

**UNIVERSIDADE PAULISTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E  
EXPERIMENTAL**

**PREJUÍZO NO COMPORTAMENTO E DANO NO SISTEMA  
REPRODUTOR DE RATOS WISTAR APÓS  
ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DOS FRUTOS  
DE *LUFFA OPERCULATA* (L.) COGN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**CINTHIA DOS SANTOS ALVES**

**SÃO PAULO  
2017**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E**  
**EXPERIMENTAL**

**PREJUÍZO NO COMPORTAMENTO E DANO NO SISTEMA**  
**REPRODUTOR DE RATOS WISTAR APÓS**  
**ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DOS FRUTOS**  
**DE *LUFFA OPERCULATA* (L.) COGN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana B. Suffredini.

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Martha Bernardi.

**CINTHIA DOS SANTOS ALVES**

**SÃO PAULO**

**2017**

Rocha, Cinthia dos Santos Alves.

Prejuízo no comportamento e dano no sistema reprodutor de ratos wistar após a administração do extrato aquoso dos frutos de *Luffa operculata* / Cinthia dos Santos Alves Rocha. - 2017.

85 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ivana B. Suffredini.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Martha Bernardi.

1. Buchinha-do-norte. 2. Ansiedade. 3. Reprodutório. 4. Campo aberto. 5. Caixa claro-escuro. I. Suffredini, Ivana B. (orientadora). II. Bernardi, Maria Martha (coorientadora). III. Título.

**CINTHIA DOS SANTOS ALVES**

**PREJUÍZO NO COMPORTAMENTO E DANO NO SISTEMA  
REPRODUTOR DE RATOS WISTAR APÓS  
ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DOS FRUTOS  
DE *LUFFA OPERCULATA* (L.) COGN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**São Paulo, 21 de Junho de 2017.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ivana B. Suffredini  
Universidade Paulista

---

Prof. Profa Dr. Thiago Berti Kirsten  
Universidade Paulista

---

Prof. Elizabeth Teodoro  
Universidade Federal do ABC

## RESUMO

A buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) é usada popularmente para aliviar sintomas da sinusite. Informações a respeito da influência da administração da planta sobre o comportamento e sobre o sistema reprodutor de machos não são conhecidas. O presente estudo visou à verificação da influência da aplicação do extrato aquoso de buchinha-do-norte (EBN) em ratos Wistar adultos em relação ao comportamento e ao sistema reprodutor. Foram usados o campo aberto (CA) e o teste claro-escuro (TCE) para avaliação comportamental. Os ratos foram divididos em dois grupos, o grupo de controle (GC) e o grupo experimental (GE). O GE recebeu 1,0 mg/kg por dia de EBN, via oral, durante cinco dias consecutivos, enquanto o GC recebeu água. Após este período, cada animal foi avaliado em CA e em TCE por três min. Depois, os animais foram eutanasiados e os testículos esquerdos foram retirados. No campo aberto, os animais do GE apresentaram diminuição na locomoção e permaneceram menos tempo no centro do aparato, demonstrando uma possível ansiedade. No teste claro-escuro, os animais do GE mostraram maior dificuldade de passar para o lado claro do aparato, com maior permanência no lado escuro, menor deslocamento em ambos os lados, além de terem trocado menos de lado. Estas características podem estar relacionadas ao aparecimento de ansiedade no GE. O peso dos testículos, os pesos relativos, o volume testicular e os eixos craniocaudal e látero-lateral apresentaram aumento em relação ao GC. Alterações microscópicas também foram observadas no parênquima, na luz e no diâmetro dos túbulos seminíferos. A administração de EBN alterou de modo significativo a ansiedade, a locomoção e os testículos de ratos.

**Palavras-chave:** buchinha-do-norte, ansiedade, sistema reprodutor, campo aberto, caixa claro-escuro.

## ABSTRACT

Buchinha-do-norte (*Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae) is popularly used to relieve symptoms of sinusitis, although information on the influence of plant administration over behavior and over the male reproductive system is scarce in the literature and extremely prospective. The present study aims to fulfill the gap of information focusing on quantitatively overseeing the question. The strategy was to observe rat locomotion and anxiety in the open field (OF) and in the light-dark test (LDT), and then observe the macroscopical and microscopical alterations on rats testis. Rats were divided into two groups, control (GC) and experimental (GE). GE received 1.0 mg/kg per day of EBN, orally, for five consecutive days, while GC received water following the same posology. In the 6<sup>th</sup> day, each animal was evaluated in OF and in LDT for three min each apparatus. Afterwards, the animals were euthanized and the left testicles were removed. In the OF, GE animals showed decreased locomotion and remained less time in the center of the apparatus, demonstrating a possible anxiety. In the LDT, GE animals showed significant difficulty in moving into the light side of the device, remained longer in the dark side, less displacement on both sides and less transitions between sides. These characteristics may be related to the occurrence of anxiety in the GE induced by the EBN administration. Testicle weights, relative weights, testicular volume, cranio-caudal and laterolateral axes presented an increase in relation to the CG. Microscopic changes were also observed in the parenchyma, lumen and diameter of the seminiferous tubules. The administration of EBN significantly altered anxiety, locomotion and the testes of rats.

**Key-words:** *buchinha-do-norte*, anxiety, reproductive system, open field, light-dark box.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** – Frutos secos e fruto maduro de *Luffa operculata*.....11
- FIGURA 2** – Esqueleto de cucurbitanos, grupo representado na família das cucurbitaceae, existente nas cucurbitacinas.....17
- FIGURA 3** – Corte transversal de testículo representando as células de Sertoli e células da linhagem germinativa (espermatogônia, espermatócitos e espermátide) no interior dos túbulos seminíferos e as células de Leydig.....23
- FIGURA 4** – Fruto seco de *Luffa operculata* e a balança analítica utilizada para fazer a pesagem de cada fruto.....26
- FIGURA 5** – Testículos em processamento pela técnica histológica com o fixador de Bouin. ....31
- FIGURA 6** – Cortes histológicos transversais de testículo de ratos Wistar observados em microscópio óptico em aumento de 100X, corados com hematoxilina e eosina. A. Testículos dos ratos do grupo controle. B. Testículos dos ratos do grupo experimental.....32
- FIGURA 7** – Delineamento experimental para a avaliação da influência da administração oral de extrato de buchinha-do-norte em ratos Wistar.....34
- FIGURA 8** – Resultados comportamentais obtidos da análise em campo aberto de ratos Wistar adultos após administração do extrato aquoso dos frutos de *Luffa operculata*. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .....36

**FIGURA 9** – Resultados obtidos da análise comportamental em caixa claro-escuro após administração de buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) em ratos Wistar adultos. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .....38

**Figura 10** – Resultados complementares obtidos da análise comportamental em caixa claro-escuro após administração de buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) em ratos Wistar adultos. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .....40

**Figura 11** – Resultados obtidos da avaliação dos parâmetros macroscópicos dos testículos de ratos Wistar adultos tratados com buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .....42

**Figura 12** – Resultados obtidos da avaliação dos parâmetros microscópicos dos testículos de ratos Wistar adultos tratados com buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .....44

**Figura 13** – Resultados obtidos da avaliação dos pesos dos animais no dia da eutanásia e o peso dos animais antes e após a administração com buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) em ratos Wistar adultos. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .....45



## ABREVIATURAS

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animal

CIT/SC – Centro de Informação Toxicológica/Santa Catarina

CONCEA – Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal

EBN – Extrato aquoso de buchinha-do-norte

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GC – Grupo controle

GE – Grupo experimental

HE – Hematoxilina-eosina

IVAS – Infecções das vias aéreas superiores

LH – Hormônio luteinizante

OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development*, as diretrizes

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAS – Ácido periódico de Schiff

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUS – Sistema Único de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>13</b>
2.1. Infecções das vias aéreas superiores.....	13
2.2. Plantas medicinais.....	13
2.2.1. <i>Plantas medicinais na História. Breve relato.....</i>	<i>13</i>
2.2.2. <i>Uso de plantas medicinais no Brasil.....</i>	<i>14</i>
2.2.3. <i>Uso de plantas medicinais no tratamento da sinusite .....</i>	<i>15</i>
2.2.4. <i>Uso de Luffa operculata na sinusite e ausência de relatos de sua                 utilização por homens acometidos.....</i>	<i>15</i>
2.3. A família Cucurbitaceae.....	16
2.4. O gênero <i>Luffa</i> Mill.....	18
2.4.1 <i>Dados botânicos do gênero Luffa Mill.....</i>	<i>18</i>
2.4.2 <i>Dados químicos e farmacológicos do gênero Luffa Mill.....</i>	<i>18</i>
2.5. <i>Luffa operculata</i> (L.) Cogn.....	19
2.5.1. <i>Dados botânicos.....</i>	<i>19</i>
2.5.2. <i>Dados farmacológicos.....</i>	<i>20</i>
2.5.3. <i>Dados químicos.....</i>	<i>21</i>
2.6. Análise comportamental de ratos.....	21
2.7. Sistema reprodutor masculino.....	23
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>26</b>
4.1. Droga vegetal.....	26
4.2. Obtenção do extrato aquoso pelo método baseado no uso tradicional da droga vegetal.....	26
4.3. Animais.....	27
4.4. Comissão de Ética para o Uso de Animal em Experimentação Científica.....	27
4.5. Avaliação em campo aberto.....	28
4.6. Avaliação em caixa claro-escuro como medida de ansiedade.....	29
4.7. Avaliação de alterações macroscópicas e histopatológicas dos	

testículos.....	30
4.7.1 <i>Técnica histológica usada para análise microscópica dos testículos...</i>	30
4.8. Delineamento experimental .....	33
4.9. Análises estatísticas .....	35
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1. Resultados botânicos.....	35
5.2. Resultados comportamentais.....	35
5.2.1. <i>Campo aberto.....</i>	<i>35</i>
5.2.2. <i>Caixa claro-escuro.....</i>	<i>38</i>
5.2.3. <i>Avaliação macroscópica e microscópica de testículos.....</i>	<i>42</i>
5.2.4. <i>Peso corporal do rato antes da eutanásia e peso corporal antes e depois do tratamento.....</i>	<i>46</i>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que de 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005).

No intuito de evitar possíveis efeitos colaterais de medicamentos, muitos consomem plantas medicinais. Para o tratamento da sinusite, por exemplo, diferentes preparados de plantas são usadas pela população, como o decocto de semente de girassol (*Helianthus annuus* L.), o decocto dos frutos da buchinha-do-norte (*Luffa operculata* L. Cogn.), o infuso da planta inteira de capim-de-são-josé (*Cymbopogon martinii* Roxb. – J. F. Watson), a alfazema (*Lavandula angustifolia* Miller), o alho (*Allium sativum* L.), o eucalipto (*Eucalyptus citriodora* L.) e o limão galego (*Citrus limon* L. – Burman F.) (GRANDI, 1989).

Muitas destas plantas apresentam efeitos colaterais importantes; por exemplo, o alho, que não deve ser consumido por pessoas com problemas de coagulação sanguínea (CHAN et al., 2007), e a buchinha-do-norte, conhecida por seus efeitos abortivos.

É frequente o questionamento sobre a utilização de plantas medicinais, uma vez que há uma crença disseminada sobre a segurança relativa ao consumo de produtos de origem natural. Embora de uso cotidiano, chás preparados com determinadas plantas podem causar efeitos tóxicos e interações medicamentosas (STODDARD et al., 2015). A eficácia e a segurança de plantas medicinais devem ser comprovadas, inclusive nos casos de seu uso na gravidez e durante a lactação (CLARKE, 2007).

A buchinha-do-norte é uma das espécies popularmente usadas contra a sinusite. Porém, apresenta efeito colateral abortivo e, frequentemente, encontram-se relatos populares de consumo para esse fim. É usada na medicina homeopática e alternativa (MENON MIYAKE et al., 2005), e também é conhecida popularmente como cabacinha, buchinha, bucha-dos-paulistas, purga-de-João-Pais, entre outros

(MENGUE et al., 2001). É originária da América Tropical e cultivada principalmente no Nordeste e Norte do Brasil. Seu fruto, a parte utilizada, é ovoide-oblongo, com aspecto amarronzado quando seco; seu interior é esponjoso, formado por um tecido reticulado, às vezes utilizado como “esponja vegetal”. Chás do fruto (fig. 1) são conhecidos na medicina popular pelo seu efeito purgativo; já os frutos secos (fig. 1) têm indicação contra rinite e sinusite, administrada através de inalação ou solução nasal em gotas, o que resulta em potencial aumento dos casos de intoxicação (MENGUE et al., 2001).

Figura 1. Frutos secos e fruto maduro de *Luffa operculata*.



As infecções das vias aéreas superiores (IVAS) são alguns dos problemas mais comuns encontrados, principalmente em crianças, resultando em morbidade significativa em todo o mundo (PITREZ, 2003). A sinusite, por exemplo, é uma IVAS e pode ser definida como infecção bacteriana dos seios paranasais. Os seios paranasais são constituídos por cavidades pertencentes a quatro estruturas ósseas: maxilar, etmoidal, frontal e esfenoidal. Estas cavidades comunicam-se com as fossas nasais através de pequenos orifícios (óstios). Os seios frontais e esfenoidais desenvolvem-se após os 4 anos de idade, atingindo seu tamanho adulto somente na puberdade (PITREZ, 2003).

Segundo depoimentos de usuários, a utilização em casos de sinusite pode causar graves irritações e hemorragias nasais (MENGUE et al., 2001). Alguns tipos

de intoxicação registrados estão relacionados, de modo geral, com tentativas de aborto. Assim, após a ingestão de quantidade variável do chá preparado com o fruto seco, ocorreram abortos em dez casos registrados junto ao Centro de Informação Toxicológica de Santa Catarina (CIT/SC), com mulheres entre 19 e 26 anos de idade (MENGUE et al., 2001).

No Brasil, a infusão (chá) do fruto seco de buchinha-do-norte é utilizada para fazer inalação ou instilação nasal, e resulta em liberação profusa de muco, aliviando os sintomas nasossinusais. Há alguns relatos da ocorrência de irritação nasal, epistaxe e anosmia devido à alta toxicidade (MENON, 2005).

A infertilidade masculina afeta cerca de 10% dos casais em idade reprodutiva em todo o mundo e pode ser tratada em muitos casos. Infertilidade pode ser definida como a incapacidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabelecer uma gravidez dentro do período de um ano (PASQUALOTTO, 2007).

As causas da infertilidade masculina podem ser de origem genética, endócrina, imunológica e ambiental, por sua toxicidade. Teoricamente, os agentes químicos podem lesar a espermatogênese em qualquer fase, desde a espermatogônia até o espermatozoide maduro (PARADA, 2004).

Há uma ausência de informações na literatura sobre efeitos colaterais ligados ao consumo de buchinha-do-norte, particularmente sobre o comportamento e sobre o sistema reprodutivo em indivíduos do sexo masculino. Diante do exposto, espera-se identificar os efeitos do uso desta planta em ratos, e avaliar se isso causa algum distúrbio comportamental e se altera, de algum modo, o sistema reprodutor desses animais.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Infecções das vias aéreas superiores

As IVAS são um dos problemas mais comuns apresentados em serviços de atendimento médico, sendo mais prevalente na pediatria, resultando em morbidade significativa em todo o mundo. As IVAS são a causa mais comum de crianças atendidas em função de infecção respiratória aguda. Algumas dessas patologias são rinofaringite aguda, sinusite aguda, faringoamigdalite aguda estreptocócica e laringite viral aguda (PITREZ, 2003).

A sinusite aguda é uma das mais frequentes afecções do trato respiratório, sendo sua prevalência em, aproximadamente, 20% da população geral (MONTEIRO, 2002). As sinusites, que na maioria dos casos são complicações bacterianas secundárias de infecções virais previamente instaladas no trato respiratório alto, têm como agentes etiológicos principais o *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* (50% dos casos). O tratamento de primeira escolha é a amoxicilina (BERQUÓ, 2004), um quimioterápico antibacteriano da família das penicilinas, que atua na membrana bacteriana.

Conforme estudo de Berquo (2004), dos 396 (6,3%) entrevistados que referiram ter tratado uma infecção do trato respiratório nos trinta dias que antecederam a entrevista, 41% foram diagnosticados com faringoamigdalites, representando a maioria das infecções referidas, seguidos das sinusites (17%).

A sinusite é, portanto, uma inflamação da mucosa dos seios paranasais e das cavidades que ocorre no interior dos ossos da face (PITREZ, 2003).

### 2.2 Plantas medicinais

#### 2.2.1 Plantas medicinais na História. Breve relato.

As plantas medicinais são usadas pelos seres humanos há muito tempo. Os primeiros registros da utilização de plantas medicinais datam da época dos sumérios, que registravam suas vivências em tábuas de argila (THOMPSON, 1962),

há aproximadamente 5.000 anos. Nestas, foram encontrados registros de doze medicamentos preparados com mais de 250 plantas. Outras civilizações antigas, como a dos chineses, também produziram registros relativos ao uso de plantas medicinais (GUSMÃO, 2013), prática que ainda hoje é bastante difundida no país e é matéria de estudo de boa parte da comunidade científica da área de produtos naturais. Os hindus, com sua ciência ayurveda, reportam o uso de plantas medicinais, prática realizada ainda nos dias atuais. O papiro de Ebers, escrito pelos egípcios há cerca de 1.500 anos a.C., dá a contribuição desta cultura em relação ao uso de plantas medicinais, uma vez que contém 800 receitas de remédios feitos com mais de setecentas plantas. As civilizações grega e romana também deram sua contribuição através de vários de seus sábios que iniciaram a sistematização do entendimento dos processos patológicos e de tratamento, como Hipócrates, Teofrastus e Galeno, entre outros. Dioscorides ganha um destaque por ter sido o autor do livro *De materia medica*, em 77 a.C. Outras civilizações, como a dos árabes, dos macedônios, dos persas e a dos europeus, tiveram papel importante durante o milênio subsequente (PETROVSKA, 2012). Nos dias atuais, o uso de plantas medicinais ainda é realidade, sendo amplamente empregado em países em desenvolvimento por conta do acesso restrito aos medicamentos convencionais.

### 2.2.2 Uso de plantas medicinais no Brasil

A tradição do uso de plantas medicinais no Brasil é oriunda dos povos indígenas brasileiros, conhecedores da flora local, e dos europeus, africanos e asiáticos imigrantes que trouxeram, como parte de suas culturas, exemplares de plantas consideradas úteis para serem cultivadas no novo país (GIRALDI; HANAZAKI, 2010).

Hoje, parte destas plantas que apresentam potencial medicamentoso compõe a lista denominada RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, composta de plantas brasileiras, como o caju (*Anacardium occidentale*) e o ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*), e plantas estrangeiras cultivadas no Brasil que perfazem a maioria das espécies listadas, como o mulungu (*Erythrina mulungu*), o alho (*Allium sativum*) e a malva (*Malva sylvestris*), entre outras.

Segundo a legislação brasileira (RDC 26, de 13/5/2014), define-se “plantas medicinais” como a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósito



terapêutico; “fitoterápico” é definido como o produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal.

### 2.2.3 *Uso de plantas medicinais no tratamento da sinusite*

Algumas plantas utilizadas para tratar a sinusite têm seu efeito expectorante, com o objetivo de eliminar toda secreção acumulada nos seios nasais devido à doença (SUYENAGA, 2007). Entre elas, temos: o *Allium sativum* (alho); a *Pimpinella anisum* (erva-doce); o *Eucalyptus globulus* (eucalipto); a *Primula veris* (primavera); *Trifolium pratense* (trevo-vermelho); e o *Sambucus nigra* (sabugueiro) (ARGENTA, 2011).

### 2.2.4 *Uso de Luffa operculata na sinusite e ausência de relatos de sua utilização por homens acometidos*

A *L. operculata* (“buchinha-do-norte”) é consumida e muito indicada na medicina popular para o tratamento de sinusite (REVILLA, 2002). A inalação ou a instilação nasal da infusão de *L. operculata* é uma prática muito antiga no tratamento das rinites e sinusites, doenças de prevalência crescente na população mundial e que persiste até os dias de hoje (MATOS, 1967; HUGHES, 2001; MENON-MIYAKE et al., 2004). Porém, é sabidamente tóxica (LANINI et al., 2009) e abortiva (BARILLI et al., 2007), podendo provocar sérios efeitos colaterais em homens e mulheres.

Embora não haja relatos descrevendo a utilização de *L. operculata* no tratamento de rinite e sinusite por gênero na literatura científica, em documento emitido pelo Ministério da Saúde há uma estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Banco Mundial sobre a morte prematura de mais de quatro milhões de pessoas em decorrência de doenças respiratórias crônicas (Ministério da Saúde, 2010), número que tende a aumentar por conta dos processos de urbanização e de industrialização. Nesse documento, há o relato de que o Brasil ocupa a oitava posição em prevalência dessas doenças, sendo que, em 2007, houve

273.000 internações e 2.500 óbitos registrados no SUS, gerando um custo de aproximadamente 98,6 milhões de reais. Em São Paulo, um levantamento denominado Estudo Platino registrou a ocorrência de 15,6% de doenças respiratórias em adultos acima de 40 anos, correspondendo a 18% de homens e 14% de mulheres, com aumento da frequência de ocorrência em função do aumento da idade. Estima-se que, no Brasil, haja 7,5 milhões de pessoas com doença pulmonar obstrutiva crônica, em geral associada à sinusite e à rinite. Além disso, alterações significativas no padrão respiratório dessas pessoas podem levar ao desenvolvimento de anormalidades craniofaciais. A necessidade de se aplicar um tratamento adequado para essas situações torna-se, portanto, imprescindível. Os medicamentos indicados para esses casos são os corticoides, anti-histamínicos e  $\beta$ 2-agonistas, além de soro fisiológico e oxigenoterapia.

### 2.3 A família Cucurbitaceae

Espécies pertencentes à família Cucurbitaceae são adaptadas às regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (SERRA, 2010). É uma das mais importantes famílias de plantas utilizadas para a produção de alimentos e fibras. Apesar de a parte aérea dessa planta ser similar em seu desenvolvimento, grande variabilidade genética tem sido observada para formato e outras características do fruto (BISOGNIN, 2002).

Segundo Barroso (1978), há cerca de 1.280 espécies contidas em 126 gêneros de Cucurbitaceae, a maioria tropical. No Brasil, são cerca de 39 gêneros e 200 espécies. Segundo a Flora do Brasil, no país há a ocorrência de 30 gêneros aceitos, 1 endêmico e 158 espécies, sendo 53 delas endêmicas (CUCURBITACEAE, 2017).

Entre as várias espécies cultivadas no Brasil, destacam-se as abóboras e as abobrinhas (*Cucurbita moschata*), as morangas (*Cucurbita maxima*), as abobrinhas de árvore (*Cucurbita pepo*), as melancias (*Citrullus lanatus*), o melão (*Cucumis melo*), o pepino (*Cucumis sativus*), o maxixe (*Cucumis anguria*) e o chuchu (*Sechium*

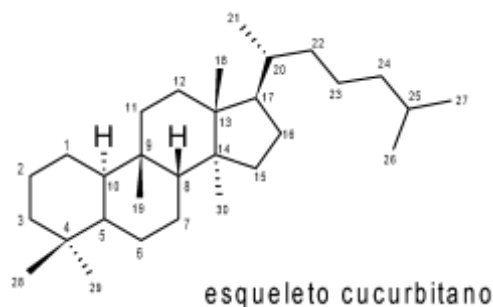
*edule*). As abóboras e as morangas são cultivadas em todo o país, sendo encontradas em maior quantidade nas cidades de Cordisburgo e Paracatu, no estado de Minas Gerais, pela produção do híbrido do tipo tetsukabuto ou kabutiá. Já a cidade de Paripiranga, no estado da Bahia, é a grande produtora de abóboras de variedades locais (tipo Maranhão, Sergipana e Jacarezinho). No caso do pepino, existem diversas cidades tradicionalmente produtoras nos estados de São Paulo, Goiás e Paraná (PINHEIRO, 2010).

Algumas espécies de Cucurbitaceae apresentam usos diversos, como as cabaças (*Langenaria* e *Cucurbita*) e as buchas (*Luffa aegyptiaca*, *Luffa cyllindrica*). A origem da bucha vegetal vem da Ásia, possivelmente da Índia. Trata-se de uma planta anual, com grandes folhas. A fibra do fruto pode ser utilizada de forma artesanal para a manufatura de tapetes, cestas e chinelos, entre outros produtos. Sua fibra também pode ser utilizada para limpeza geral e pessoal (DIAZ, 1997).

A espécie *Momordica charantia* L. é uma trepadeira pertencente à família Cucurbitaceae e conhecida no Brasil principalmente por melão-de-são-caetano. Na medicina popular, é empregada no tratamento do diabetes e lesões cutâneas (ALZUGARAY, 1983).

As cucurbitacinas são triterpenos altamente oxigenados, formados a partir do esqueleto denominado cucurbitano (fig. 2), e que podem ser encontrados livres ou glicosilados (VALENTE, 2004).

Figura 2. Esqueleto de cucurbitanos, grupo representado na família das Cucurbitaceae, existente nas cucurbitacinas.



Fonte: Ivana Barbosa Suffredini.

As primeiras moléculas isoladas com esqueleto cucurbitano foram agliconas que receberam como nome a palavra cucurbitacina, seguida de uma letra maiúscula, dada segundo a cronologia do seu isolamento ou da elucidação estrutural. Porém, isso não se tornou uma regra geral de nomenclatura, e hoje é possível encontrar nomes diversos para substâncias com estas características (VALENTE, 2004).

## 2.4 O gênero *Luffa* Mill.

### 2.4.1 Dados botânicos do gênero *Luffa* Mill.

São conhecidas duas espécies de *Luffa* Mill., ambas nativas, porém não endêmicas no Brasil. As espécies são denominadas de *Luffa cylindrica*, cuja sinonímia científica é *Luffa aegyptiaca* ou *Momordica cylindrica*, e *L. operculata* (LUFFA, 2017), que é o objeto do presente estudo. A espécie aparece nas regiões Norte (Amazonas, Pará e Rondônia), Nordeste (Bahia, Pernambuco e Paraíba), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro), e tem como domínio fitogeográfico a Amazônia, a Caatinga, o Cerrado, a Mata Atlântica e o Pantanal, sendo encontrada no Cerrado *lato sensu*, e em Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial) (LUFFA, 2017).

### 2.4.2 Dados químicos e farmacológicos do gênero *Luffa*

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Luffa* são muito estudadas. A antraquinona denominada de 1,8-dihidroxi-4-metilantracen-9,10-diona, identificada em *L. acutangula*, apresentou atividade indutora de apoptose em células de câncer de pulmão NCI-H460 (VANAJOTI; SRINIVASAN, 2016). Alguns peptídeos desta espécie também foram isolados, como luffangulina (WANG; NG, 2002), lectinas (ANANTHARAM et al., 1986), glicoproteínas abortifacientes (YEUNG; LI; NG, 1991), além de saponinas (NAGAO et al., 1991). Alguns estudos reportaram efeito gastroprotetor em ratos diabéticos (KADAM; PATIL, 2012), e hepatoprotetor, também em ratos (JADHAV et al., 2010). Compostos fenólicos e flavonoides foram identificados no extrato aquoso da pele dos frutos de *L. cylindrica* e apresentaram atividade antioxidante (KAO; HUANG; CHEN, 2012), bem como flavonoides foram identificados nas sementes desta espécie (SHIM; PARK, 2014) e flavona glicosilada foi identificada em seus frutos (DU; CUI, 2007). Outros compostos fenólicos

antioxidantes também foram isolados dos frutos de *L. cylindrica* (DU et al., 2006). Saponinas com ação imunomodulatória foram isoladas desta espécie (KHAJURIA et al., 2007). Peptídeos bioativos também foram identificados, como o antitumoral alfa-luffina (LIU et al., 2010), luffina P1 (LI et al., 2003), o antifúngico luffacilina luffina-S (GAO et al., 1994) e as abortivas luffina-a e luffina-b (YEUNG; NG; WONG, 1992). *Luffa echinata* é mencionada em estudos antigos que reportam a presença de saponinas em suas sementes e frutos (KHORANA; RAISINGHANI, 1961; BHATT et al., 1958; NIGAM; PANDYA; TAYAL, 1949). Relatos de atividade antioxidante foram registrados para o extrato alcoólico seco (DUKE, 2000), bem como sua atividade hepatoprotetora (AHMED; ALAM; KHAN, 2001) e indutora de apoptose em células de tumor de cólon HT-29 (SHANG et al., 2012).

## **2.5 *Luffa operculata* (L.) Cogn.**

### *2.5.1 Dados botânicos*

*Luffa operculata* (L.) Cogn. apresenta sinonímias científicas registradas no sítio do Missouri Botanical Gardens ([www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)): *Cucumis sepium* G. Mey., *Elaterium quinquefidum* Hook & Arn., *Luffa astorii* Svenson, *Luffa operculata* var. *intermedia* Cogn., *Luffa operculata* var. *lobata* Cogn., *Luffa purgans* (Mart.) Mart., *Luffa quinquefida* (Hook & Arn.) Seem., *Momordica operculata* L., *Momordica purgans* Mart., *Momordica quinquefida* (Hook & Arn.) Hook & Arn., *Poppya operculata* (L.) M. Roem.

Esta espécie apresenta-se como liana, volúvel ou trepadeira, e é nativa do Brasil, embora não endêmica. Ela aparece no Norte (Amazonas), Nordeste (Bahia, Pernambuco e Paraíba) e no Sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro, no Cerrado e na Mata Atlântica, em Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial). Pode ser conhecida como abobrinha-do-norte, buxinha, buchinha-do-norte e cabacinha, no Brasil, segundo registros do sítio Flora do Brasil (LUFFA, 2017).

### 2.5.2 Dados farmacológicos

A *Luffa operculata* é uma planta de uso popular bastante difundido no Brasil, embora há muito desperte o interesse dos europeus. Espécies de esponja, ou cabaça, começaram a ser comercialmente produzidas no Japão no final do século XIX. Devido à capacidade filtrante de algumas espécies de esponja, ganhou reconhecimento internacional, em particular após a II Grande Guerra. As espécies de maior interesse do gênero, à época, eram a *L. acutangula* e a *L. cylindrica* (PORTERFIELD, 1955).

No Brasil, relatos da utilização de *L. operculata* são encontrados na literatura. BRITO & BRITO (1993) fazem um breve histórico da utilização de buchinha-do-norte, ou cabacinha, assim denominada em algumas localidades brasileiras, citando a sua utilização como descongestionante nasal e abortiva. Relatos de uso como planta emética e purgativa também foram reportados (OLIVEIRA et al., 2015). Há relatos de uso contra celulite, sinusite, como purgativo e em reumatismo (DUKE & VASQUEZ, 1994).

A buchinha-do-norte, planta popular usada em sinusites e rinites, teve seu extrato alcoólico avaliado quanto à atividade antibacteriana sobre três bactérias comumente encontradas no trato respiratório superior, que são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, sendo mais ativa sobre esta última (SCALIA et al., 2015). O extrato aquoso também foi avaliado em modelo experimental de rinossinusite, tendo se mostrado mais eficaz no tratamento da sinusite que no grupo controle; os autores ainda confirmaram a ação significativa sobre *S. pyogenes* em outros modelos *in vitro* (SILVA, L. et al, 2016). Por outro lado, a atividade da buchinha-do-norte foi baixa contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (GRAHAM et al., 2003). O extrato hidroalcoólico desta espécie apresentou atividade moluscicida, o que a tornaria apta a ser usada contra a esquistossomose (ALMEIDA et al., 1987), porém não foram apresentados estudos mais aprofundados. O efeito de buchinha-do-norte sobre o epitélio do palato de sapos foi estudado em material biológico isolado, mostrando alargamento dos espaços intercelulares e anormalidades no transporte de íons (MENON-MIYAKE et al., 2005). A buchinha-do-norte já foi testada contra *Staphylococcus aureus*,

*Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (SCALIA, 2014).

### 2.5.3 Dados químicos

Compostos de diferentes grupos já foram identificados em buchinha-do-norte, como compostos fenólicos. O ácido 2,3-dicafeoilglicárico (SILVA, L. et al, 2016), composto supostamente relacionado à eficácia de sua ação antibacteriana verificada, foi isolado do extrato aquoso, bem como flavonoides foram isolados da espécie (SCHILLING et al., 1981).

O grupo de compostos mais relevante de *L. operculata* é denominado cucurbitacinas. A isocucurbitacina foi isolada em 1967 (MATOS; GOTLIEB, 1967). Neocucurbitacinas A e B foram isoladas de uma fração clorofórmica do extrato metanólico de buchinha-do-norte (KAWAHARA et al., 2001), bem como opercurinas A e B foram isoladas do extrato feito com acetato de etila (KAWAHARA et al., 2004).

Segundo Sala et al. (2013), di-hidrocucurbitacina B e cucurbitacina podem ser obtidas em grandes quantidades a partir dos frutos de buchinha, e foram testadas *in vitro* quanto aos seus efeitos citotóxicos em células de câncer de pulmão A549, e alguns destes compostos parecem ser potentes para atividade moderada contra células tumorais.

## 2.6 Análise comportamental de ratos

Conforme Moore (2008), o comportamento tem certas propriedades que resultam de certas relações funcionais entre aspectos do organismo e aspectos do ambiente. De uma maneira mais simples, o comportamento é a interação entre organismo e ambiente.

Embora seja ainda de difícil definição, o termo “atividade exploratória” no campo aberto é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. De um modo geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não apenas respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. Alguns estudos, por exemplo, utilizam o comportamento manifestado pelo animal

dado um ambiente novo. O pressuposto básico envolvido em estudos de comportamento animal se dá nesse novo ambiente, uma vez que, no intuito de explorá-lo, o animal precisa locomover-se. Dessa forma, a quantidade de movimentos passa a ser um dos indicadores de atividade exploratória (VIANNA et al., 2000).

Descrito inicialmente por Crawley e Goodwin (1980), o teste claro-escuro é caracterizado como um modelo de conflito, baseado na tendência natural de explorar novos ambientes *versus* a esquivar-se a tais ambientes, devido ao perigo que pode ser encontrado, sendo possível, deste modo, avaliar a ansiedade do animal.

Champney, Ferguson e Ferguson (1974) realizaram estudos referentes à influência da administração intraperitoneal do extrato aquoso de *L. operculata* sobre a toxicidade, a analgesia, as alterações na coordenação neuromotora e a modificação no metabolismo de barbitúricos em camundongos ou em ratos, dependendo do modelo estudado. Em primeiro lugar, os autores escolheram a via intraperitoneal para ser estudada. Do ponto de vista de órgãos regulamentadores como a OECD, acrônimo em inglês para a *Organization for Economic Co-operation and Development*, as diretrizes (OECD-425) para a realização de experimentos em animais de laboratório para novas drogas devem respeitar a via administração oral, que é a mais usada popularmente, e é a que reflete mais proximamente com a farmacodinâmica sofrida pela nova droga. Os autores não encontraram alterações nos modelos estudados, a não ser no efeito analgésico, embora não tenham sido reportados os dados estatísticos obtidos que possibilitariam avaliar o grau de efetividade ou não dos efeitos observados. Os autores relatam, de modo descritivo, as alterações comportamentais observadas em parâmetros como defecação, atividade motora espontânea, permanência em uma posição “agachada”, com os olhos fechados e cabeça abaixada e piloereção, sem que tenham sido feitas coletas de dados mensuráveis para que fossem comparados com o grupo de controle. Os autores nem sequer mencionam o número de animais observados com tais reações. Portanto, fica impossível fazer um estudo comportamental baseado em dados não concretos, apenas descritivos. Desse modo, os resultados apresentados são inconclusivos.

Nenhum outro estudo relacionado à influência de buchinha-do-norte sobre o



comportamento foi feito, desde então, embora sua utilização popular ainda seja efetiva no país.

## **2.7 Sistema reprodutor masculino**

Nos últimos anos, a qualidade do espermatozóide humano e da sua fertilidade potencial vem sofrendo alterações. A infertilidade continua a ser um grande problema na sociedade. Isto pode sugerir que a qualidade do sêmen foi alterada, em parte como consequência de efeitos tóxicos (MORETTO et al., 2012).

O testículo é um órgão complexo, constituído morfofuncionalmente de dois compartimentos: intersticial e intertubular. O intersticial contém células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e células de Leydig (principal fonte de andrógeno); o intertubular contém túbulos seminíferos, no interior dos quais há a formação do gameta masculino, processo denominado de espermatogênese (TAKASHIBA, 2011).

As células de Leydig encontram-se em contato com os capilares, sendo sua principal função a produção de testosterona, que é importante para o desenvolvimento e a manutenção da espermatogênese e das características masculinas (O´ DONNEL, 2001).

A testosterona, sob o efeito do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), é importante para a espermatogênese, a diferenciação sexual durante o desenvolvimento embrionário e o controle da secreção destas mesmas gonadotrofinas (MORETT et al., 2012). O LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

O parênquima testicular é formado por túbulos seminíferos e tecido intersticial, cercado por uma cápsula denominada túnica (O´ DONNEL, 2001).

O túbulo seminífero é formado por células espermatogênicas, que consistem em espermatogônia, espermatócitos e espermátide, entremeados pelas células de Sertoli (DADOUNE; DEMOUULIN, 1993).

Figura 3. Corte transversal de testículo representando as células de Sertoli e células da linhagem germinativa (espermatogônia, espermatócitos e espermatíde) no interior dos túbulos seminíferos e as células de Leydig.



Fonte: Página do Laboratório Virtual de Embriologia.

As células de Sertoli têm como função o controle da maturação e da migração das células germinativas, e estão envolvidas também na síntese proteica e nos esteroides e fagocitam células germinativas em degeneração (DADOUNE; DEMOUULIN, 1993; AMANN, 1993).

Existem poucos artigos relatando os efeitos farmacológicos e toxicológicos referentes aos efeitos da *Luffa operculata* sobre o comportamento de ratos Wistar e sobre o sistema reprodutor masculino desses animais. Deste modo, os estudos propostos no presente projeto tornam-se imprescindíveis para conhecer possíveis efeitos deletérios causados pela ingestão do chá dos frutos de *L. operculata*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Conhecer as possíveis alterações decorrentes da utilização de extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte em ratos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar se a utilização do extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte influencia o comportamento geral de ratos.
- Verificar os efeitos do extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte quanto ao comportamento doentio, por meio da avaliação no campo aberto e do peso corporal de ratos.
- Verificar o efeito do extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte quanto aos níveis de ansiedade de ratos, avaliada pelo teste na caixa claro-escuro.
- Verificar se a administração de extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte em ratos altera seu sistema reprodutor.
- Verificar se a administração de extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte altera macroscópica e microscopicamente os testículos de ratos tratados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Droga vegetal

A droga vegetal, composta de frutos secos de buchinha-do-norte, foi adquirida da empresa Santos Flora (lote BUCHO 01/0914, data da colheita em 24/9/2014, com validade até 24/9/2017, origem Brasil), e foi usada conforme sua utilização popular, na forma de infuso, na proporção de um fruto para cada 300 mL de água fervente.

### 4.2 Obtenção do extrato aquoso pelo método baseado no uso tradicional da droga vegetal

Quinze frutos secos de buchinha-do-norte, pesando 34.677 g, foram adicionados a 5100 mL de água destilada grau Milli-Q fervente, e foram mantidos em infusão por 10 minutos. Após esse período, o infuso foi resfriado, filtrado, congelado em freezer (-80° C) e liofilizado, obtendo-se apenas o pó do extrato. O liofilizado foi chamado de extrato aquoso de buchinha-do-norte (EBN). Foi preparada uma solução em meio aquoso com o EBN, calculada para a dose a ser administrada nos animais de 1,0 mg/kg.

Figura 4. Fruto seco de *Luffa operculata* e a balança analítica utilizada para fazer a pesagem de cada fruto.



Fonte Cinthia dos Santos Alves.

### 4.3 Animais

Foram utilizados 21 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos, pesando aproximadamente 350 g, com 20 a 23 semanas de vida, vindos da Universidade São Paulo (USP) e mantidos no Biotério da Universidade Paulista (UNIP, São Paulo, SP). Os ratos foram mantidos em gaiolas de polipropileno (45,5 x 34,5 x 20 cm, até cinco por gaiola), em sistema de microisoladores (Tecniplast, Buguggiate, Itália), permitindo aeração e troca de ar constantes, temperatura controlada ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), umidade controlada (entre 55-65% de umidade relativa) e iluminação artificial (ciclo de 12h claro e 12h escuro, as luzes sendo ligadas às 7h) por uma semana para que se adaptassem às condições do biotério. Os animais tiveram livre acesso à água filtrada e à ração irradiada (BioBase, Águas Frias, Brasil) durante todo o experimento. Os animais permaneceram em cama feita com maravalha esterilizada, e a troca da maravalha ocorreu semanalmente, com o intuito de minimizar a interferência sobre o comportamento. Os experimentos executados no presente trabalho estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal, o CONCEA, aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animal em Experimentação Científica, o CEUA, da Universidade Paulista, sob número de protocolo 43/2016. Os procedimentos técnicos adotados encontram-se sob a óptica dos 3Rs, que implicam na racionalização do uso animal segundo os preceitos redução, refinamento e substituição.

### 4.4 Tratamentos e grupos

Dez animais foram utilizados no grupo controle (GC), para os quais foi administrada água, veículo utilizado para a diluição do extrato vegetal, na quantidade referente ao peso de cada animal/1000, por cinco dias consecutivos, no período da manhã. Para o grupo experimental (GE) foram utilizados onze animais, que receberam o EBN diluído em água, por via oral (gavagem), na dose de 1mg/kg/dia, ajustado a um volume correspondente ao peso do animal/1000, por cinco dias consecutivos, no período da manhã. Todos os animais foram pesados semanalmente.

#### 4.5 Avaliação em campo aberto

A fim de avaliar a influência do EBN sobre os parâmetros motores e exploratórios, e para identificar um possível comportamento doentio dos animais, foi utilizado o campo aberto (BROADHURST, 1960). O campo aberto consiste em uma arena redonda (96 cm de diâmetro em madeira, 29 cm altura da parede em metal, tinta acrílica impermeável, cinza-claro); o piso é subdividido em 25 partes, sobre as quais os animais se deslocam. Esse deslocamento pode ser contado, sendo uma forma direta de avaliar a influência de um tratamento sobre os parâmetros motores para um comportamento doentio. A sala-teste possui uma iluminação fraca, propositadamente colocada de modo a clarear a arena (roedores tendem a ter predileção por lugares escuros). Os animais são colocados no círculo central da arena, em um ambiente claro, sem refúgios, e nele devem permanecer parados ou se deslocarem para a periferia, dependendo de seu estado emocional. Assim, a avaliação no campo aberto ocorre quando o animal encontra-se em um paradoxo entre permanecer no círculo central e explorar o local ou se esconder na periferia do aparato. Ali eles permanecem em observação por três minutos, após os tratamentos. Nesta avaliação os seguintes parâmetros foram observados: frequência na locomoção (números de unidades do chão adentradas com todas as patas), tempo parado, frequência ao levantar (número de vezes que o animal permaneceu apoiado nas patas posteriores), frequência com que o animal permanece no centro do aparato, frequência com que o animal permanece na periferia do aparato, tempo ao fazer o *grooming* e quantidade de cíbalas fecais. Uma câmera foi colocada acima da arena, com o objetivo de gravar o experimento, de modo que o observador não permanecesse na sala experimental, e para que fosse possível se fazer a análise posteriormente, com maior precisão. O aparato foi limpo com solução de etanol 5% em água, antes de cada animal ser avaliado, eliminando, assim, odores deixados pelo animal avaliado previamente, para não houvesse interferência do odor no comportamento.

#### **4.6 Avaliação em teste claro-escuro como medida de ansiedade**

Imediatamente após a avaliação em campo aberto (no dia 6 do experimento), os animais foram alocados na caixa claro-escuro para avaliação de ansiedade. O modelo baseia-se na aversão de roedores a espaços claros, gerando um conflito entre permanecer no espaço fechado e escuro e o instinto exploratório. O aparato consiste em uma caixa de acrílico (80 cm de comprimento, 40 cm de largura e 30 cm de altura) dividida em um compartimento escuro, com piso e paredes pretas (34 cm de comprimento), e um compartimento claro, diretamente iluminado com piso e paredes brancos (44 centímetros de comprimento), separados por uma porta (13 cm de largura e 8 cm de altura). Cada animal foi colocado individualmente no centro do compartimento escuro, podendo, assim, explorar o aparato durante três minutos. Os parâmetros avaliados foram a latência (em segundos) de entrada no lado claro, o número de tentativas de entrar no lado claro, o tempo total de permanência no compartimento escuro (segundos) e o tempo total de permanência no compartimento claro (segundos), a frequência de locomoção no claro, a frequência de locomoção no escuro, o número de trocas de lado, a imobilidade no compartimento claro e imobilidade no escuro, a frequência de levantar no claro, a frequência de levantar no escuro e o número de cíbalas fecais. Do mesmo modo como o realizado no experimento comportamental anterior, uma câmera foi colocada acima da arena com o objetivo de gravar o experimento, de forma que o observador não permanecesse na sala experimental, e para que fosse possível realizar a análise, posteriormente, com maior precisão. O aparato foi limpo com solução de etanol 5% em água antes de cada animal ser avaliado, eliminando, assim, odores deixados pelo animal avaliado previamente, para não houvesse interferência do odor no comportamento.

#### **4.7 Avaliação de alterações macroscópicas e histopatológicas dos testículos**

Após a eutanásia, foram retirados os testículos esquerdos dos animais, cujos pesos foram obtidos em balança analítica, bem como foram medidas as distâncias, em milímetros, dos eixos craniocaudal e látero-lateral, com o auxílio de um paquímetro. Foram ainda obtidos os volumes testiculares, com base na fórmula alterada de volume elipsoide  $V = 4/3 \cdot \pi ab^2$ , em que  $a$  é o eixo semiprolato (craniocaudal) e  $b$  é o eixo semioblado (látero-lateral), e o peso relativo, em função do peso corporal dos animais no dia da retirada dos testículos.

Para as avaliações histopatológicas, os testículos foram processados em meio fixador Bouin, preparado com ácido pícrico saturado, formol e ácido acético glacial, nas proporções de 24:4, 5:1,5, em um volume de 30 ml. Primeiramente, os testículos foram colocados em recipientes de tamanho apropriado com o fixador de Bouin, onde permaneceram por duas horas. Após esse período, os testículos foram retirados do meio fixador e cortados ao meio, com o auxílio de uma lâmina de barbear, e foram novamente colocados no fixador por mais 24 horas. Depois desse período, cada metade do testículo foi retirada do fixador para que os polos fossem cortados e colocados de volta no fixador por mais 24 horas. Depois desse período, os testículos foram colocados em etanol 70%, onde permaneceram até que fossem submetidos às técnicas de obtenção dos cortes histológicos. Na figura 5, a seguir, observa-se o testículo de um dos animais, cortado ao meio e com os polos aparados, em meio fixador Bouin.

##### *4.7.1 Técnica histológica usada para análise microscópica dos testículos*

Os testículos fixados em etanol 70% foram desidratados após serem submersos em recipientes contendo uma série alcoólica de etanol 75%, etanol absoluto, por uma hora cada. Em seguida, foram submetidos à série xilol, segundo a sequência etanol/xilol 50%, xilol, xilol, por uma hora cada passagem. Depois, o material foi impregnado em parafina líquida a 60 °C por uma hora, por duas vezes. Em seguida, a amostra foi emblocada em parafina, para que os cortes fossem feitos



na espessura de 4 a 5 micras. Os cortes foram acondicionados em lâminas de 26 mm x 76 mm, e levadas à estufa para prévia desparafinização, por 20 min. As lâminas continuaram a ser submetidas à sequência de desparafinização com duas passagens de 15 min em xilol, duas passagens de 15 min em etanol absoluto e uma passagem de 15 min em etanol 50%. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 min. Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 10 min, depois foram lavados em água corrente por 2 min. Os mesmos cortes foram submetidos à eosina por 1 min para finalizar o processo de coloração hematoxilina-eosina (HE). Depois de corados, os cortes foram desidratados em uma série de etanol 75%, etanol absoluto e etanol absoluto, dois minutos cada passagem, seguido da série etanol/xilol 50%, xilol e xilol, três minutos cada passagem. As lâminas com os cortes corados e desidratados são montadas com lamínula e entellan.

Parte dos testículos foi corada com ácido periódico de Schiff (PAS), sendo a sequência de preparo das lâminas idêntica à descrita anteriormente, trocando-se os corantes hematoxilina e eosina para o PAS.

Figura 5. Testículos em processamento pela técnica histológica com o fixador de Bouin.



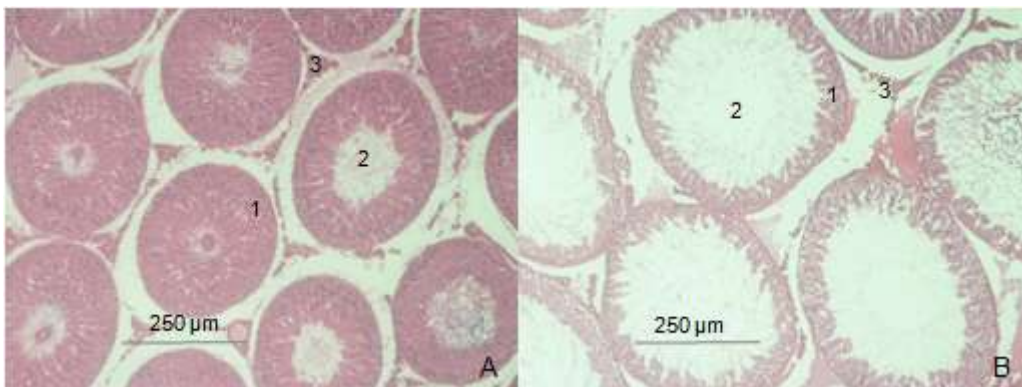
Fonte: Cinthia dos Santos Alves.

No presente estudo, foi realizada uma contagem das células de Leydig. Para a contagem das células de Leydig, foram utilizadas as lâminas preparadas com ácido periódico de Schiff, ou PAS. As células de Leydig, visíveis na região externa

aos túbulos seminíferos (fig. 6), são contadas em dez regiões de cada lâmina referente a um animal, sendo dez animais do GC e onze do GE. A contagem de cada lâmina é somada, e este valor será o dado correspondente ao animal. A contagem foi realizada em microscópio óptico (Zeiss), com câmera acoplada, no aumento de 1000X, sob imersão a óleo.

Para a medida dos túbulos seminíferos, foram obtidas medidas relativas ao diâmetro, ao parênquima e à luz, com o auxílio de um paquímetro. No microscópio óptico anteriormente utilizado, dez fotos foram obtidas de cada lâmina (referente a cada animal), de modo que cada foto contivesse, no mínimo, cinco túbulos seminíferos inteiros. Deste modo, foram obtidas cinquenta fotos de cada lâmina (correspondente a cada animal). As medidas foram colocadas em um gráfico e as médias de cada medida foram obtidas para os cálculos estatísticos. A figura 6 abaixo representa uma foto em aumento de 100X, realizada com os testículos, evidenciando os túbulos seminíferos. A foto foi feita de modo a se obter no campo visual a imagem de cinco túbulos seminíferos inteiros, pelo menos.

Figura 6. Cortes histológicos transversais de testículo de ratos Wistar observados em microscópio óptico em aumento de 100X, corados com hematoxilina e eosina. A. Testículos dos ratos do grupo controle. B. Testículos dos ratos do grupo experimental.



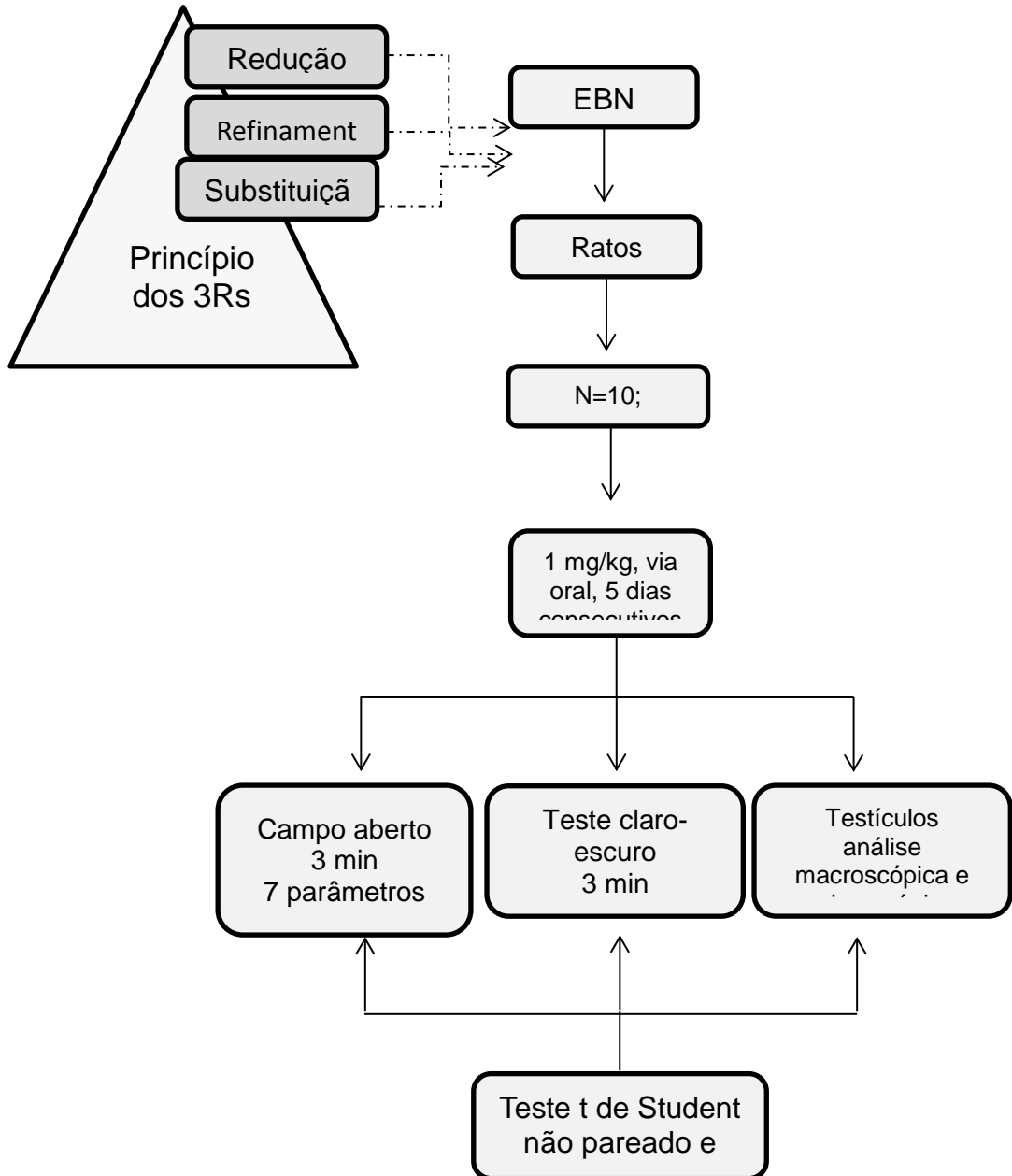
Fonte: Cinthia dos Santos Alves.

A avaliação das medidas do diâmetro, do parênquima e da luz dos túbulos seminíferos foi realizada com o programa de processamento de imagens de acesso livre ImageJ (Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA). Com este *software* é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 *bits* (RASBAND, 2011). Para que a imagem pudesse ser avaliada em micrômetros, foi usada uma câmara de Neubauer como referência, uma vez que as medidas das laterais dos quadrados e dos retângulos são conhecidas e dadas em micrômetros. Deste modo, foi possível obter a proporção das medidas dadas pelo programa, em *pixels*, e a obtida, em micrômetros. No caso do experimento atual, as medidas observadas apresentaram a proporção de 189,04 *pixels* para 250  $\mu\text{m}$ .

#### **4.8 Delineamento experimental**

O delineamento experimental pode ser visto na figura 7. Dois grupos de animais, denominados de grupo controle (n = 10) e grupo experimental (n = 11), foram tratados com água (veículo) e com extrato de buchinha-do-norte na dose de 1 mg/kg, por via oral, por cinco dias consecutivos. O peso dos animais foi obtido antes do início da administração dos tratamentos e ao sexto dia do início da administração dos tratamentos. No sexto dia, os animais foram pesados e submetidos aos experimentos comportamentais em campo aberto, por três minutos, seguido do teste claro-escuro, por outros três minutos. Em seguida, eles foram eutanasiados, e seus testículos esquerdos, retirados.

Figura 7. Delineamento experimental para a avaliação da influência da administração oral de extrato de buchinha-do-norte em ratos Wistar.



Fonte: Ivana Barbosa Suffredini.

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os resultados foram avaliados pelo teste  $t$  de Student para os dados paramétricos pareados, para a avaliação dos pesos dos animais, e não pareados, para avaliação dos outros parâmetros (GraphPad Prism 5.0).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Resultados botânicos**

O extrato aquoso de buchinha-do-norte (EBN) liofilizado apresentou peso de 14,82 g, ou 42,73% em relação ao peso da droga vegetal usada para se obter o extrato.

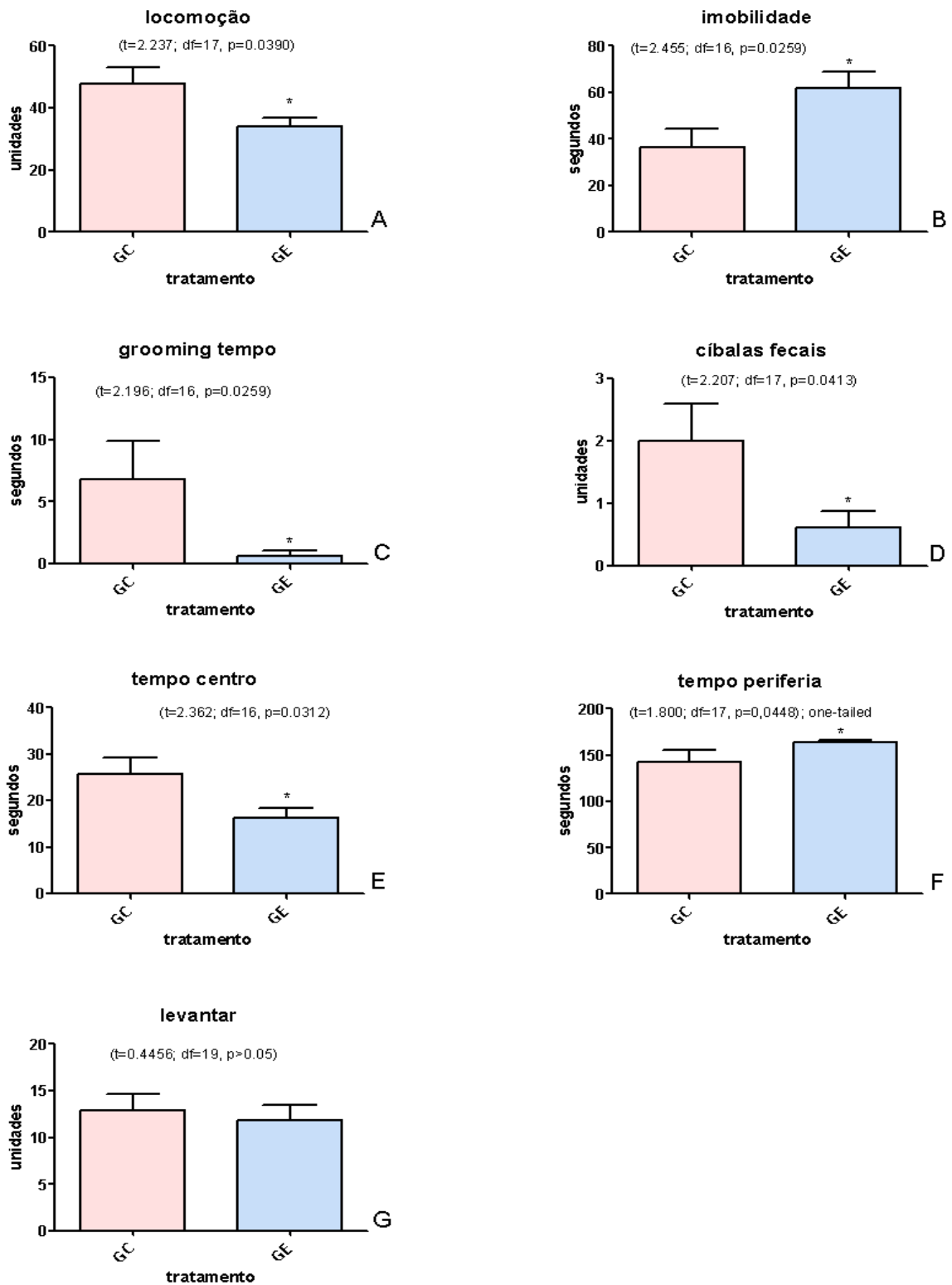
#### **5.2 Resultados comportamentais**

Os resultados comportamentais estão expressos através dos dados obtidos nos aparatos de campo aberto e caixa claro-escuro, no período da manhã.

##### *5.2.1 Campo aberto*

Os resultados obtidos no aparato de campo aberto estão expressos na figura 8, abaixo.

Figura 8. Resultados comportamentais obtidos da análise em campo aberto de ratos Wistar adultos após administração do extrato aquoso dos frutos de *Luffa operculata*. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .

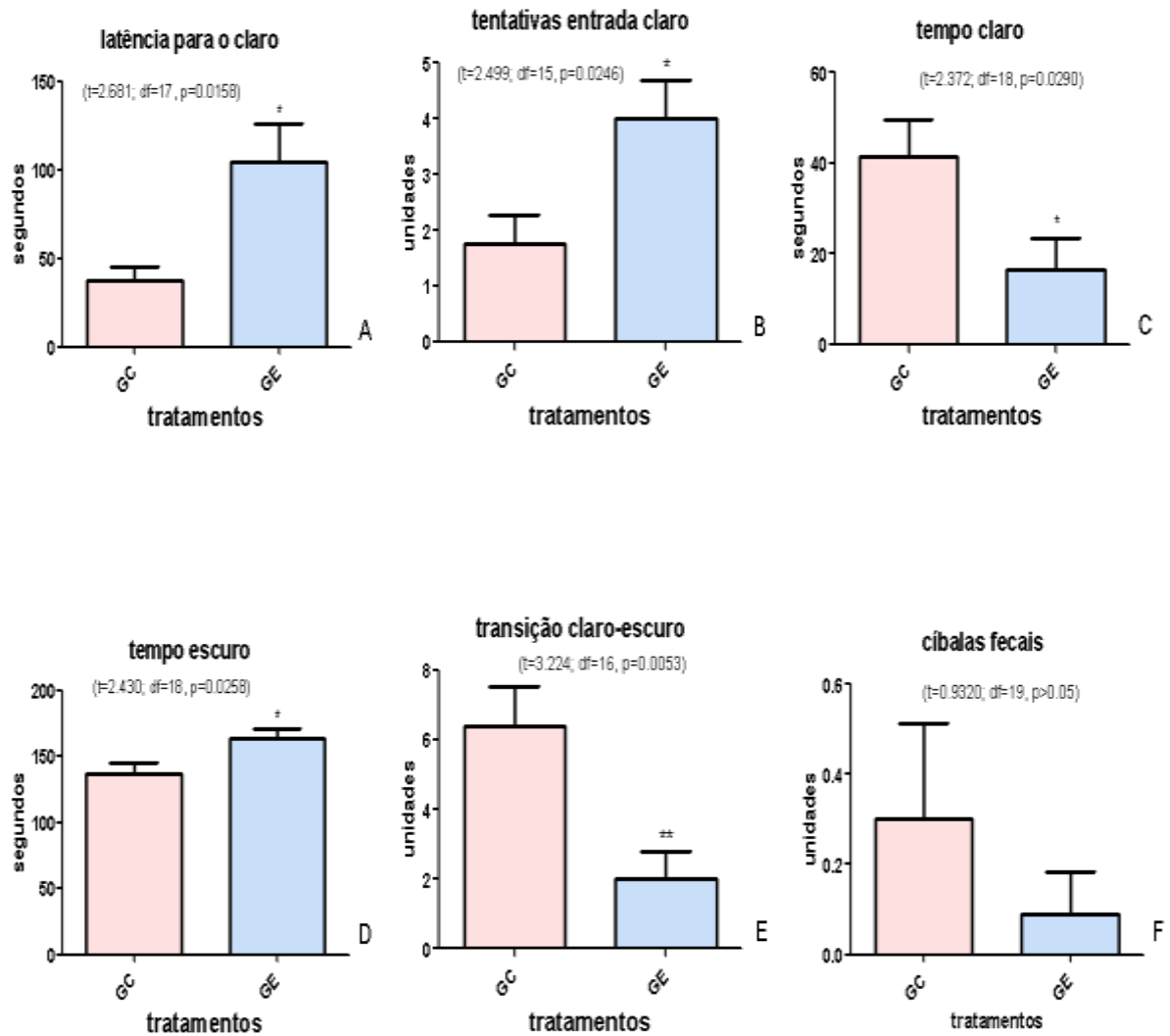


Segundo os dados obtidos na avaliação do comportamento em campo aberto, houve decréscimo da locomoção do GE em relação ao grupo controle (fig. 8A;  $t = 2,237$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0390$ ), e aumento da imobilidade do GE em relação ao grupo controle (fig. 8B;  $t = 2,455$ ;  $df = 16$ ,  $p = 0,0259$ ). O tempo de *grooming* foi significativamente menor no GE do que no grupo controle (fig. 8C;  $t = 2,196$ ;  $df = 16$ ,  $p = 0,0259$ ). A quantidade de ciberias fecais foi menor no GE (fig. 8D;  $t = 2,207$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0413$ ). O tempo no centro também foi menor para o GE quando comparado ao tempo no centro do grupo controle (fig. 8E;  $t = 2,362$ ;  $df = 16$ ,  $p = 0,0312$ ). Os animais do GE permaneceram por mais tempo na periferia do que os animais do GC (fig. 8F;  $t = 1,800$ ;  $DF = 17$ ;  $p = 0,0448$ ). Não houve diferenças para o parâmetro “levantar”, que expressa exploração vertical (fig. 8G;  $t = 0.4456$ ;  $df = 19$ ;  $p > 0,05$ ).

### 5.2.2 Caixa claro-escuro

Os resultados obtidos na avaliação dos animais em caixa claro-escuro encontram-se expressos nas figuras 9 e 10, a seguir.

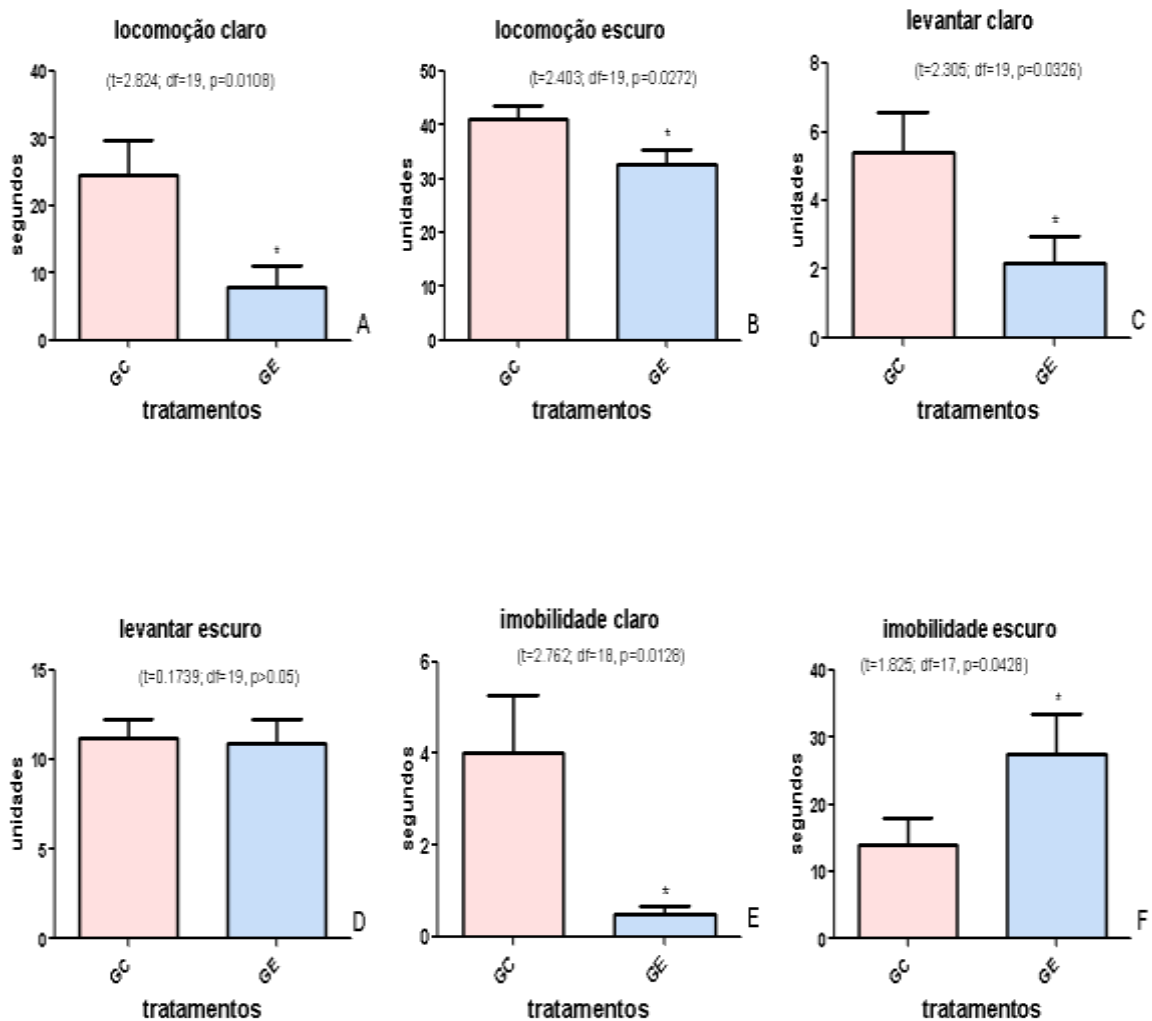
Figura 9. Resultados obtidos da análise comportamental em caixa claro-escuro após administração de buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) em ratos Wistar adultos. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .





Os animais do GE demoraram mais tempo para acessar o lado claro da caixa, em relação ao tempo gasto pelos animais do grupo controle (fig. 9A;  $t = 2,681$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0158$ ), embora os animais do GE tenham apresentado um número maior de tentativas de passar para o lado claro da caixa (fig. 9B;  $t = 2,499$ ;  $df = 15$ ,  $p = 0,0246$ ). Os animais do GE permaneceram por mais tempo no lado escuro da caixa (fig. 9C;  $t = 2,430$ ;  $df = 18$ ,  $p = 0,0258$ ) e menos tempo no lado claro da caixa (fig. 9D,  $t = 2,372$ ;  $df = 18$ ,  $p = 0,0290$ ). Também, de modo significativo, os animais do GE trocaram menos de lado (fig. 9E;  $t = 3,224$ ;  $df = 16$ ,  $p = 0,0053$ ).

Figura 10. Resultados complementares obtidos da análise comportamental em caixa claro-escuro após administração de buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) em ratos Wistar adultos. Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .



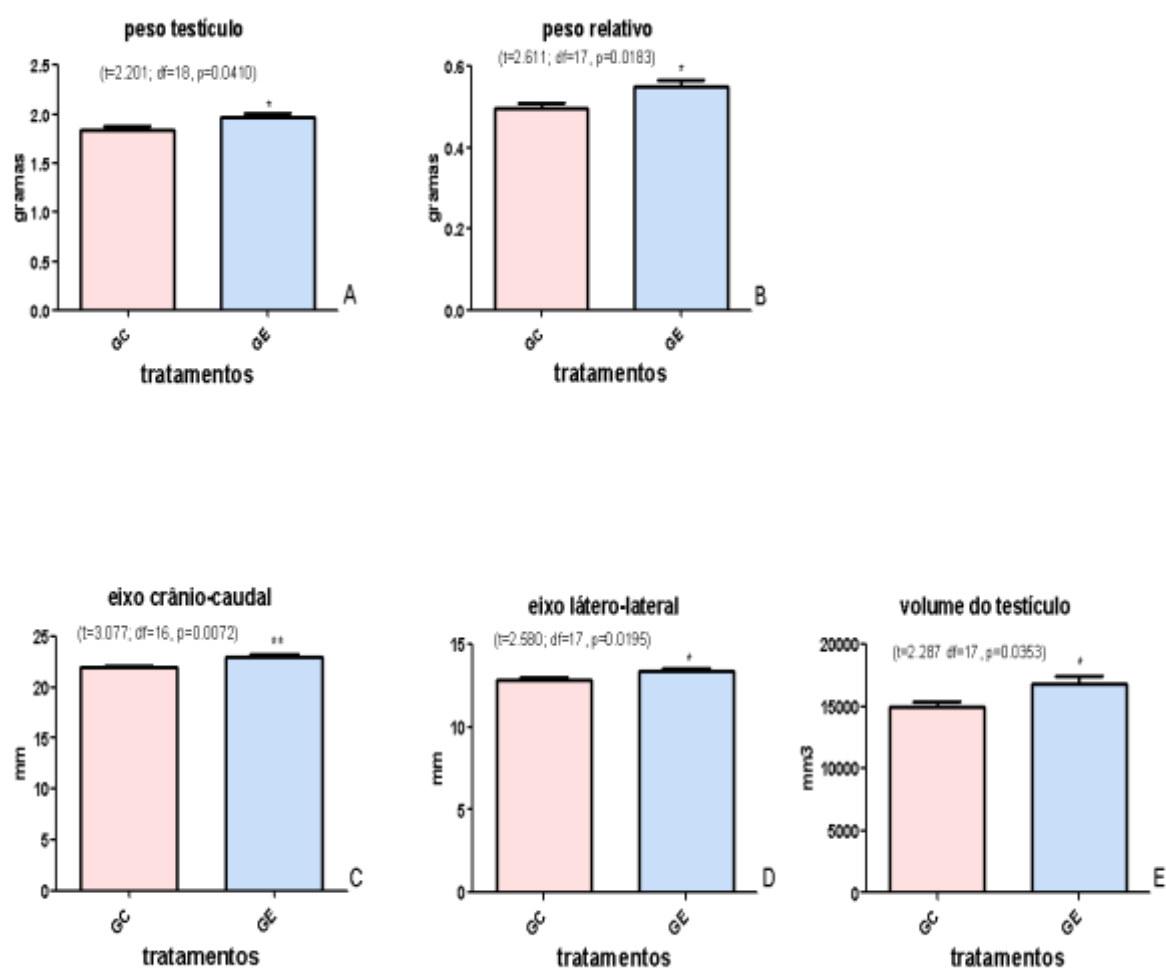
Na figura 10, observa-se que os animais do GE se locomoveram menos no lado claro (fig. 10A;  $t = 2,824$ ;  $df = 19$ ,  $p = 0,0108$ ) do que no lado escuro (fig. 10B;  $t = 2,403$ ;  $df = 19$ ,  $p = 0,0272$ ), em relação à locomoção observada para o grupo controle. Foi observado que, para o parâmetro “levantar” no lado claro, houve diferenças significativas, uma vez que o GE levantou menos vezes (fig. 10C;  $t = 2,305$ ;  $df = 19$ ,  $p = 0,0326$ ). Já no parâmetro “levantar” no lado escuro não houve

diferenças significativas entre os grupos (fig. 10D;  $t = 0,1739$ ;  $df = 19$ ;  $p > 0,05$ ). Por fim, observou-se que os animais do GE apresentaram-se mais imóveis no lado claro que os animais do GC (fig. 10E;  $t = 2,762$ ;  $df = 18$ ,  $p = 0.0128$ ) e maior mobilidade no lado escuro (fig. 9F;  $t = 1.825$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0.0428$ ).

### *5.2.3 Avaliação macroscópica e microscópica de testículos*

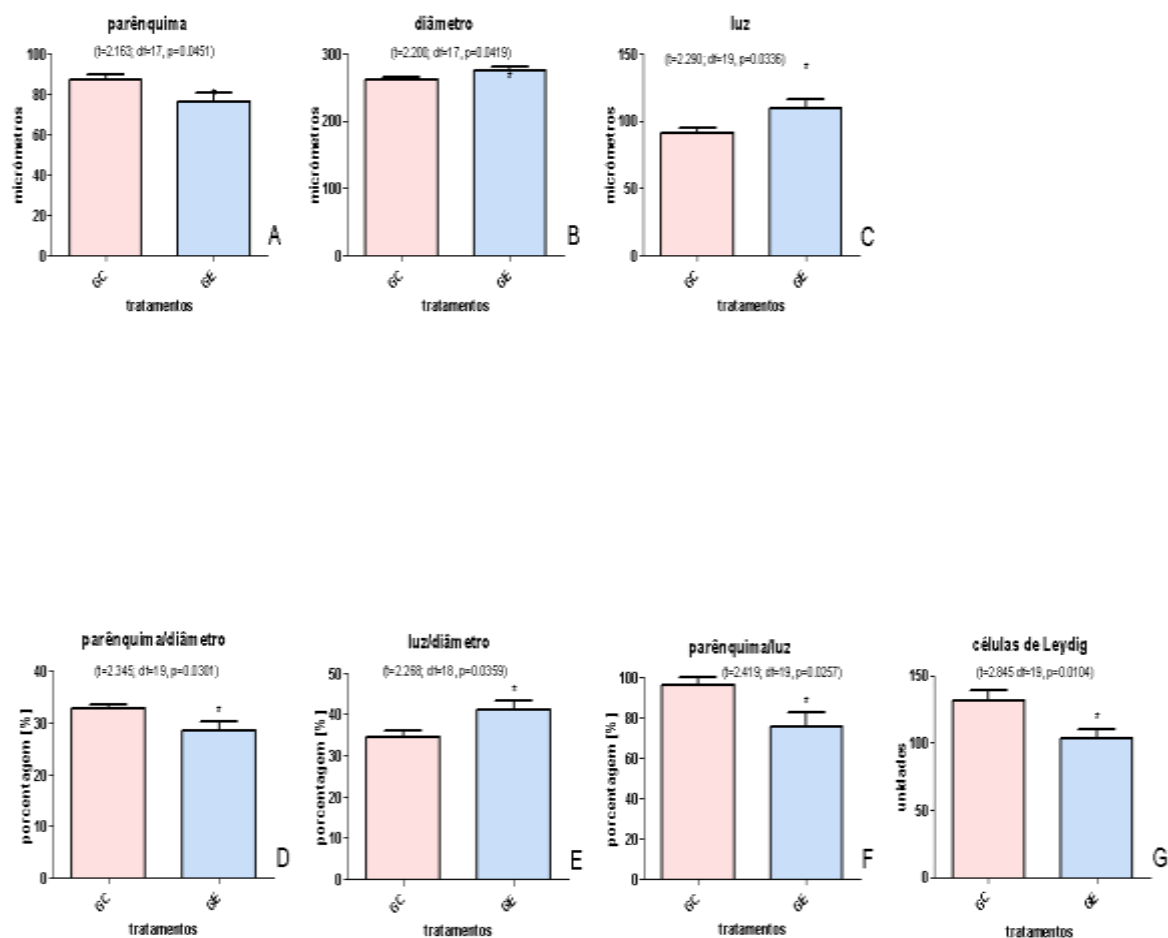
A figura 11 mostra os dados obtidos da avaliação macroscópica e microscópica dos testículos de ratos Wistar adultos.

Figura 11. Resultados obtidos da avaliação dos parâmetros macroscópicos dos testículos de ratos Wistar adultos tratados com buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .



Alterações significativas no parâmetro “peso do testículo” foram observadas, e o GE apresenta um peso testicular maior do que o peso dos testículos do grupo controle (fig. 11A;  $t = 2,201$ ;  $df = 18$ ,  $p = 0,0410$ ), bem como o peso relativo (peso dos testículos/peso corporal) dos animais do GE apresentaram um aumento em relação ao peso relativo dos animais do grupo controle (fig. 11B,  $t = 2,611$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0183$ ). Ambos os eixos dos testículos dos animais do GE apresentaram-se maiores (eixo craniocaudal, fig. 11C;  $t = 3,077$ ;  $df = 16$ ,  $p = 0,0072$ , e eixo látero-lateral, fig. 11D;  $t = 2,580$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0195$ ) do que os eixos dos testículos dos animais do grupo controle. Finalmente, o volume dos testículos dos animais do GE apresentou-se maior do que o volume dos testículos dos animais do grupo controle (fig. 11E;  $t = 2,287$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0353$ ).

Figura 12. Resultados obtidos da avaliação dos parâmetros microscópicos dos testículos de ratos Wistar adultos tratados com buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Dados analisados pelo teste *t* de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .

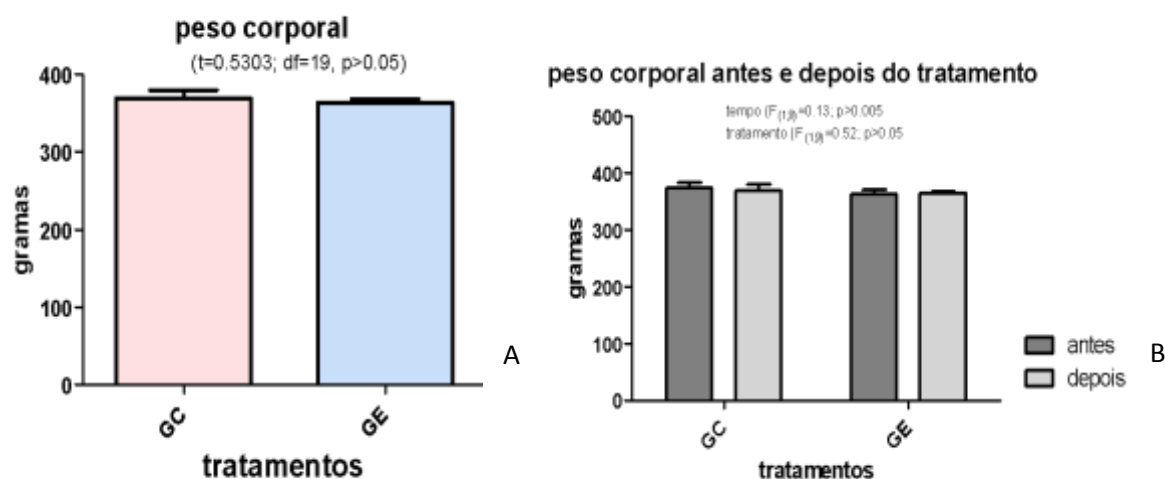


Na análise histológica dos testículos, observa-se que houve diferenças significativas nos parâmetros analisados. Os animais do GE apresentaram diminuição do parênquima (fig.12A;  $t = 2,163$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0451$ ), aumento do diâmetro (fig. 12B;  $t = 2,200$ ;  $df = 17$ ,  $p = 0,0419$ ) e da luz (fig. 12C;  $t = 2,290$ ;  $df = 19$ ,  $p = 0,0336$ ) dos túbulos seminíferos. Medidas relativas também foram tomadas, e a relação parênquima/diâmetro foi menor no GE do que no grupo controle (fig.

12D;  $t = 2,345$ ;  $df = 19$ ,  $p = 0,0301$ ). Já a relação luz/diâmetro foi maior para o GE do que para o grupo controle (fig. 12E;  $t = 2,268$ ;  $df = 18$ ,  $p = 0,0359$ ), e a relação parênquima/luz foi menor para o GE do que para o grupo controle (fig. 12F;  $t = 2,419$ ;  $df = 19$ ,  $p = 0,0257$ ). Foi observado que no GE o número de células de Leydig contadas era menor do que o número de células de Leydig do grupo controle (Fig. 12G;  $t = 2,845$   $df = 19$ ,  $p = 0,0104$ ).

#### 5.2.4 Peso corporal do rato antes da eutanásia e peso corporal antes e depois do tratamento.

Figura 13. Resultados obtidos da avaliação dos pesos dos animais no dia da eutanásia e o peso dos animais antes e após a administração com buchinha-do-norte (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) em ratos Wistar adultos. Dados analisados pelo teste  $t$  de Student não pareado, considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .



Não houve uma diferença significativa no peso corporal (fig. 13A;  $t = 0,5303$ ;  $df = 19$ ,  $p > 0,05$ ) e no peso corporal antes e depois do tratamento (fig. 13B; tempo  $F_{(1,9)} = 0,13$ ;  $p > 0,005$ ; tratamento  $F_{(1,9)} = 0,152$ ;  $p > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A buchinha-do-norte é usada popularmente na forma de chá. Por esse motivo, foi determinado que o EBN seria feito através da técnica de infusão. O rendimento obtido por esta técnica, no presente projeto, foi de 42,73%. Não foi possível encontrar um valor de referência para o rendimento do extrato aquoso de *Luffa operculata*, porém, o rendimento obtido para o extrato bruto aquoso desengordurado por éter de petróleo de *L. acutangula* foi de 7,18% (PIMPLE; KADAM; PATIL, 2012). Neste trabalho, os autores executaram o desengorduramento do extrato, ou seja, utilizaram éter de petróleo para remover os compostos de baixa polaridade, e obtiveram um rendimento de 7,18%. Para o presente trabalho, não foi realizado o procedimento de desengorduramento, uma vez que este procedimento poderia remover alguns dos principais compostos potencialmente importantes para a presente pesquisa, como as cucurbitacinas (KAWAHARA et al., 2004 e 2001), que apresentam polaridade relativamente baixa, além de esta ser uma metodologia não aplicada pela população para preparar o chá.

A buchinha-do-norte apresenta efeito tóxico que provoca aborto. O mecanismo de ação pelo qual a planta provoca o aborto não está totalmente elucidado. Porém, alguns estudos antigos demonstraram que as cucurbitacinas aumentaram a permeabilidade capilar (LAVIE; GLOTTER, 1971) e apresentaram efeito antifertilidade em camundongos fêmeas (SHOHAT et al., 1972). A buchinha-do-norte também é utilizada popularmente para aliviar os sintomas da sinusite, inclusive sendo matéria-prima para medicamentos homeopáticos usados para esse fim (ADLER, 1999), e para aliviar sintomas de problemas na garganta e no ouvido (ZIEGLER, 1964). Popularmente, o infuso preparado com os frutos de buchinha-do-norte pode ser usado por aplicação direta nas narinas, instilado, sendo assim parcialmente ingerido, o que pode refletir em intoxicação, provavelmente causada pela presença de cucurbitacinas, dependendo da frequência de uso do infuso nas crises de sinusite.

As cucurbitacinas causaram efeitos tóxicos severos e até morte em ovídeos e no gado que consumiram frutos de *Cucumis* e *Cucurbita* (GERARDIN et al., 2005).



Algumas cucurbitacinas, como C, D e E, podem causar efeitos indesejáveis e até mesmo a morte (NJOROGE et al., 1994). Por esses motivos, estudos que demonstrem a alteração comportamental e o comprometimento do aparelho reprodutivo masculino, cujos dados são escassos na literatura, devem ser reportados.

Por conta do alto poder tóxico desta planta, a dose administrada aos animais, de 1 mg/kg, foi estipulada como 1/3 de doses anteriormente avaliadas, de 3 mg/kg (BARILLI et al., 2007), uma vez que haveria cinco administrações sequenciais, por via oral.

Os experimentos executados com ratos Wistar adultos tiveram como objetivo principal avaliar se a administração do EBN exercia influência sobre o comportamento dos animais, através da utilização do aparelho de campo aberto e do teste claro-escuro. Ambos os aparelhos analisam o comportamento com base no conflito gerado entre o instinto exploratório e o medo de lugares não familiares ou de lugares iluminados. Estes equipamentos permitem a avaliação da presença de ansiedade, de parâmetros locomotores e a aversão ao claro (ou medo), e da alteração destes parâmetros após administração de drogas (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; HALL, 1934), bem como de comportamento doentio e sua reversão após a administração de medicamentos (MORAES et al., 2017). Por este motivo, ambos os modelos apresentam-se eficazes e complementares para a identificação de alterações comportamentais importantes decorrentes da administração de EBN, droga vegetal estudada no presente trabalho.

Por meio da análise em campo aberto é possível verificar alterações na locomoção, no instinto exploratório e na ansiedade de animais de laboratório decorrentes da administração de diferentes medicamentos. Os animais não passaram por reconhecimento prévio do aparato, porque o objetivo foi avaliar se havia ansiedade e qual era a resposta ao ambiente novo. Os resultados obtidos no campo aberto sugerem que a administração de EBN resultou na diminuição da locomoção dos animais do GE, comparativamente ao GC, cujo comprometimento motor dos animais do GE que os impediu de explorar o território tanto quanto os do GC, comportamento já observado anteriormente (TATEM et al., 2014). Este comportamento foi confirmado pelo tempo de imobilidade mais significativo para os animais do GE. O parâmetro “levantar” não apresentou alterações significativas.

Deste modo, pode-se concluir que as alterações no sistema locomotor causadas pela administração de EBN afetaram o deslocamento (ou exploração) horizontal, e não afetaram o deslocamento (ou exploração) vertical.

O parâmetro *grooming* está relacionado à manutenção de limpeza, termorregulação e excitação, frequentemente observado em roedores acordados, e apresenta um padrão sequencial e organizado de progressão céfalo-caudal (KALUEFF et al., 2007) que consiste em quatro movimentos básicos: uma aproximação com braços e mãos de forma elíptica em relação ao corpo, seguido de uma aproximação unilateral, depois bilateral e, por fim, lambidas pelo corpo. A avaliação precisa deste parâmetro consiste na medida de cada uma destas etapas, bem como na quantificação de mediadores neuroquímicos envolvidos com diversas estruturas do sistema nervoso central. No caso do presente estudo, estas medidas específicas de avaliação do *grooming* não foram feitas por conta do modo como os animais foram filmados, com as câmeras colocadas sobre o aparato. O tempo de *grooming* foi significativamente menor no GE do que para o grupo controle. Esses resultados podem também estar associados à ansiedade, talvez pelo fato de o EBN ter influenciado o sistema límbico. Para este projeto, não será possível a confirmação desta hipótese, pois nem amígdala nem hipotálamo foram acessados em termos dos neurotransmissores possivelmente envolvidos nesta questão. O eixo hipotalâmico-pituitário também pode estar envolvido nesta resposta, também sem possibilidades de a hipótese ser confirmada neste momento (KALUEFF et al., 2016).

A quantidade de cibalas fecais, geralmente relacionada ao medo do animal no aparato, foi menor no GE. Embora as cibalas fecais, por tradição, tenham sido usadas para quantificar medo e emocionalidade (HALL, 1934), atualmente, as análises decorrentes deste parâmetro têm caído em desuso, embora possam dar suporte à análise geral observada. No presente projeto, o número menor de cibalas fecais dá suporte à linha de análise de que EBN possa ser uma droga vegetal ansiogênica, como é possível ver a seguir.

O GE ficou menos tempo no centro do que o GC, assim como os animais do GE permaneceram mais tempo na periferia do aparato, em relação ao GC. O comportamento esperado para roedores é que permaneçam próximos às paredes do aparato de campo aberto, apresentando o que se denomina de tigmotaxia (LAMPREA et al., 2008), que é a tendência dos animais de permanecer próximos a

superfícies verticais. O fato de os animais do grupo experimental terem permanecido mais tempo na periferia e menor tempo no centro do aparato é um indicador do aparecimento de ansiedade (CURZON et al., 2009), e vem ao encontro dos resultados observados para cı́balas fecais associadas também à diminuição da locomoção.

Os resultados observados no modelo de análise comportamental em caixa claro-escuro foram expressos em diversos parâmetros. Para que isso seja feito, é possível iniciar os experimentos colocando-se os animais tanto do lado claro como do lado escuro (CHAULOFF et al., 1997). No caso do procedimento aqui realizado, os animais foram colocados inicialmente no lado escuro da caixa para que, propositadamente, se sentissem mais confortáveis ao abrigo de luz, o que, a princípio, permitiria que estivessem mais preparados a desencadear o processo exploratório instintivo, superando de modo mais rápido a aversão natural, ou medo, pelo lado claro. Em tese, quanto menos o animal estiver estressado, ansioso, com medo ou em estado doentio, menor será o tempo de latência para adentrar o lado claro. No presente estudo, o tempo de latência para entrada no lado claro foi maior para os animais do grupo experimental, o que pode ter acontecido por conta da influência da administração do EBN. Embora o instinto de exploração tenha permanecido nos animais do GE, observado pelo elevado número de tentativas para entrar no lado claro da caixa, estes animais, por conta da influência da administração de EBN, efetivamente levaram mais tempo para buscar o lado claro e permaneceram por mais tempo no lado escuro. Em caso de administração de drogas ansiolı́ticas (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997) ou de condições fisiológicas específicas, como parto recente em fêmeas (MILLER; PIASECKI; LONSTEIN, 2011), os animais tendem a permanecer mais no lado claro do que no escuro, pois o estado fisiológico e as drogas inibem o medo traduzido pela aversão ao lado claro, o que absolutamente não foi observado no caso dos animais tratados com EBN. Deste modo, podemos inferir que a administração de EBN pode ter provocado o aparecimento de efeitos ansiogênicos nos animais tratados (BOURIN; HASCOËT, 2003), assim como comportamento doentio (CYTOKINE, 2009), a ser confirmado futuramente com experimentos que envolvam a medida de citocinas ligadas ao processo inflamatório. Foi observado que os animais do GE apresentaram um número significativamente menor de transições claro-escuro do

que os animais do grupo controle. Alguns autores apontam este parâmetro como um dos fortes indicadores de ansiedade nos animais (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997), assim como a latência para a entrada no lado claro. Nossos resultados corroboram esta observação, dando suporte às primeiras observações realizadas em campo aberto que indicaram que a administração de EBN provoca o disparo de comportamento ansiogênico.

Ainda utilizando o modelo da caixa claro-escuro, foram analisados alguns parâmetros relacionados à locomoção dos animais em ambos os lados. Os animais do GE locomoveram-se menos no lado claro, bem como se levantaram menos no lado claro, em relação aos animais do grupo controle, o que demonstra que a administração de EBN alterou os deslocamentos dos animais e corroborou com o tempo de permanência no lado escuro, que foi maior. Mesmo no lado escuro, onde os animais do GE permaneceram por mais tempo, a locomoção foi menor, o que confirma os dados obtidos no aparato de campo aberto, cuja locomoção também foi menor. Os instintos de preservação e de medo, neste caso, levaram o animal a permanecer menos tempo imóvel no lado claro. Quanto ao parâmetro “levantar” no escuro, não houve diferenças significativas entre os dois grupos.

No presente trabalho, foi feita uma avaliação dos testículos de ratos Wistar adultos para verificação de alterações macroscópicas e microscópicas que ocorreram como consequência da administração de EBN. Os testículos apresentam um formato elipsoide e, portanto, sua análise macroscópica é feita sobre as alterações desta forma tridimensional, na qual são relevantes os parâmetros relativos às medidas do eixo craniocaudal e do eixo látero-lateral, para que o volume possa ser obtido. O peso absoluto e o peso relativo também foram avaliados.

Plantas que são consumidas pela população podem afetar os testículos, no caso dos homens. A Mamona (*Ricinus communis*) alterou de modo significativo a contagem, a motilidade e a viabilidade de esperma, bem como uma redução no volume do epidídimo (RAJI; OLOYO; MORAKYNIO, 2006). Foi observado que a ingestão do extrato etanólico das sementes de *Psoralea corylifolia* diminuiu o peso dos testículos dos ratos do grupo experimental em relação aos animais do grupo controle (TAKIZAWA et al., 2002).

Houve alterações significativas nos parâmetros “peso do testículo”, “peso

relativo” e “volume testicular”, bem como alterações nas medidas dos eixos craniocaudal e látero-lateral. Em todos esses parâmetros, os grupos experimentais apresentam aumento quando comparados com os grupos controle.

Quanto às análises microscópicas dos testículos, observou-se que o parênquima – que é a região onde se encontram as células de Sertoli e as células relacionadas à espermatogênese – encontra-se diminuído nos animais do GE, ao passo que o diâmetro dos túbulos seminíferos e a luz – região interna do túbulo seminífero responsável pela liberação dos espermatozoides rumo ao epidídimo – encontram-se aumentados. As alterações observadas podem estar relacionadas à administração de EBN. Outro dado muito importante observado foi o número reduzido de células de Leydig, o que representa uma possível diminuição na quantidade de testosterona produzida pelos animais que receberam o tratamento com buchinha-do-norte. Outras espécies vegetais apresentam respostas deletérias aos tecidos testiculares, como *Allamanda cathartica* L., conhecida popularmente como alamanda, ou dedal-de-dama. A administração do extrato aquoso das folhas desta espécie provocou alterações histopatológicas na produção e na qualidade do esperma de camundongos (SINGH; SINGH, 2008). A alamanda é uma espécie pertencente à família das Apocynaceae, conhecidas por produzirem peptídeos (NQYEN et al., 2015), alcaloides e compostos de origem terpênica como o plumierídeo (TIWARI; PANDEY; DUBEY, 2002) e outros iridoides (ABDEL-KADER et al., 1997). Em *Luffa operculata*, as cucurbitacinas apresentam também origem terpênica, bem como há relatos de peptídeos biologicamente ativos em espécies de *Luffa*.

Embora tenha havido alterações comportamentais e nas medidas testiculares nos animais do GE, não foram observadas diferenças entre os pesos dos animais do grupo controle e do GE, bem como nos pesos obtidos antes e depois do tratamento.

A utilização de buchinha-do-norte por homens é pouco estudada, a não ser em relatos referentes ao seu emprego em sinusite, por instilação ou por inalação, ambos a partir do chá feito com os frutos secos da planta. Os estudos científicos já publicados com *Luffa operculata* relatam a identificação de cucurbitacinas; também relatam, de modo superficial, atividade motora e dados sobre o comportamento, bem como seus efeitos sobre a reprodução de ratos, porém, sem mencionar seus

efeitos sobre o sistema reprodutor masculino. O presente estudo apresentou resultados significativos para a racionalização do controle de vendas desta espécie vegetal, fornecendo dados inéditos sobre a quantificação dos efeitos da administração do extrato aquoso sobre o comportamento e sobre as alterações deletérias no sistema reprodutor de ratos Wistar adultos.

## 7. CONCLUSÕES

A seguir, estão apresentadas as conclusões obtidas a partir da pesquisa:

- O extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte influenciou o comportamento geral de ratos.
- As alterações comportamentais observadas no campo aberto e na caixa claro-escuro sugerem que o extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte pode ter induzido os animais a comportamento doentio, porém, experimentos referentes à quantificação de citocinas relacionadas ao processo inflamatório precisam ser feitas para confirmação deste quadro.
- O extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte estimulou o aumento da ansiedade e a diminuição da locomoção de ratos.
- O extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte em ratos altera características macroscópicas do testículo.
- O extrato aquoso dos frutos de buchinha-do-norte altera microscopicamente testículos de ratos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M. Efficacy and safety of a fixed-combination homeopathic therapy for sinusitis. **Adv. Ther.**, v. 16, n. 2, p. 3-11, 1991.
- AHMED, B., ALAM, T., KHAN, S.A. Hepatoprotective activity of *Luffa echinata* fruits. **J Ethnopharmacol.** Jul; v. 76, n. 2, p. 187-9, 2001.
- ALMEIDA, Y. M. et al. Atividade moluscicida de algumas plantas do Nordeste brasileiro II. **An. Soc. Bras. Farmacol. Terap. Exper. Com.** 6.44, 1987.
- ALZUGARAY, C., ALZUGARAY, D. **Plantas que curam.** São Paulo: Ed. Três, 1983.
- AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. **Equine reproduction. Pennsylvania: Lea & Febiger.** Cap. 77, p. 658-688, 1993.
- ANANTHARAM, V. et al. Isolation, macromolecular properties, and combining site of a chito-oligosaccharide-specific lectin from the exudate of ridge gourd (*Luffa acutangula*). **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 31, p. 14621-7, 1986.
- ARGENTA, S. C. et al. Medicinal plants: popular culture versus science. **Vivências.** v. 7, n. 12, p. 51-60, maio/2011.
- BARILLI, S. L. S, SANTOS, S. T., MONTANARI, T. An experimental investigation on *Luffa operculata* (L.) Cogn. (buchinha-do-norte) as abortifacient plant. **Reprod. Clim.**, v. 22, n. 4, p. 165-168, 2007.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** v.1. São Paulo: LTC/Edusp, p. 255, 1978.
- BOURIN, M., HASCOËT, M. The mouse light-dark box. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 55-65, 2003.
- BROADHURST, P. L. **Experiments in psychogenetics: application of biometrical genetics to the inheritance of behavior.** In: EYSENCK, H. J. (Ed.). Experiments in personality. v. 1. London: Routledge & Kegan Paul, p. 251-256, 1960.
- CHAOULOFF F., DURAND M., MORMÈDE P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behav. Brain Res.**, v. 85, n. 1, p. 27-35, 1997.
- CHAMPNEY, R., FERGUSON, N. M., FERGUSON, G. G. Selected pharmacologica studies of *Luffa operculata*. **J. Pharm. Sci.** v. 63, n. 6, p. 942-943, 1974.



- CHAN, K.-C., YIN, M.-C., CHAO, W.-J. Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 3, p. 502-507, 2007.
- CLARKE, J. H. R., RATES, S. M. K., BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 41, 2007.
- CRAWLEY, J.N., GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 13, p. 167-170, 1980.
- CUCURBITACEAE. FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17036>>. Acesso em: 13 fev. 2017.
- CURZON, P., ZHANG, M., RADEK, R.J., FOX, G.B. **The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking.** In: BUCCAFUSCO, J.J. Ed. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2a Ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Capítulo 8. *Frontiers in Neuroscience*. 2009.
- CYTOKINE, D. R. Sickness behavior, and Depression. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 29, n. 2, p. 247-264, 2009.
- DIAZ, G. A. G. Aspectos técnicos sobre el cultivo del paste (*Luffa cylindrica*). Costa Rica: Ministério da Agricultura y ganadeira, p. 38, 1997.
- DU, Q.; CUI, H. A new flavone glycoside from the fruits of *Luffa cylindrica*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 7-8, p. 609-10, 2007.
- \_\_\_\_\_ et al. Antioxidant constituents in the fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. **J. Agr. Food Chem.**, v. 54, n. 12, p. 4186-90, 2006.
- DUKE, J. A., MARTINEZ, R. V. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary.** Flórida: CRC Press, 1994. p. 106.
- \_\_\_\_\_. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary.** Flórida: CRC Press, p. 224, 2000.
- GERARDIN, D. C. C. et al. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiol. & Behav.**, v. 84, p. 97-104, 2005.

- GIRALDI, M., HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.
- GRAHAM, J. G. et al. Antimycobacterial evaluation of peruvian plants. **Phytomedicine.**, v. 10, n. 6-7, p. 528-535, 2003.
- GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, n. 2, supl. 1, 1989.
- GUSMÃO, D. F.; et al. Influence of the intraperitoneal administration of antitumor *Abarema auriculata* extract on mice behavior. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 23, n. 6, p. 903-912, 2013.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. 1. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.**, v. 18, p. 382-403, 1934.
- JADHAV, V. B. et al. Hepatoprotective activity of *Luffa acutangula* against CCl<sub>4</sub> and rifampicin induced liver toxicity in rats: a biochemical and histopathological evaluation. **Indian J. Exper. Biol.**, v. 48, n. 8, p. 822-9, 2010.
- KAO, T. H., HUANG, C.W., CHEN, B. H. Functional components in *Luffa cylindrica* and their effects on anti-inflammation of macrophage cells. **Food Chem.**, v. 135, n. 2, p. 386-95, 2012.
- KALUEFF, A.V., et al. neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 17, n. 1, p. 45-59, 2016.
- KALUEFF, A.V., et al. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nat. Protoc.**, v. 2, p. 2558-2544, 2007.
- KAWAHARA, N. et al. Two new cucurbitacin glucosides, opercurins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 8, p. 1018-20, 2004.
- \_\_\_\_\_. Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBP2alphaA and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n. 10, p. 1377-9, 2001.
- KHAJURIA, A. et al. Immunomodulatory effects of two saponinins 1 and 2 isolated from *Luffa cylindrica* in Balb/C mice. **Bioorg Med. Chem. Lett.**, v. 17, n. 6, p. 1608-12, 2007.

- KHORANA, M.L., RAISINGHANI K.H. Studies of *Luffa echinata*. III. The oil and the saponin. **J. Pharm. Sci.**, v. 50, p. 687-9, 1961.
- LAMPREA, M. R., CARDENAS, F. P., SETEM, J., MORATO, S. Thigmotactic responses in open Field. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 41, n. 2, p. 135-140, 2008.
- LANINI, J., DUARTE-ALMEIDA, J.M., NAPPO, S., CARLINI, E.A. "Natural and therefore free of risks" - adverse effects, poisonings and other problems related to medicinal herbs by "raizeiros" in Diadema/SP". **Rev Bras Farmacogn.**, v. 19, n. 1A, p. 121-129, 2009.
- LAVIE, D., GLOTTER, E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. **Fortschr Chem Org Naturst.**, v. 29, p. 307-62, 1971.
- LIU, L. et al. Cloning and soluble expression of mature alpha-luffin from *Luffa cylindrica* and its antitumor activities in vitro. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, (Shanghai). v. 42, n. 8, p. 585-92, 2010.
- LUFFA. FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17089>>. Acesso em: 13 fev. 2017.
- MATOS, F. J. A., GOTTLIEB, O. R. Isocucurbitacina B, constituinte citotóxico da *Luffa operculata*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 39, p. 245-247, 1967.
- MENGUE, S.S. MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 11, n. 1, p. 21-35, 2001.
- MENGUE, S.S. MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. **Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras**. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Faculdade de Medicina da UFRGS. Porto Alegre. Rev. Saúde Pública, v. 35, n. 5, p. 415-420, 2001.
- MENON-MIYAKE, M. A. et al. *Luffa operculata* effects on the epithelium of frog palate: histological features. Brazil. **J. Otorhinolaryngol.**, v. 71, n. 2, p. 132-8, 2005.
- MILLER SM, PIASECKI CC, LONSTEIN JS. Use of the light-dark box to compare the anxiety-related behavior of virgin and postpartum female rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 100, n. 1, p. 130-137, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2007. Cadernos de Atenção Básica. Doenças Respiratórias Crônicas. Brasília-DF:Ministério da Saúde. 161 p.

- MONTEIRO, C.R. et al. Allergic fungal sinusitis: an update. **Rev Bras Otorrinolaringol.**, v. 68, n. 5, p. 736-42, 2002.
- MOORE, J. (2008). Conceptual foundations of radical behaviorism. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 96, n. 1, p. 127-144, 2011.
- MORAES, M.M. et al. Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. *Plos One.*, v. 12, n. 1, p. e0169446, 2017.
- MORETTO, et al. Relationship between nutritional status and frailty in Brazilian elderly. **Rev. Bras. Clin. Med.** São Paulo, jul-ago, v. 10, n. 4, p. 267-71, 2012.
- NAGAO, T. et al. Studies on the constituents of *Luffa acutangula* Roxb. I. Structures of acutosides A-G, oleanane-type triterpene saponins isolated from the herb. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, n. 3, p. 599-606, 1991.
- NJOROGE, G. N. ; NEWTON, L. E. Edible and Poisonous Species of Cucurbitaceae in the Central Highlands of Kenya. **J. East Afr. Nat. Hist.**, v. 83, n. 2, p. 101-115, 1994 .
- O´ DONNEL, L., et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocr Rev.**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.
- OLIVEIRA, D. R. de et al. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 173, p. 424-34, 2015.
- PARADA,B. et al. Infertilidade Masculina e Factores Ambientais. **Acta Urol.**, v. 21, n. 4, p. 9-15, 2004.
- PASQUALOTTO F.F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 29, n. 2, 2007.
- PETROVSKA B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev.** v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PIMPLE, B. P., KADAM, P. V., PATIL, M. J. Protective effect of *Luffa acutangula* extracts on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins and antioxidants. **Asian Pacific J. Trop. Med.**, v. 5, n. 8, p. 610-5, 2012.
- PINHEIRO B. P.; AMARO G. B. **Ocorrência e controle de nematoides nas principais espécies cultivadas de cucurbitáceas.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF. Novembro, 2010.

- PITREZ P.M.C. Acute upper respiratory tract infections: outpatient diagnosis and treatment. **J. Pediatr.**, v. 79, Supl.1, p. 77-86, 2003.
- RAJI Y, OLOYO AK, MORAKINYO AO. Effect of methanol extract of *Ricinus communis* seed on reproduction of male rats. **Asian J Androl.**, v. 8, n. 1, p. 115-21, 2006.
- RASBAND, W., ImageJ documentation. Disponível em: <www.rsb.info.nih.gov>. Acesso em: 12/5/2017.
- SALA, M. et al. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of 2,3-thiazolidin-4-one derivatives on human breast cancer cell lines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, p. 4990-4995, 2013.
- SCALIA, R. A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Luffa operculata*. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 81, n. 4, p. 422-430, 2015.
- SCHILLING, E. E.; HEISER, C. B. Flavonoids and the systematic of *Luffa*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 9, n. 4, p. 263-265, 1981.
- SERRA, B.D.V; CAMPOS, L.A.O. Entomophilic pollination of squash, *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). **Neotrop. Entomol.**, v. 39, n. 2, 2010.
- SHANG LH, et al. *Luffa echinata* Roxb. Induces human colon cancer cell (HT-29) death by triggering the mitochondrial apoptosis pathway. **Molecules.**, v. 17, n. 5, p. 5780-94, 2012.
- SHIM, S.M., PARK, T. S. Profiling of flavonols in seeds and sprouts of *Luffa cylindrica*. **Nat. Prod. Comm.**, v. 9, n. 11, p. 1567-8, 2014.
- SHOHAT B., et al. Antifertility activity of dihydroelatericin A in the female mouse. **Experientia.**, v. 28, n. 10, p. 1203-5, 1972.
- SILVA, L. et al. Preclinical evaluation of *Luffa operculata* Cogn. and its main active principle in the treatment of bacterial rhinosinusitis. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, S1808-8694(16)30238-5, 2016.
- SINGH, A., SINGH, S.K. Reversible antifertility effect of aqueous leaf extract of *Allamanda cathartica* L. in male laboratory mice. **Andrologia.**, v. 40, p. 337-345, 2008.
- STODDARD G.J., et al. Ginkgo and Warfarin Interaction in a Large Veterans Administration Population. **AMIA Annu Symp Proc.**, p. 1174-83, 2015.
- SUYENAGA E.S. o risco do uso de plantas medicinais indicadas por ervateiros no tratamento da sinusite em Porto Alegre. **Estudos.**, v. 34, n. 11/12, p. 833-842, 2007.

- TAKASHIBA K. S. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Maringá, v. 33, n. 1, p. 25-33, 2011.
- TAKIZAWA T, et al. Gonadal toxicity of an ethanol extract of *Psoralea corylifolia* in a rat 90-day repeated dose study. **J. Toxicol. Sci.**, v. 27, n. 2, p. 97-105, 2002.
- TATEM K. S., et al. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. **Journal of Visualized Experiments : JoVE.**, v. 91, 51785, 2014.
- THOMPSON E. E. Doctors, Doctrines, and Drugs in Ancient Times. **Bull. Med. Libr. Assoc.**, v. 50, n. 2, p. 236-242, 1962.
- VALENTE, L. M. M. Cucurbitacins and their main structural characteristics. **Quím. Nova.**, v. 27, n. 6, 2004.
- VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova.**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VIANNA, M. R. et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learning & Memory**, v. 7, n. 5, p. 333-340, 2000.
- WANG, H. NG, TB. Luffangulin, a novel ribosome inactivating peptide from ridge gourd (*Luffa acutangula*) seeds. **Life Sci.**, v. 70, n. 8, p. 899-906, 2002.
- YEUNG, H. W.; LI, W.W.; NG, TB. Isolation of a ribosome-inactivating and abortifacient protein from seeds of *Luffa acutangula*. **J. Pept. Prot. Res.**, v. 38, n. 1, p. 15-9, 1991.
- ZIEGLER E. *Luffa operculata* as a homeopathic drug in throat, nose and ear diseases. **Landarzt.**, v. 40, p. 78-9, 1964.

## ANEXO I. CERTIFICADO CEUA



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "COMPORTAMENTO DE PROLE DE RATAS INFLUENCIADAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE BUCHINHA-DO-NORTE DURANTE A GESTAÇÃO", registrada com o nº 043/16, sob a responsabilidade de IVANA BARBOSASUFFREDINI e CINTHIA DOS SANTOS. - 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) UNIP em reunião de 17/08/2016

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (X)
Vigência de autorização		15/07/2016 - 31/12/2016
Espécie / linhagem/ raça		RATO ISOGÊNICO WISTAR
Nº de animais		190
Peso / idade		12-16 SEMANAS / 350G
Sexo		Fêmea e Macho
Origem		BIOTÉRIO DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA USP

Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade Paulista – UNIP

Campus: INDIANÓPOLIS

Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000

Fone: (11) 5586-4091 – Fax: (11) 5586-4073

E-mail: [ceua@unip.br](mailto:ceua@unip.br) – <http://www.unip.br>

**ANEXO II – ARTIGO DERIVADO DA DISSERTAÇÃO*****BUCHINHA-DO-NORTE* IMPAIRS BEHAVIOR AND AFFECTS THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF ADULT MALE WISTAR RATS**

**Cinthia dos S. Alves<sup>1</sup>; Humberto V. Frias<sup>1</sup>; Maria M. Bernardi<sup>1</sup>; Thiago Kirsten<sup>1</sup>, Flora Cordeiro<sup>1</sup>, Ivana B. Suffredini<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Graduation Program in Environmental and Experimental Pathology, University Paulista – UNIP

<sup>2</sup>Center for Research in Biodiversity, University Paulista – UNIP

\* Corresponding author. IBS. Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade, Universidade Paulista – UNIP, Av. Paulista, 900, 1 andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil, 01310-100. Phone: 55 11 3170-3776, FAX: 55 11 3170-3978.

**ABSTRACT**

Buchinha-do-norte (*Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae) is popularly used to relieve symptoms of sinusitis, although information on the influence of plant administration over behavior and over the male reproductive system is scarce in the literature and extremely prospective. The present study aims to fulfill the gap of information focusing on quantitatively overseeing the question. The strategy was to observe rat locomotion and anxiety in the open field (OF) and in the light-dark test (LDT), and then observe the macroscopical and microscopical alterations on rats testis. Rats were divided into two groups, control (GC) and experimental (GE). GE received 1.0 mg/kg per day of EBN, orally, for five consecutive days, while GC received water following the same posology. In the 6<sup>th</sup> day, each animal was evaluated in OF and in LDT for 3 min each apparatus. Afterwards, the animals were euthanized and the left testicles were removed. In the OF, GE animals showed decreased locomotion and remained less time in the center of the apparatus, demonstrating a possible anxiety. In the LDT GE animals showed greater difficulty in moving to the light side of the device, remained longer in the dark side, less displacement on both sides, and less transitions between sides. These characteristics may be related to the occurrence of anxiety in the GE induced by the EBN administration. Testicle weights, relative weights, testicular volume, cranio-



caudal and laterolateral axes presented an increase in relation to the CG. Microscopic changes were also observed in the parenchyma, lumen and diameter of the seminiferous tubules. The administration of EBN significantly altered anxiety, locomotion and the testes of rats.

**Keywords:** *buchinha-do-norte*, *Luffa operculata*, sinusitis, behavior, open field, light-dark box

## INTRODUCTION

The use of plants for medicinal purposes, for treatment, cure and prevention of diseases, is one of the oldest forms of medicinal practices of mankind. In the early 1990s, the World Health Organization (WHO) reported that 65-80% of the population in developing countries depended on medicinal plants as the only form of access to basic health care (Junior, 2005).

Upper respiratory tract infections (URIs) are one of the most common problems encountered, particularly in children, resulting in significant morbidity worldwide (Pitre, 2003). Sinusitis, for example, is a URI and can be defined as a bacterial infection of the paranasal sinuses. The paranasal sinuses are constituted by cavities belonging to four bony structures: maxillary, ethmoidal, frontal and sphenoidal. These cavities communicate with the nasal passages through small holes (ostia). The frontal and sphenoidal sinuses develop after four years of age, reaching their adult size only at puberty (Pitre, 2003).

In order to circumvent the side effects of medicines, people consume medicinal plants. For the treatment of sinusitis, for example, different plant preparations are used by the population, such as the decoction of sunflower seed (*Helianthus annuus* L.), decoction of the fruit of the buchinha-do-norte (*Luffa operculata* (L.) Cogn. eucalyptus (*Eucalyptus citriodora* L.), infusion of *capim-de-são-josé* (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) JF Watson), lavender (*Lavandula angustifolia* Miller), garlic (*Allium sativum* L.) and lemon (*Citrus limon* (L.) Burman F.) (Grandi, 1989). Many of these plants have important side effects, such as garlic, which should not be consumed by people with blood clotting problems (Chan et al., 2007), or *buchinha-do-norte*, also popularly known for its abortive effects (Revilla, 2002). There is a recurrent questioning about the use of medicinal plants, since the belief in the safety related to products of natural origin consumption of products of natural origin is widespread. Although frequently in use, teas prepared with certain plants can cause toxic effects and drug interactions (Stoddard et al., 2015). The efficacy and safety of medicinal plants should be demonstrated (Clarke, 2007).

*Buchinha-do-norte*, also known as *cabacinha*, *buchinha*, *bucha-dos-paulistas*, *purga-de-João-Pais* (MENGUE et al. 2001), is one of the species popularly used against sinusitis, besides the abortive side effect, frequently reported by the population. It is used in homeopathic and alternative medicine (MENON MIYAKE MA

et al., 2005), also indicated against sinusitis. It is commonly found in the tropical America and is cultivated mainly in the Northeast and North of Brazil. Its fruit, the used organ, is ovoid-oblong, with brownish appearance when dry, and spongy, formed by a reticulated tissue, sometimes used as "vegetal sponge". The fruit is known in folk medicine for its purgative effect. Dry fruits are indicated against "rhinitis and sinusitis", administered through inhalation or nasal aqueous solution in droplets, showing a potential increase in intoxication (MENGUE et al. 2001).

According to testimonials, the use in cases of sinusitis can cause severe nasal irritations and bleeding (MENGUE et al., 2001). In Brazil, the infusion (tea) of the dried fruit of *buchinha-do-norte* is used to make inhalation or nasal instillation, and results in profuse release of mucus, relieving nasosinusal symptoms, and is used by both women and men. There are reports of nasal irritation, epistaxis and anosmia due to high toxicity, but there are not many reports (MENON, 2005). As the main side effect of the dry fruit of *buchinha-do-norte* is related to pregnant women, there is a lack of information concerning its importance to the male reproductive system, or even to its influence over behavior, in men, although they consume the medicinal plant against sinusitis.

Male infertility affects over 10% of reproductive age couples worldwide and can be treated in many cases. Infertility can be defined as the inability of a sexually active couple, without the use of contraceptive methods, to establish a pregnancy within one year (PASQUALOTTO, 2007). The causes of male infertility may be of genetic, endocrine, immunological and environmental origin. Theoretically, chemical agents can damage spermatogenesis at any stage, from spermatogonia to mature spermatozoa (PARADA, 2004). Some plants are known for their impairment over male reproductive system, as cannabis, neem, species from *Gossipum* genera, and even some commonly consumed foods such as papaya, garlic, rosemary, curcuma, among others (D'Cruz et al., 2010).

There is a lack of information in the literature related to the specific use of *buchinha-do-norte* by men, in reference to its influence over behavior and over the reproductive system. The present work aims to verify the effects of the aqueous extracts of *buchinha-do-norte* orally administered to male rats over behavioral changes, particularly over locomotion and anxiety, and to verify if it causes macroscopical and microscopical alterations of the testis.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant extract

Plant material, which consists in the dried fruits of *buchinha-do-norte* (*L. operculata*), was obtained from Santos Flora (lot # BUCHO 01/0914, collect date 24/09/2014, validity: 24/09/2017, origin Brazil). Plant extract was prepared according to its popular use, as an infusion, so, one dried fruit was added to 300 mL of boiling water. For the pharmacological assays, 15 dried fruits (34.677 g) were added to 5,100 mL of Milli-Q boiling water, and the infuse was kept under heat for 10 minutes. After this period, infusion was cooled, filtered, frozen (-70° C) and lyophilized, resulting in the aqueous extract of *buchinha-do-norte*, here called EBN.

### Animals

Twenty one adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing approximately 350 g, 20 to 23 weeks of age, were used. The rats were kept in polypropylene cages (45.5 X 34.5 X 20 cm), in a microisolator system (Tecniplast, Buguggiate, Italy), under controlled temperature (22 ° C ± 2 ° C), controlled humidity (55-65% relative humidity) and under artificial lighting (12h light cycle and 12h dark, lights being switched on at 7h00). They were kept in the boxes for a week before the experiments to adapt to the laboratory conditions, in number of 5 per box. The animals had free access to filtered water and irradiated feed (BioBase, Águas Frias, Brazil) during the whole experiment. The animals were kept in a bed made of sterilized wood and the bad changing was weekly done, in order to minimize interference with the behavior due to ammonia.

### Open Field evaluation

Open field (OF) apparatus was used in order to evaluate the influence of EBN over the locomotion and anxiety of the animals (Broadhurst, 1960). The open field consists of a rounded arena whose walls are clear, the floor has divisions on which the animals move and the displacement can be measured, being a direct way to evaluate the influence of a treatment on locomotion and on anxiety. The apparatus is located in a light room, so as to provoke a paradox between exploring the clear arena and hiding in the edges (known as a thigmotactic answer), once rodents tend

to have a predilection for dark and non-exposed places. So, the evaluation in the OF occurs when the animal finds itself in the paradox. Initially, each animal is placed in the central circle of the arena and are evaluated for 3 minutes for the following parameters: frequency of locomotion, immobility time, rearing frequency, number and time of grooming, time spent in the center of the apparatus, time spent on the borders of the apparatus and number of fecal *boli* (Estork et al., 2016 and 2014; Gusmão et al., 2013a and 2013b).

### **Light-dark box evaluation**

Immediately after the evaluation in the open field, the animals were placed in a light-dark box (LDB) for evaluation of anxiety. The model is based on the aversion of rodents to clear, light spaces, generating a conflict between remaining in the closed and dark space and the exploratory instinct to the light side. The device consists of an acrylic box divided into a dark compartment and a light and bright compartment separated by a wall containing a door. For the current experiment, the animals were allocated in the dark side of the box. They remained under experiment for 3 minutes (Shimada et al., 1995). The parameters evaluated during the test were latency to transit to light side; number of attempts to enter the light side; time spent in the dark side and in the light side, light and dark sides locomotion and rearing frequency and number of fecal *boli* in dark and in light sides (Crawley; Goodwin, 1980).

### **Macroscopic evaluation of testicles**

After euthanasia, the left testes were taken, weighed in an analytical scale and measured by both cephalo-caudal and lateral-lateral axes with a caliper rule. Testes volumes were calculated by the formula of an ellipsoid as follows:  $V=4/3 \cdot \pi ab^2$ , where a is the semiprolate axis (cephalo-caudal) and b is the semioblate axis (lateral–lateral).

### **Hystological preparation of testicles**

Testicles were macerated in Bouin for two hours. After that, testes were

transversally cut in the mid lateral-lateral axis, then, remained for another 24 h in the Bouin. After that, both poles of the testicles were cut and again macerated in Bouin for another 24 h. Finally, testicles were transferred to 70% ethanol until histological processing. The histological processing started with testicles dehydration with a series of 75% ethanol, absolute ethanol, absolute e ethanol, by 1 h each step. Then, testicles were submitted to a xylol series following the sequence 50% ethanol/xylol, xylol, xylol, for 1 h each step. After that the material was impregnated with liquid paraffin, twice, for 1 h. The material was packed in paraffin and 4 to 5 micra cuts were made. Cuts were put in a 26 x 76 mm blade and then dewaxed for 20 min with xylon and then with ethanol 50% the cuts were stained with Harris Hematoxylin for 10 min, and then with eosin for 1 min, and coverslips were added. Half of the testicles cuts was stained with periodic acid of Schiff (PAS).

### **Statistical analyses**

Test *t* of Student was adopted to evaluate parametric data (GraphPad Prism 5.0).

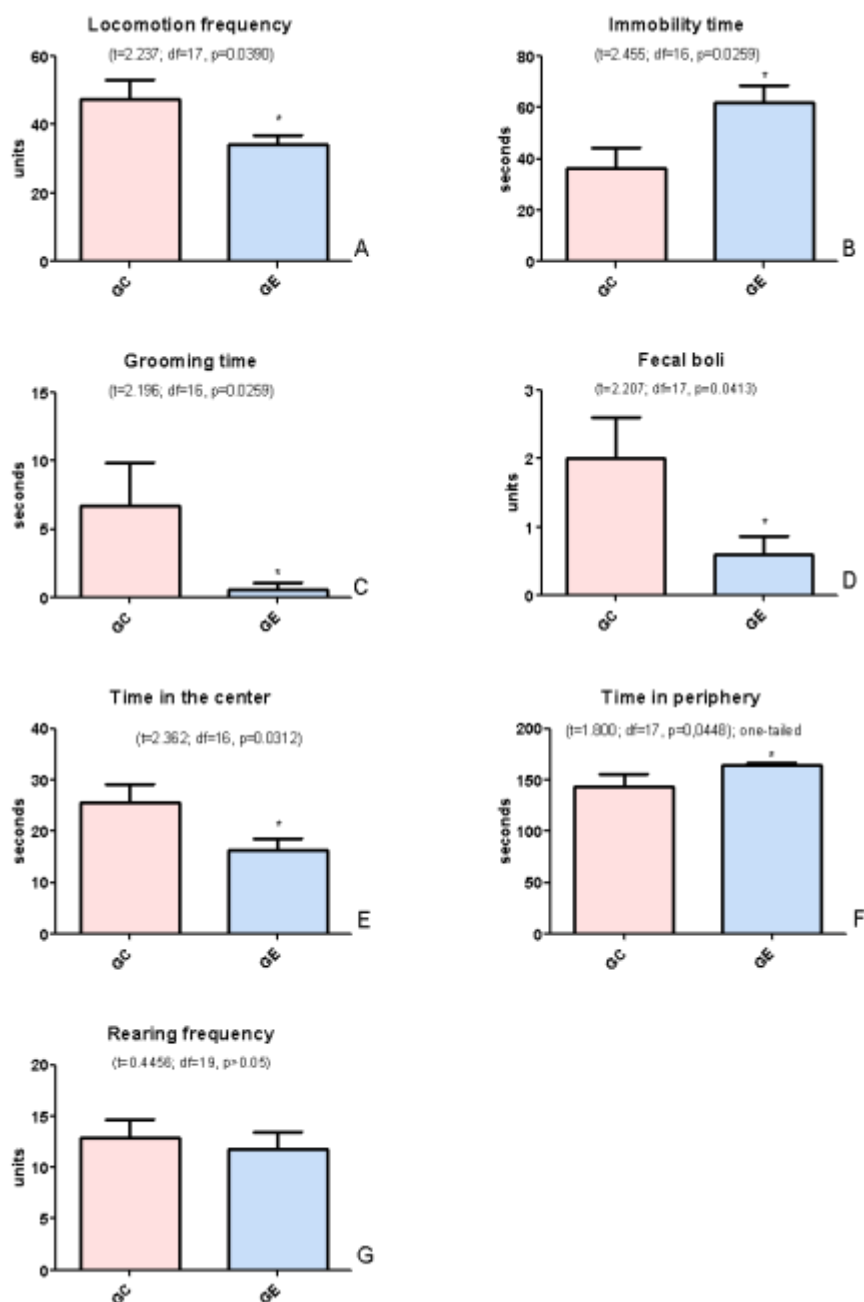
## **RESULTS**

### Botanical results

The final weight and yield of EBN were 14.82 g and 42.73%, respectively, in relation to the dry fruit weight.

### Behavior data

Results obtained from OF apparatus are disposed in Figure 1.



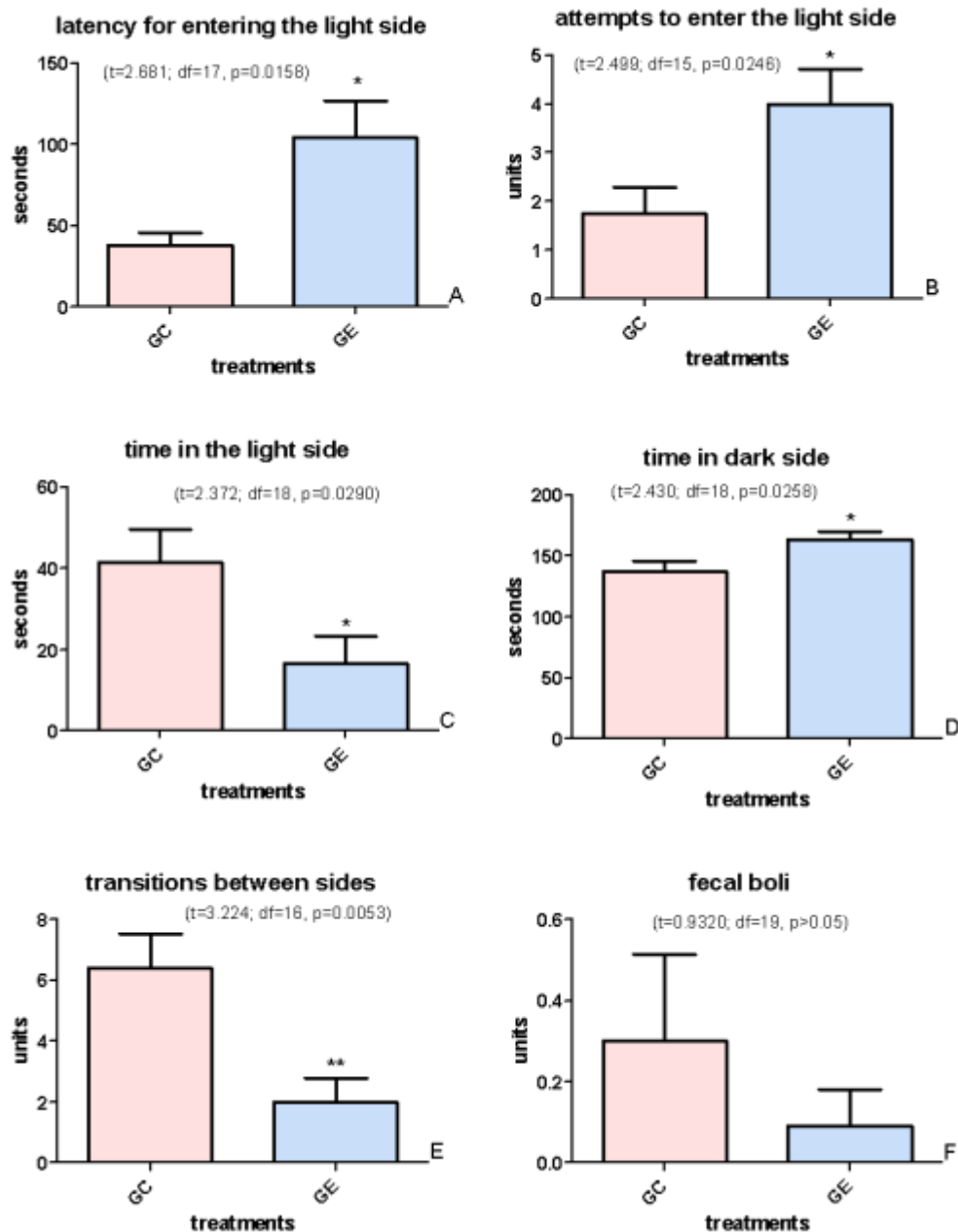
**Figure 1.** Behavior results obtained from the open field analyses of adult male Wistar rats that received treatment with the aqueous extract of *buchinha-do-norte* (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) and with vehicle. Test *t* of Student, significance IF  $p < 0.05$  (GraphpadPrism 5.0).

Administration of EBN impaired locomotion parameter (fig 1A;  $p < 0.05$ ), immobility (fig.1B;  $p < 0.05$ ), time of grooming (fig 1C;  $p < 0.05$ ), fecal boli (fig 1D;  $p < 0.05$ ) and time in the center (fig 1E;  $p < 0.05$ ), while improved the time spent in the



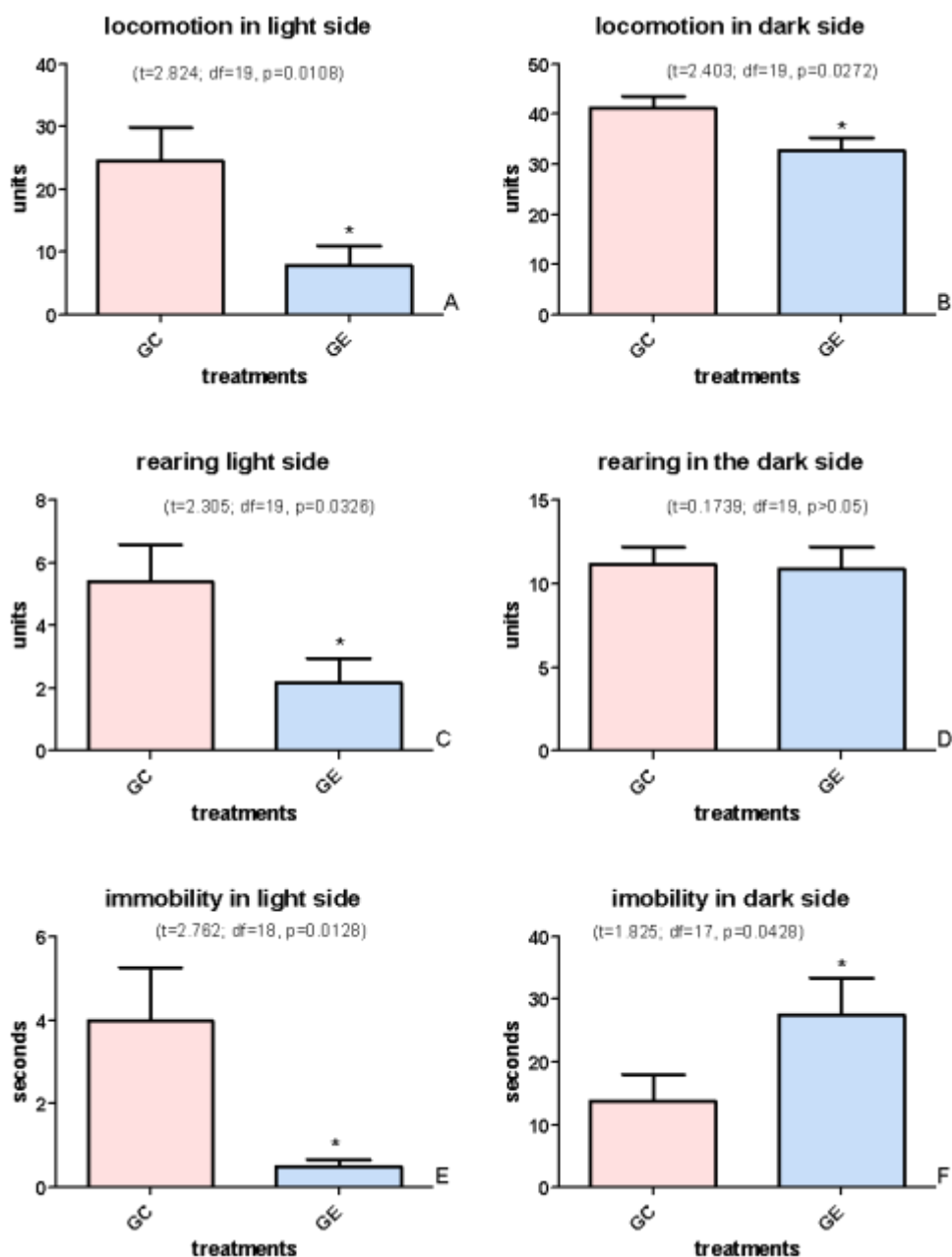
periphery of the apparatus (fig 1F;  $p < 0.05$ ). Rearing frequency was not significantly different.

The results obtained in the evaluation of the animals in light-dark box are shown in figures 2 and 3, below.



**Figure 2.** Results obtained from behavior analyses in light-dark Box after administration of the aqueous extract of *buchinha-do-norte* (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) to adult male Wistar rats. Test *t* of Student, significance if  $p < 0.05$  (GraphpadPrism 5.0).

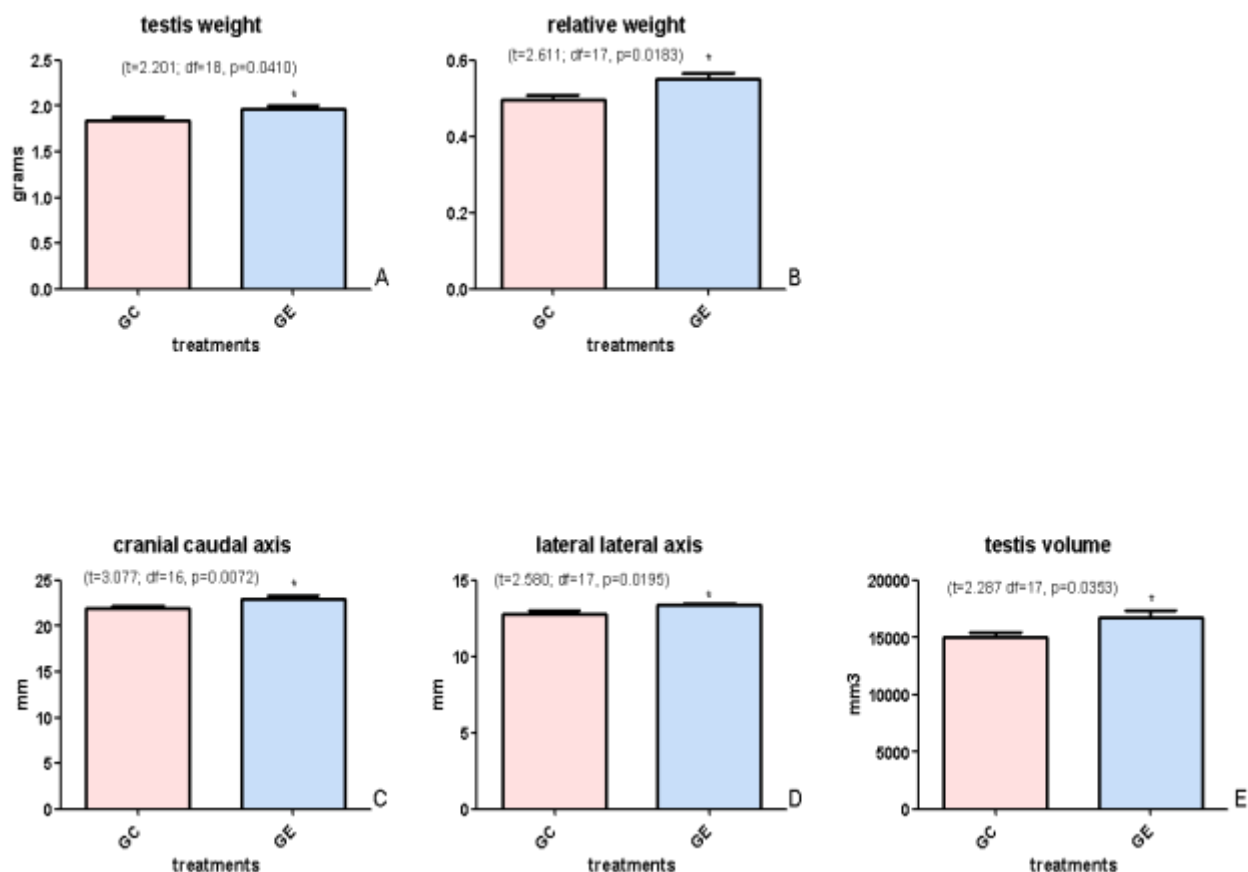
The latency to enter the light side was higher to the animals from GE (fig 2A;  $p < 0.05$ ), which also showed more attempts to enter the light side (fig 2B;  $p < 0.05$ ). Animals generally showed a natural preference to remain longer in the dark side of the box, although normal animals tend to explore and defeat the paradox earlier than compromised animals. Here, animals from GE group spent less time in the light side (fig 2C;  $p < 0.05$ ) and remained longer in the dark side (fig 2D;  $p < 0.05$ ) and even transited less between light and dark sides (fig 2E;  $p < 0.05$ ). No significant differences in fecal boli was observed (fig 2F;  $p > 0.05$ ).



**Figure 3.** Results obtained from behavior analyses in light-dark Box after administration of the aqueous extract of *buchinha-do-norte* (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae) to adult male Wistar rats. Test *t* of Student, significance if  $p < 0.05$  (GraphpadPrism 5.0).

Impairment was observed for locomotion in light side of LDB (fig. 3A;  $p < 0.05$ ), locomotion in dark side (fig. 3B;  $p < 0.05$ ), rearing in light side (fig. 3C;  $p < 0.05$ ) and also in the immobility in the light side (fig. 3E;  $p < 0.05$ ), although an improvement in the immobility in the dark side (fig. 3F;  $p < 0.05$ ) were observed. No statistical differences were observed in the rearing in the dark side (fig. 3D;  $p > 0.05$ ).

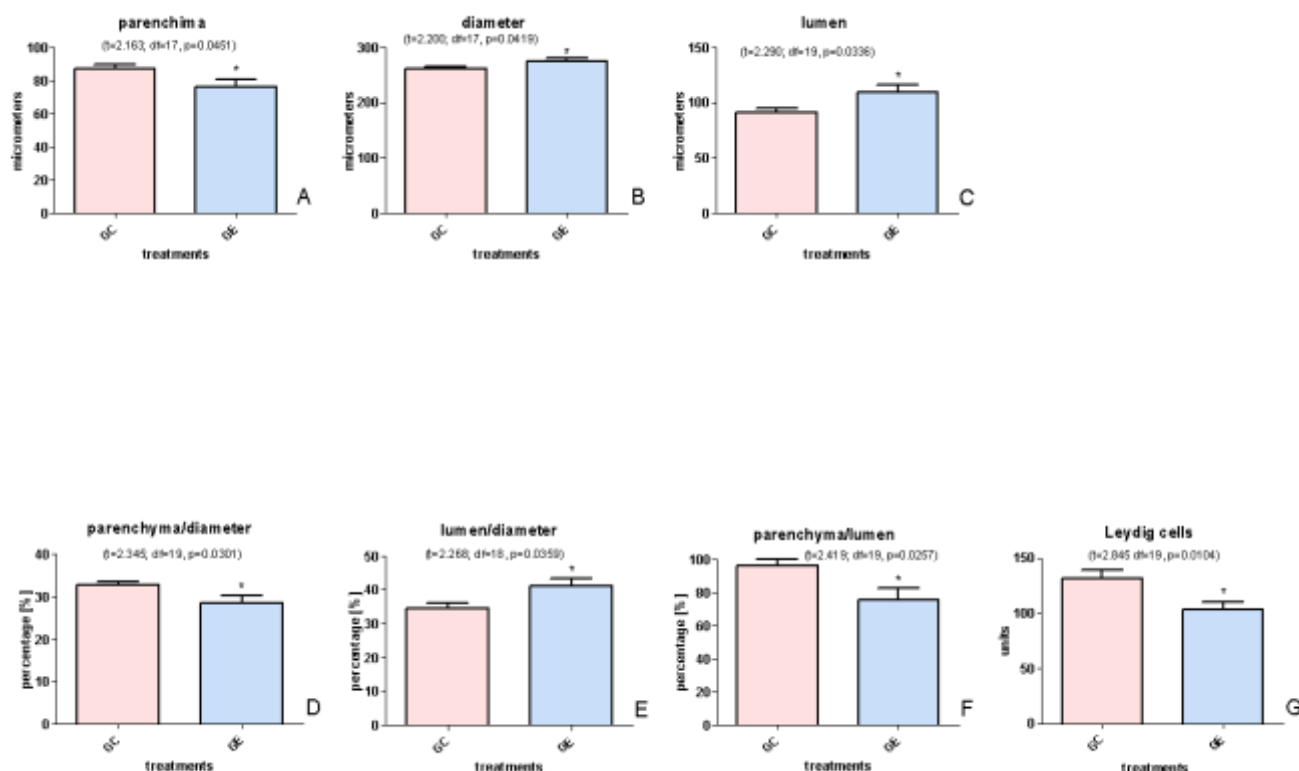
Figure 4 shows data obtained from the macroscopic evaluation of the testicles.



**Figure 4.** Results obtained from the evaluation of the macroscopic parameters of the testicles of male adult Wistar rats treated with *buchinha-do-norte* (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Test  $t$  of Student, significance if  $p < 0.05$  (GraphpadPrism 5.0).

It was observed that GE testicles showed to be significantly heavier than those belonging to GC (fig. 4A;  $p < 0.05$ ), and that the relative weight was also improved (fig. 4B;  $p < 0.05$ ). Both cephalo-caudal and lateral-lateral axes were improved in GE, in relation to GC (fig 4C;  $p < 0.05$  and Fig 4D;  $p < 0.05$ ), respectively. Volume of GE's testicles were augmented, in relation to those belonging to GC (fig. 4E;  $p < 0.05$ ).

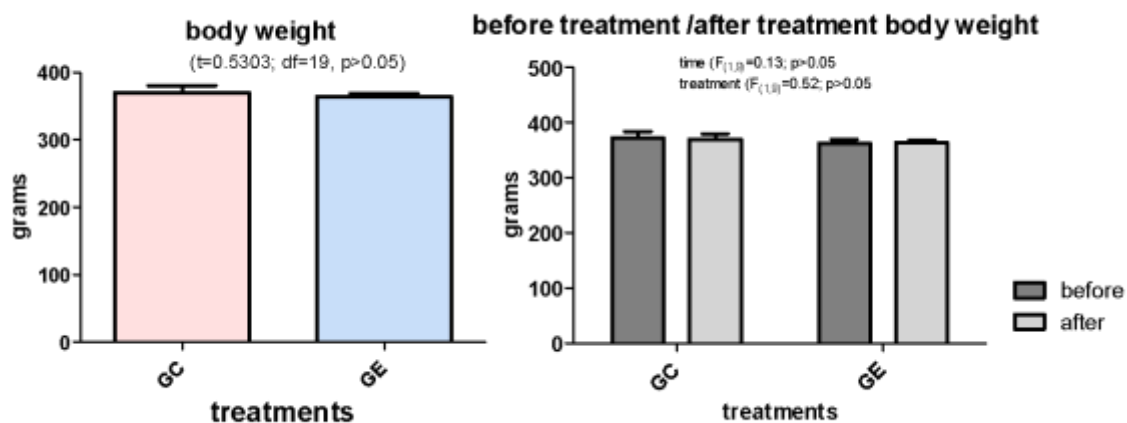
Figure 5 shows results obtained from the histological evaluation of the testicles.



**Figure 5.** Results obtained from the evaluation of the microscopic parameters of the testicles of male adult Wistar rats treated with *buchinha-do-norte* (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Test *t* of Student, significance if  $p < 0.05$  (GraphpadPrism 5.0).

The microscopic evaluation of rats testicles was based on the measurements of seminiferous tubules parenchyma, lumen and diameter, as well as the relative measure concerning parenchyma/diameter, lumen/diameter and parenchyma/lumen. Leydig cells were also evaluated. Parenchyma was impaired in GE (fig. 5A;  $p < 0.05$ ), diameter was wider in GE (fig. 5B;  $p < 0.05$ ) and lumen was also wider in GE (fig. 5C;  $p < 0.05$ ), in relation to GC. Parenchyma/diameter was impaired in GE (fig 5D;  $p < 0.05$ ), lumen/diameter was augmented (fig. 5D;  $p < 0.05$ ) and parenchyma/lumen was impaired (fig. 5E;  $p < 0.05$ ).

Figure 6 shows the body weight and the relationship between body weight before and after treatment with EBN.



**Figure 6.** Results obtained from the evaluation of the body weights of male adult Wistar rats treated with *buchinha-do-norte* (*Luffa operculata*, Cucurbitaceae). Test *t* of Student, significance if  $p<0.05$  (GraphpadPrism 5.0).

Body weight of animals was taken in the last day of experiment, after five days of extract administration. No significant differences were observed in both GE and GC (fig. A;  $p>0.05$ ). Body weights were measured before and after the treatment with EBN, and were compared. No significant differences were observed (fig. 6B;  $p>0.05$ ).

## Discussion

*Buchinha-do-norte* is popularly used in the form of infusion, which was the extraction technique adopted, resulting in a yield of 42.73%. It was not possible to find a reference value for the yield of the aqueous extract of *buchinha-do-norte*, however, the yield obtained for crude oil extract degreased by petroleum ether of *L. acutangula* was 7.18% (Pimple, Kadam, Patil, 2012). For the present work, the degreasing procedure was not performed, since this procedure could remove some of the main potentially important compounds possibly present in the extract, such as cucurbitacins (Kawahara et al., 2004 and 2001), which have relatively low polarity.

*Buchinha-do-norte* is used to alleviate sinusitis symptoms as well as an abortifacient. The mechanism of action by which the plant causes abortion is not yet defined. However, some ancient studies have shown that cucurbitacins increased capillary permeability (Lavie and Glotter, 1971) and showed antifertility effect in female mice (Shohat et al., 1972). *Buchinha-do-norte* is also used as raw material for homeopathic medicines used in sinusitis (Adler, 1999) and to alleviate symptoms of throat and ear problems (Ziegler, 1964). The infusion prepared with the *buchinha-do-norte* fruits can be directly instilled in the affected nostrils. The procedure may involve a partial ingestion and intoxication. The vapor of the infusion can also be inhaled.

Cucurbitacins caused severe toxic effects and even death in sheep and cattle that consumed fruits of *Cucumis* and *Cucurbita* (Rixos et al., 2005). The pharmacological dose of cucurbitacins is very close to the toxic dose, which makes it difficult to use as a drug (Blascovich et al., 2006). Some cucurbitacins such as C, D and E can cause undesirable effects and even death (Njoroge et al., 1994). For these reasons, studies that demonstrate behavioral alteration and impairment of the male reproductive tract, whose data are scarce in the literature, should be reported.

Experiments done with adult Wistar rats had as the main objective to evaluate whether EBN administration exerted influence over animal behavior by the use of open field apparatus and the light-dark test. Both devices analyze behavior based on the conflict generated between the exploratory instinct and the fear of unfamiliar places or enlightened places. These devices allow the assessment of the presence of anxiety, locomotor parameters and aversion to light (or fear), induced by drug



administration (Crawley; Goodwind, 1980; Hall, 1934) or by disease (Moraes et al., 2017). For this reason, both models are effective and complementary for the identification of important behavioral changes resulting from the administration of EBN, a plant drug studied in the present study.

By the analysis in the open field, it is possible to verify changes in the locomotion, the exploratory instinct and the anxiety of laboratory animals subjected to the administration of different drugs. In the present study, the animals did not undergo prior recognition of the device because the purpose was to assess whether there was anxiety and what the response was to the new environment. The first results in the open field suggest that the EBN administration significantly impaired the locomotion of the GE animals. The weakened motor conditions interfered with the exploring abilities of GE animals, in relation to GC animals. A similar condition was observed in animal models of neuromuscular diseases (TATEM et al., 2014), where clearly animals had extreme difficulty in dislocating, tending to remain still. The significant immobility time observed for GE animals supports that EBN influenced locomotion system. There were no significant changes in rearing frequency. So, alterations in displacement or horizontal exploration, occurred after administration of EBN, while no influences of spatial (or vertical) exploration was observed.

Grooming parameter is related to the maintenance of cleaning, to thermoregulation and to excitation, often observed in awoken rodents. Grooming shows a stereotyped, organized and sequential pattern of cephalo-caudal progression (KALUEFF et al., 2007), which consists of four basic movements: an elliptical approximation of the arms and hands in relation to the body, followed by an unilateral, then bilateral approaches that ends with body licking. The precise evaluation of this parameter consists of the measurement of each of these stages, as well as in the quantification of neurochemical mediators involved with diverse structures of the central nervous system. In the case of the present study, the specific measures of grooming evaluation were not made due to the way the animals were filmed, with the cameras placed over the apparatus. The grooming time was significantly lower in the GE than it was in the GC. These results may also be associated with anxiety, perhaps because EBN influenced the limbic system. For this project, it will not be possible to confirm this hypothesis, since neither the amygdala

or the hypothalamus were accessed, in terms of the neurotransmitters possibly involved in this question. The hypothalamic-pituitary axis may also be involved in this response (KALUEFF et al., 2016).

The amount of fecal boli, usually related to the fear of the animal facing the apparatus, was lower in the GE. Although fecal boli have traditionally been used to quantify fear and emotionality (Hall, 1934), there are controversies around the discussion of how precise this measurement can be. Nonetheless, in the present study, it may support the hypothesis of EBN be an anxiogenic plant drug. GE spent less time in the center than GC, just as GE animals remained longer at the periphery of the apparatus, in relation to GC. The behavior expected for rodents is that they remain close to the walls of the open field apparatus, presenting what is called thigmotaxis (LAMPREA et al., 2008), which is the tendency of animals to remain close to vertical surfaces. The fact that the animals in the experimental group stayed longer in the periphery and less time in the center of the apparatus is an indicator of anxiety onset (Curzon et al., 2009).n.

The results observed in the light-dark box model were expressed in several parameters. This experiment allows that the test can be performed by placing the animal in the light-dark or in the dark-light direction (CHAULOFF et al., 1997), depending on the aims of the analysis. In the present report, the animals were initially placed in the dark side of the box, so that they would purposely feel more comfortable, being more prepared to trigger the instinctive exploratory process, overcoming the natural aversion to enter the bright side. In theory, the less stressed, anxious, or frightened, or in an unhealthy state the animal is, the shorter the latency to enter the light side. In the present study, the latency to enter the light side was higher to the GE animals, which also showed a higher number of attempts to transit to the light side of the box. Although the exploration instinct remained in the GE animals, observed by the high number of attempts to enter the light side of the box, these animals took longer to go to the light side and remained longer in the dark side because of the influence of the EBN administration. In the case of the administration of anxiolytic drugs (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997) or specific physiological conditions such as recent calving in females (MILLER; PIASECKI; LONSTEIN, 2011), animals tend to remain more in the light side than in the dark, because the physiological state and the drugs inhibit the fear translated by the

aversion to the light side. This particular behavior was not observed in the present study in the animals treated with EBN. Thus, it is possible to infer that EBN administration may have triggered the anxiogenic effects in treated animals (BOURIN; HASCOËT, 2003), as well as a possible sickness behavior (CYTOKINE, 2009), to be confirmed in the upcoming experiments involving the measurement of cytokines linked to inflammatory process. It was observed that GE animals showed significantly fewer light-dark transitions than control animals. Some authors point that light-dark transitions is one of the strongest indicators of anxiety in animals (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997), as well as the latency for the entry in the light side. Our results corroborate these observations, and support the first attempt to evidence the triggering of anxiogenic behavior.

Parameters related to locomotion in each of the light and dark sides were accessed as well. GE animals moved less in both light and dark sides, as well as the rearing frequency was impaired in the light side, when compared to GC. Repetitively, EBN administration altered the horizontal locomotion (exploration) of the animals, particularly evident in the light side. Vertical exploration was impaired in the light side, although no impairment has been observed in the dark side for GE animals.

In the present study, macroscopic and microscopic alterations that occurred in adult male Wistar rats testicles as a consequence of EBN administration was accessed. Testicles have an ellipsoid shape, therefore, its macroscopic analysis is based on the alterations of the three-dimensional shape, being important the parameters related to the measurements of the cranium-caudal axis and of the lateral-lateral axis, so that the testicle volume can be obtained. Absolute and relative weight of testicles were also evaluated.

Plants that are consumed by the population can affect the testicles. Castor beans (*Ricinus communis*) significantly altered sperm count, motility and viability, as well as caused a reduction in the volume of the epididymis (RAJI; OLOYO; MORAKYNIO, 2006). It was observed that the ingestion of the ethanolic extract from the seeds of *Psoralea corylifolia* decreased the weight of the testicles of the experimental group rats in relation to the animals of the control group (TAKIZAWA et al., 2002). In the present study, macroscopical alterations were observed after administration of EBN. There were significant changes in the testicular weight, relative weight and testicular volume parameters, as well as changes in the

measurements of the cranium-caudal and lateral-lateral axes. In all these parameters, the GE presented increase when compared with the GC.

In relation to the microscopic analyses of the testicles, it was observed that the parenchyma (the region where the Sertoli cells are found and the cells related to spermatogenesis) was reduced in the GE animals, whereas both the diameter of the seminiferous tubules and the lumen (the internal region of the seminiferous tubule responsible for the release of the sperm towards the epididymis) were increased. There was a reduced number of Leydig cells in the GE, which may cause a possible decrease in the amount of testosterone produced by the animals that received the treatment with EBN. The administration of the aqueous extract of leaves of *Allamanda cathartica* L., commonly known as *alamanda*, or *dedal-de-dama*, caused histopathological changes in the production and quality of the sperm of mice (SINGH; SINGH, 2008). The *alamanda* is a species belonging to the family Apocynaceae, known to produce peptides (NQYEN et al., 2015), alkaloids and compounds of terpene origin such as plumierid (TIWARI; PANDEY; DUBEY, 2002) and other iridoids (ABDEL-KADER et al. Al., 1997). *Luffa operculata* contains cucurbitacins, which also have terpene origin, as well as there are reports of occurrence of biologically active peptides in *Luffa* species.

Although behavioral alterations and testicular changes occurred in the experimental animals, no significant differences were observed between the weights of the GC and GE animals, as well as in the weights obtained before and after treatment.

The use of *buchinha-do-norte* by men is scarcely studied, except in reports referring to its use in sinusitis, by instillation or by inhalation, both from the tea made with the dried fruits of the plant. The studies made with *Luffa operculata* so far report the identification of cucurbitacins, report in a superficial, qualitative way its influence over motor activity and behavior, as well as report their effects on the reproduction of rats, however, without mentioning its effects on the male reproductive system. The present study introduces results that can be supportive to the rationalization of the use of this medicinal plant, providing quantitative evidence related to the effects of *buchinha-do-norte* over the male rat behavior, as well as prove the deleterious alterations caused to the reproductive system of Wistar rats.

## Bibliography

- BERGAMINI, M.R.; et al. Stress and its role in the dentin hypersensitivity in rats. *Archives of Oral Biology*, v.73, n.1, 2017, p.151-160
- Berquó L.S. et al. Use of drugs to treat respiratory tract infections in the community. **Rev. Saúde Pública**; 38(3):358-64, 2004.
- BINDRA, D., & THOMPSON, W. R. An evaluation of defecation and urination as measures of fearfulness. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 46:43-45, 1953.
- BISOGNIN, D. A. ORIGIN AND EVOLUTION OF CULTIVATED CUCURBITS. **Ciência Rural**, 32(5):715-723, 2002.
- BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics: application of biometrical genetics to the inheritance of behavior. In: EYSENCK, H. J. (Ed.). *Experiments in personality*. v. 1. London: Routledge & Kegan Paul, p.251-256, 1960.
- CHAN, Kung-Chi; YIN, Mei-Chin; CHAO, Wan-Ju. **Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats**. *Food and Chem. Toxicol.*,45(3):502-507, 2007.
- CHAOULOFF F.; DURAND M.; MORMÈDE P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behav Brain Res.**, 85(1):27-35, 1997.
- CLARKE, J. H. R.; RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, 19(1/2):41, 2007.
- CRAWLEY, J.N., GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 13:167– 170, 1980.
- D'CRUZ, S.C., et al. Effects of plants and plant products on the testis. **Asian J Androl.** 12(4): 468–479, 2010.
- DANTZER R. Cytokine, Sickness behavior, and Depression. **Immunol. Allergy Clin North Am.**, 29(2): 247-264, 2009.
- DIAZ, G. A. G. **Aspectos técnicos sobre el cultivo del paste** (*Luffa cylindrica*). Costa Rica: Ministério da Agricultura y ganadeira, 1997, p. 38.
- DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**, p.224, 2000.
- ESPEJO, E. F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. **Behav. Brain Res.**, 87: 233-238, 1997.

- ESTORK, D.M.; et al. Casinga-cheirosa organic extract impairment over Balb-c male mice behavioral phenotype. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 26(2): 216-24, 2016.
- ESTORK, D.M.; et al. First chemical and toxicological evaluation of Casinga-cheirosa in Balb-c male mice. **Molecules.**, 19(4): 3973-87, 2014.
- GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, 3(2): supl. 1, 1989.
- GUSMÃO, D. F.; Estork et al. Influence of the intraperitoneal administration of antitumor *Abarema auriculata* extract on mice behavior. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 23(6): 903-912, 2013.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. 1. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.**, 18: 382-403, 1934.
- MENGUE, S.S. MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Faculdade de Medicina da UFRGS. Porto Alegre. **Rev. Saúde Pública.**, 35(5): 415-420, 2001.
- MENGUE, S.S. MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 11(1): 21-35, 2001.
- MENON-MIYAKE MA, et al. *Luffa operculata* affects mucociliary function of the isolated frog palate. **Am. J. Rhinol.**, 19(4): 353-357, 2005.
- MENON-MIYAKE, M. A. et al. *Luffa operculata* effects on the epithelium of frog palate: histological features. Brazil. **J. Otorhinolaryngol.**, 71(2):132-8, 2005.
- MILLER SM, PIASECKI CC, LONSTEIN JS. Use of the light-dark box to compare the anxiety-related behavior of virgin and postpartum female rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 100(1): 130-137, 2011.
- PARE, W.P. Relationship of various behaviors in the open-field test of emotionality. **Psychol. Rep.**, 14:19-22, 1964.
- PASQUALOTTO F.F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, 29(2): 103-112, 2007
- PIMPLE, B. P.; KADAM, P. V.; PATIL, M. J. Protective effect of *Luffa acutangula* extracts on gastric ulceration in NIDDM rats: role of gastric mucosal glycoproteins and antioxidants. **Asian Pacific J. Trop. Med.**, 5(8):, 610-5, 2012.
- PITREZ P.M.C. Acute upper respiratory tract infections: outpatient diagnosis and treatment. **J. Pediatr.**, 79(Supl.1): 77-S86, 2003.

- RAJI Y, OLOYO AK, MORAKINYO AO. Effect of methanol extract of *Ricinus communis* seed on reproduction of male rats. **Asian J Androl.**, 8(1): 115-21, 2006.
- RASBAND, W., ImageJ documentation. Disponível em: [www.rsb.info.nih.gov](http://www.rsb.info.nih.gov), acesso em 12/05/2017.
- REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia Amazônica**. Vol 1. INPA/SEBRAE: Manaus. p. 391, 2002.
- Shimada, T., Matsumoto, K., Osanai, M., Matsuda, H., Terasawa, K., Watanabi, H. The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. *Gen. Pharmacol.*, v.26, n.1, p.205-210, 1995.
- TAKIZAWA T, et al. Gonadal toxicity of an ethanol extract of *Psoralea corylifolia* in a rat 90-day repeated dose study. **J. Toxicol Sci.**, 27(2): 97-105, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova.** 28(3): 519-528, 2005.