms from freshly laid broiler eggs. **Poultry science**, v. 96, n. 12, p. 4399-4408, 2017.

POURQUIÉ, O. Somite formation in the chicken embryo. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1-2-3, p. 57-62, 2018.

PRASAD, M. S.; URIBE-QUEROL, E.; MARQUEZ, J.; VADASZ, S.; YARDLEY, N.; SHELAR, P. B.; CHARNEY, R. M.; GARCÍA-CASTRO, M. I. Blastula stage specification of avian neural crest. **Developmental biology**, v. 458, n. 1, p. 64-74, 2020.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive toxicology**, v. 70, p. 97-101, 2017.

RIBEIRO, R.; CARVALHO, F. A. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRIÇÁ, E. V. Protective effect of yangambin-a naturaly occuring pletelet activiting factor (PAF) receptor antagonist on anaphylatic shock in rats. **Phytomedicine**, v. 3, p. 249-256, 1996.

ROCHA, F. A. G; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 31, n. 1, p. 49-61, 2015.

RUFF, J.; BARROS, T. L.; TELLEZ JR, G.; BLANKENSHIP, J.; LESTER, H.; GRAHAM, B. D.; SELBY, C. A. M.; VUONG, C. N.; DRIDI, S.; GREENE, E. S.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; HARGIS, B. M.; TELLES-ISAIAS, G. Research Note: Evaluation of a heat stress model to induce gastrointestinal leakage in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1687-1692, 2020.

SCHÜLER-FACCINI, L.; LEITE, J. C. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; PERES, M. R. Avaliação de teratógenos potenciais na população brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SECO, P.; MARTINS, G. G.; JACINTO, A.; TAVARES, A. T. A Bird's Eye View on the Origin of Aortic Hemogenic Endothelial Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. 605274, 2020.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O.; PEREIRA, A. P. B.; LIMA, M. C. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Anti-allergic properties of natural PAF antagonist yangambin. **Planta Medica**, v.63, p. 207-212, 1997.

SHIH, P. M. Towards a sustainable bio-based economy: Redirecting primary metabolism to new products with plant synthetic biology. **Plant Science**, v. 273, p. 84-91, 2018.

SILVA, M.; LABAS, V.; NYS, Y.; RÉHAULT-GODBERT, S. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. **Poultry science**, v. 96, n. 8, p. 2931-2941, 2017.

SILVA, M. R. O.; SANTOS, M. H. L. C. Medical plants: from Colonial Brazil to their indication by the National Single Health System–SHS. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 9, p. 165-173, 2019.

SOUSA, F. C. F.; PEREIRA, B. A.; LIMA, V. T. M.; LACERDA, C. D. G.; MELO, C. T. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B. Central nervous system activity of yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 282-286, 2005.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 4, p. 273-284, 2007.

TAKASE, Y.; TAKAHASHI, Y. Blood flow-mediated gene transfer and siRNA-knockdown in the developing vasculature in a spatio-temporally controlled manner in chicken embryos. **Developmental biology**, v. 456, n. 1, p. 8-16, 2019.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 51-88, 2019.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural product reports**, v. 33, n. 9, p. 1044-1092, 2016.

TIBIRIÇÁ, E. Cardiovascular properties of yangambin, a lignan isolated from brazilian plants. **Cardiovascular Drug Reviews**., v.19, n.4, p.313-328, 2001.

TIBIRIÇÁ, E. V.; MOSQUERA, K.; ABREU, M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, F. A. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B. Antagonistic effect of yangambin on platelet activing factor (PAF)-induced cardiovascular collapse. **Phytomedicine**, v. 2, p. 235-242, 1996.

TSUJIMURA, R.; MOMINOKI, K.; KINUTANI, M.; SHIMOKAWA, T.; DOIHARA, T.; NABEKA, H.; WAKISAKA, H.; KOBAYASHI, N.; MATSUDA, S. Sensory tract abnormality in the chick model of spina bifida. **Neuroscience research**, v. 71, n. 1, p. 85-91, 2011.

TURGUT, U.; KAZAN, S.; CAKIN, H; OZAK, A. Valproic acid effect on neural tube defects is not prevented by concomitant folic acid supplementation: Early chick embryo model pilot study. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 78, p. 45-48, 2019.

ULLAH, R.; ALQAHTANI, A. S.; NOMAN, O. M. A.; ALQAHTANI, A. M.; IBENMOUSSA, S.; BOURHIA, M. A review on ethno-medicinal plants used in traditional medicine in the Kingdom of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020.

VANCAMP, P.; DARRAS, V. M. Dissecting the role of regulators of thyroid hormone availability in early brain development: Merits and potential of the chicken embryo model. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 459, p. 71-78, 2017.

VARELIS, P.; MELTON, L.; SHAHIDI, F. **Encyclopedia of Food Chemistry**. v. 3. Oxford: Elsevier, 2019.

VERMILLION, K. L.; BACHER, R.; TANNENBAUM, A. P.; SWANSON, S.; JIANG, P.; CHU, LI-FANG.; STEWART, R.; THOMSON, J. A.; VEREIDE, D. T. Spatial patterns of gene expression are unveiled in the chick primitive streak by ordering single-cell transcriptomes. **Developmental biology**, v. 439, n. 1, p. 30-41, 2018.

VERRI, A. M.; MOURA, A. A.; MOURA, V. M.. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista Uningá**, v. 30, n. 1, 2017.

WANG, G.; ZHANG, N.; WEI, Y. F.; JIN, Y. M.; ZHANG, S. Y.; CHENG, X.; MA, Z. L.; ZHAO, S. Z.; CHEN, Y. P.; CHUAI, M.; HOCHER, B.; YANG, X. The impact of high-salt exposure on cardiovascular development in the early chick embryo. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 21, p. 3468-3477, 2015.

WANG, W.; XU, J.; FANG, H.; LI, Z.; LI, M. Advances and challenges in medicinal plant breeding. **Plant Science**, n. 110573, 2020.

WARD, L.; PANG, A. S. W.; EVANS, S. E.; STERN, C. D. The role of the notochord in amniote vertebral column segmentation. **Developmental biology**, v. 439, n. 1, p. 3-18, 2018.

WIRTH, M. J.; ACKELS, T.; KRIEBEL, A.; KRIEBEL, K.; MEY, J.; KUENZEL, T.; WAGNER, H. Expression Patterns Of Chloride Transporters In The Auditory Brainstem Of Developing Chicken. **Hearing Research**, p. 108013, 2020.

WOOD, W. M.; OTIS, C.; ETEMAD, S.; GOLDHAMER, D. J. Development and patterning of rib primordia are dependent on associated musculature. **Developmental biology**, v. 468, n. 1-2, p. 133-145, 2020.

WOLPERT, L.; TICKLE, C.; ARIAS, A. M. **Principles of development**. 6.ed. New York: Oxford university press, 2019.

XU, G.; KEMP, P. S.; HWU, J. A.; BEAGLEY, A. M.; BAYLY, P. V.; TABER, L. A. Opening angles and material properties of the early embryonic chick brain. **Journal of biomechanical engineering**, v. 132, n. 1, 2010.

YAMAMOTO, F. Y.; NETO, F. F.; FREITAS, P. F.; RIBEIRO, C. A. O.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548-555, 2012.

YIN, Z.; LIAN, L.; ZHU, F.; ZHANG, Z. H.; HINCKE, M.; YANG, N.; HOU, Z. C. The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (*Gallus gallus*) egg formation. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 243-251, 2020.

ZÁLEŠÁK, F.; BON, D. J. Y. D.; POSPÍŠIL, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, v. 146, p. 104284, 2019.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, M. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, M. H.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; SHARIF, Y.; ZAFAR, M. H.; KHALID, H. A.; KHAN, A. Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 137, p. 103728, 2019.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1-10, 2020.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE: OFÍCIO N.º 37/18

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Moraes Rego, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fone: 2126 8540 | 2126 8331
www.cb.ufpe.br

Recife, 13 de junho de 2018

Ofício nº 37/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para **Prof.ª Eliete Cavalcanti da Silva**
Departamento de Histologia e Embnologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.010939/2018-31**

Certificamos que a proposta intitulada "**Caracterização morfológica de embriões de Galos gallus domesticus L. exposta a produtos naturais e sintéticos bioativos com ênfase no desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardiovascular e teratogênese**", Registrada com o **nº 23076.010939/2018-31** sob a responsabilidade de **Prof.ª Eliete Cavalcanti da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 06/06/2018

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/06/2018 a 01/05/2022
Espécie/linhagem/raça	*Embriões de Galos gallus domesticus*
Nº de animais	1200
Peso/Idade	Embriões
Sexo	Machos e fêmea
Origem	G-3 Agrovicola Ltda

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584