



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

CINTHIA DOS SANTOS ALVES

ADMINISTRAÇÃO DE *Luffa operculata* EM RATOS WISTAR
ADULTOS E JOVENS ADULTOS E EM RATAS ADULTAS PÓS
REPRODUÇÃO

São Paulo
2020

CINTHIA DOS SANTOS ALVES

**ADMINISTRAÇÃO DE *Luffa operculata* EM RATOS WISTAR
ADULTOS E JOVENS ADULTOS E EM RATAS ADULTAS PÓS
REPRODUÇÃO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivana B. Suffredini.

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Cinthia dos Santos Alves.

Administração de *Luffa operculata* em ratos Wistar adultos e jovens e em ratas adultas pós reprodução / Cinthia dos Santos Alves Rocha. - 2020.

106 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini

1. Buchinha-do-norte. 2. Testículos. 3. Citocinas inflamatórias. 4. Comportamento. 5. Hormônios. I. Suffredini, Ivana Barbosa. (orientadora). II. Título.

CINTHIA DOS SANTOS ALVES

**ADMINISTRAÇÃO DE *Luffa operculata* EM RATOS WISTAR
ADULTOS E JOVENS ADULTOS E EM RATAS ADULTAS PÓS
REPRODUÇÃO**

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

São Paulo, 02 de Junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini - Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr. Humberto Vieira Frias - Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi - Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Elfriede Marianne Bacchi – Universidade de São Paulo – USP

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Teodorov – Universidade Federal do ABC

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho a Jesus,
que me deu forças, estímulo e coragem
para buscar todos os conhecimentos
necessários para este estudo.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que ilumina e guia meus caminhos, que me deu paciência nas quedas, que me deu força na dor, e que me deu esperança.

Agradeço ao meu esposo, Itamar, pelo amor, companheirismo e por ter me concedido dois maravilhosos filhos. Impossível eu ter trilhado este caminho sem sua incondicional paciência, carinho e compreensão.

Agradeço aos meus filhos, Eduardo e Daniela por tanta ternura e por entender cada ausência minha necessária.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini, que me orientou de maneira acolhedora em todos os momentos, pelo enorme carinho, respeito e amor que ambas sentimos. Tenho uma enorme gratidão por você.

Agradeço ao Prof. Dr. Humberto Vieira Frias, meu grande amigo, pela enorme ajuda e companheirismo durante esses anos. Não teria conseguido sem você.

Agradeço à Prof^a Dr^a Maria Martha Bernardi por compartilhar conosco toda sua sabedoria.

Agradeço a todos os professores com os quais realizei os créditos, pela alta qualidade de informação transmitida.

Agradeço à Prof^a Dr^a Cidéli Coelho, que colaborou diretamente com nossos experimentos e compartilhou conosco suas habilidades.

Agradeço ao Wilton Pereira dos Santos e ao Anderson A. da Silva, que dividiram conosco seus conhecimentos e me deram suporte a todo o momento no biotério. Vocês são incríveis.

Agradeço ao Sr. Oswaldo e Sra. Leandra que sempre abriram as portas do biotério com um sorriso no rosto. Vocês são um encanto.

Agradeço a Universidade Paulista por confiar em meu trabalho e ter me concedido Bolsa de Estudo.

RESUMO

Luffa operculata, popularmente conhecida como buchinha-do-norte, é uma planta usada no combate à sinusite e também para interromper a gravidez. A influência da administração de 1,0mg/kg do extrato aquoso de buchinha-do-norte (EBN) em ratas prenhes (GD17 a GD21) foi analisada, bem como em machos da geração F1, comparados a machos F0. Foi realizada uma avaliação comportamental das fêmeas da geração F0 e dos machos da geração F1 em aparelho de campo aberto e em caixa claro-escuro. Nos machos F1 foram analisadas alterações dos índices de corticosterona, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), melatonina e testosterona séricas, análise das citocinas Il-1 α , Il-1 β , Il-6 e TNF- α , e análise macroscópica e microscópica dos testículos. Os machos F1 (grupos controle e tratado CGF1 e EGF1) tiveram seus parâmetros comparados aos parâmetros dos machos F0 (grupos controle e tratado CGF0 e EGF0). As ratas da geração F0 tratadas com EBN apresentaram diminuição em parâmetros comportamentais na caixa claro-escuro, com aumento de peso das fêmeas e dos machos da geração F1 dos grupos tratados. Os machos F1 não apresentaram alterações comportamentais significativas em relação aos machos F0. Os testículos de F1 não apresentaram alterações macroscópicas significativas, porém as alterações microscópicas foram mais significativas para os machos F0 tratados do que para os F1. Para os F1, as células de Leydig apresentaram-se em menor número nos machos EGF1. O número de células de Leydig diminuídas não influenciou na quantidade de testosterona produzida por machos F1, em relação aos machos F0. As citocinas IL-1 α e IL-6 apresentaram-se aumentadas em CGF0, corticosterona, diminuída em CGF0, ACTH diminuído em EGF1 e melatonina aumentada em EGF1. A administração direta de EBN em ratas prenhes influenciou o comportamento e o peso de fêmeas F0 e de machos F1. Nos machos F1, em relação aos F0, não foram observadas diferenças comportamentais, hormonais, inflamatórias ou morfo-histológicas significativas nos machos F1 que receberam EBN por via transgeracional. A administração transgeracional de EBN mostrou-se menos prejudicial sobre os parâmetros observados nos ratos da geração F1 do que sobre os mesmos parâmetros observados nos ratos da geração F0, que receberam EBN por gavagem. Conclui-se, portanto, que a administração direta de EBN causa alterações comportamentais e fisiológicas, tanto em machos quanto nas fêmeas.

Palavras-chave: buchinha-do-norte; testículos; citocinas inflamatórias; comportamento, hormônios.

ABSTRACT

Luffa operculata (popularly known as buchinha-do-norte) is a plant used to fight sinusitis and also to terminate pregnancy. The influence of the administration of 1.0 mg/kg of aqueous extract of buchinha-do-norte (EBN) in pregnant rats (GD17 to GD21) was analyzed, as well as in males of the F1 generation, compared to F0 males. A behavioral evaluation of the females of the F0 generation and of the males of the F1 generation was carried out in an open field device and in a light-dark box. In F1 males, changes in the levels of corticosterone, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), melatonin and serum testosterone were analyzed, as well as the analysis of cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and macroscopic and microscopic analysis of the testicles. F1 males (CGF1 and EGF1 control and treated groups) had their parameters compared to F0 males (CGF0 and EGF0 control and treated groups). The F0 generation rats treated with EBN showed a decrease in behavioral parameters in the light-dark box, with an increase in the weight of the F1 generation males and females in the treated groups. F1 males did not show significant behavioral changes in relation to F0 males. F1 testicles did not show significant macroscopic changes, but microscopic changes were more significant for F0 treated males than for F1 males. For F1, Leydig cells were less frequent in EGF1 males. The number of Leydig cells decreased did not influence the amount of testosterone produced by F1 males, compared to F0 males. The cytokines IL-1 α and IL-6 were increased in CGF0, corticosterone, decreased in CGF0, ACTH decreased in EGF1 and melatonin increased in EGF1. The direct administration of EBN in pregnant rats influenced the behavior and weight of F0 females and F1 males. In F1 males, in relation to F0, there were no significant behavioral, hormonal, inflammatory or morpho-histological differences in F1 males who received EBN vertically.

Keyword;: *buchinha do norte*; testicles; hormones; inflammatory cytokines; behavior.

ABREVIATURAS

ACTH – Adrenocorticotrofina

CA – Campo aberto

CCE - Caixa claro-escuro

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

CRH - Corticotrofina

EBN - Extrato aquoso de buchinha-do-norte

F0 – Geração parental

F1 – Geração filial

FSH - Hormônios folículo-estimulante

GC – Grupo controle

GD – Idade gestacional

GE – Grupo Experimental

HE - Hematoxilina-eosina

HHA - Hipotálamo-hipófise-adrenal

IL - Interleucinas

IVAS - Infecções das vias aéreas superiores

LH - Hormônio luteinizante

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAS - Ácido periódico de Schiff

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RS – Rinossinusite

SUS - Sistema Único de saúde

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características dos seios nasais de indivíduos saudáveis ou em indivíduos diagnosticados com sinusite.

Figura 2 – Fruto seco de *Luffa operculata*

Figura 3 - Representação do esqueleto cucurbitano, comumente encontrado em compostos que ocorrem em espécies de Cucurbitaceae

Figura 4 - 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.

Figura 05. Etapas da Espermiogênese em rato.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Sinusite	15
1.2 Luffa operculata (L.) Cogn.	16
1.2.1 Plantas medicinais na história. Breve relato.	16
1.3 Toxicidade de plantas e métodos de avaliação	21
1.3.1 Aparelho de campo aberto	22
1.3.2 Caixa claro-escuro	24
1.3.3 Sistema reprodutor masculino e toxicidade reprodutiva	25
1.3.4 Citocinas inflamatórias	29
1.3.5 Hormônios relacionados ao estresse.	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos gerais	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.1 ARTIGO I: A sub-abortive dose of <i>Luffa operculata</i> at a late period of gestation impaired mother behavior and favored weight gain.	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.2 ARTIGO II: Influência da administração de <i>Luffa operculata</i> sobre o comportamento e o dano testicular em ratos Wistar jovens adultos comparados a ratos adultos	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	35
APÊNDICES	41
Apendice I. Certificado CEUA	41

1. INTRODUÇÃO GERAL

Luffa operculata (L.) Cogn., popularmente conhecida como buchinha-do-norte, é uma espécie vegetal que apresenta uso popular no tratamento de algumas condições patológicas relacionadas às vias aéreas superiores, como, por exemplo, a rinossinusite (RS) (SILVA, L. et al., 2018). Por conta de um dos efeitos colaterais que o consumo do chá dos frutos desta espécie apresenta, que é a eventualidade de um aborto, a planta acaba sendo consumida de forma irregular também para este fim.

L. operculata é uma planta nativa das Américas Central e do Sul, encontrada em áreas do Equador, Brasil, Colômbia e Guatemala, onde é cultivada em escala comercial. No Brasil, cresce em algumas áreas do Norte e Nordeste e nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo (BALDISSERA, 2014).

Conforme Oliveira et al., (2011) afirmam, vários acidentes podem ocorrer em função do desconhecimento dos compostos químicos presentes em certas plantas disponíveis em diversos ambientes. Crianças de até 3 anos, por exemplo, costumam se acidentar com plantas ornamentais dentro de casa. Crianças maiores acidentam-se com plantas em parques, pátios e jardins, e jovens e adultos tendem a apresentar intoxicação acidental, geralmente alérgica, pelo contato, ou até mesmo pelo uso intencional, como por exemplo a buchinha-do-norte. Por conta das características da toxicidade causada pela ingestão da buchinha-do-norte sobre a gestação, estudos foram feitos de modo a verificar os efeitos sobre a gestação de camundongos fêmeas e as atividades teratogênicas e estrogênicas do chá de buchinha-do-norte (BARILLI et al., 2007).

BARILLI et al. (2007) prepararam um chá em uma dose correspondente àquela utilizada pela população, de 1 buchinha para 1 copo de água. Os autores prepararam o chá com base na informação popular, mas obtiveram a massa de extrato seco a partir do chá liofilizado e utilizaram essa massa para determinar a dose de 4 mg/kg, adotada para o estudo. Deste modo, o chá foi administrado a um grupo de fêmeas entre os dias 1 e 3 da gestação; a outro entre os dias 4 e 6; e a outro entre os dias 7 e 9. As fêmeas foram submetidas à eutanásia no 18º dia de gestação e seus fetos foram avaliados, bem como seus pesos medidos.

Os autores verificaram que houve uma redução na taxa de nascimento no grupo que recebeu o chá entre os dias 4 e 6 de gestação. Os fetos apresentaram desenvolvimento ósseo retardado devido à ausência de ossificação da placa supraoccipital e atraso na ossificação da placa interparietal, metacarpos, metatarso, estérnebra e vértebras sacrais e caudais, embora as medidas dos órgãos e membros não tenham sido reportadas pelos autores. Neste mesmo grupo, teve uma redução do peso gestacional das fêmeas F0, devido à reabsorção evidenciada no grupo tratado. Os autores fizeram, ainda, análise da variação de peso nas fêmeas durante o período gestacional, mas não foi possível verificar se houve diferenças por conta de um erro no delineamento experimental apresentado no trabalho. No grupo que recebeu o chá entre os dias 7 e 9 da gestação, período em que a organogênese começa, foi evidenciado um feto muito pequeno, com 433 mg, apresentando agnatia e exoftalmia. Dois fetos apresentavam fenda palatina e um feto apresentava exencefalia, mas tais malformações também foram encontradas no grupo controle, embora sem que as medidas tenham sido novamente reportadas pelos autores.

O número de estudos que abordam os efeitos farmacológicos da buchinha-do-norte é escasso, e os trabalhos são geralmente restritos à avaliação de seus efeitos sobre a sinusite (SILVA et al., 2016; WEISER, GEGENHEIMER, KLEIN, 1999), ou ligados à avaliação da capacidade antibacteriana sobre os microrganismos relacionados a doenças das vias aéreas superiores, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (SCALIA et al., 2015), ou ainda relacionados à toxicidade ao epitélio das vias aéreas superiores (MENON-MIYAKE et al., 2005a) e ao corpos ciliares da mucosa desta mesma área (MENON-MIYAKE et al., 2005b). Existem trabalhos que reportam estudos com medicamentos homeopáticos feitos com a buchinha para serem usados em sinusites (ADLER, 1999), sendo um deles um estudo clínico randomizado duplo-cego (WIESENAUER et al., 1989). Estudos preliminares relativos à toxicidade de buchinha-do-norte foram feitos anteriormente (CHAMPNEY, FERGUSON, FERGUSON, 1974), porém, em relação aos efeitos da administração da buchinha a homens, que eventualmente consomem a planta em tratamento contra sinusite, as informações são ainda mais escassas.

Em um estudo recente (ALVES et al., 2018), verificou-se que a administração por via oral de 1 mg/kg do extrato aquoso da buchinha-do-norte (EBN) em ratos Wistar adultos causou uma lesão testicular significativa, especificamente no diâmetro dos túbulos seminíferos, com alterações diretas no tamanho da luz, que aumentou, e na espessura do parênquima, que diminuiu. Também houve diminuição das células de Leydig. Esses achados suscitaram a questão da influência da administração do extrato de buchinha-do-norte, por via transgeracional, sobre os fetos machos.

Diante do exposto, o presente estudo visa à verificação da influência da administração transgeracional de buchinha-do-norte sobre a morfologia testicular de ratos da geração F1 e se há alterações na quantidade de citocinas inflamatórias e de testosterona sérica tanto nos ratos da geração F1 quanto nos ratos da geração F0. O presente trabalho também reporta a influência da administração de buchinha-do-norte sobre o comportamento das ratas da geração F0 após o período de gestação e desmame.

1.1 Sinusite

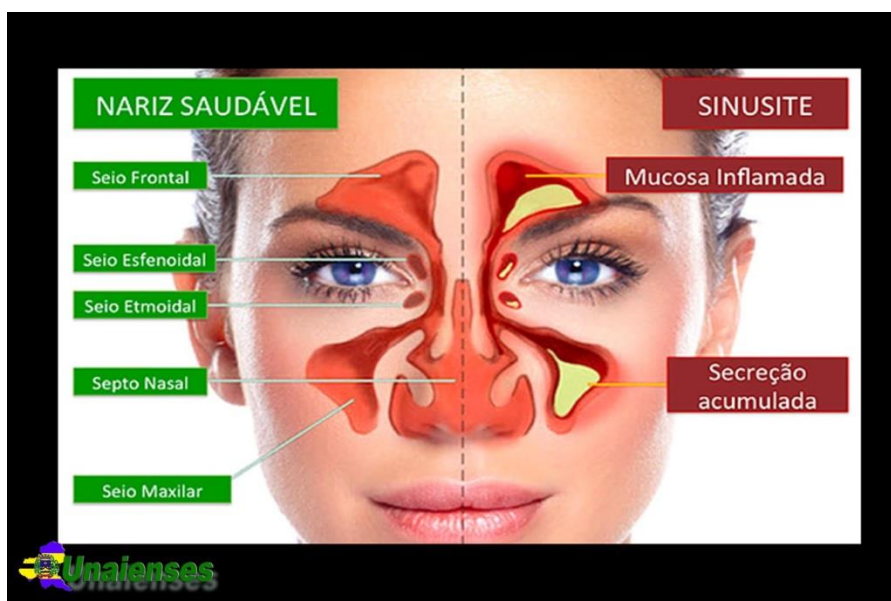
As infecções das vias aéreas superiores (IVAS) são causadas por algum tipo de micro-organismo, particularmente os cocos Gram positivos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*. As IVAS são um dos principais problemas de saúde que atingem a população, particularmente no inverno, sendo considerados grupos de risco crianças, idosos e imunossuprimidos (BARROSO; LEITE; PAIVA, 2019). Entre as IVAS, a sinusite é encontrada em alta frequência na população.

A sinusite é definida como uma inflamação sintomática dos seios paranasais e cavidade nasal (HSU; SHENG; HO, 2018), caracterizada por dois ou mais sintomas, como congestão ou corrimento nasal, dor ou sensação de pressão e redução ou perda do olfato (HOFFMANS et al., 2018). Os sintomas mais comuns que acometem os pacientes são: cefaleia, dor espontânea na maçã do rosto, na raiz do nariz ou na arcada superciliar, acompanhada de secreção amarelada ou esverdeada (MAGALHÃES et al., 2019).

Estudos recentes mostram a atuação das folhas da planta *Diphasia klaineana* Pierre (Rutaceae) para o tratamento da sinusite contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (KONE et al., 2018). Embora a frequência de sinusite causada por *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* seja alta, outras bactérias podem estar presentes, como *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium nucleatum* (BROOK, 2006).

Na figura abaixo (Figura 1), estão representados os seios nasais saudáveis e não saudáveis, como observados nos indivíduos com um quadro de sinusite.

Figura 1. Características dos seios nasais de indivíduos saudáveis ou em indivíduos diagnosticados com sinusite.



Fonte: Google imagens. <https://saudeemalta.net.br/wp-content/uploads/2016/10/o-que-e-sinusite.png>, acesso em 06/01/2020.

1.2 *Luffa operculata* (L.) Cogn.

1.2.1 Plantas medicinais na história, um breve relato.

A utilização de plantas como medicamento é muito antiga e data dos primórdios da civilização. Na China, por exemplo, há registros de cultivo de plantas medicinais desde 3.000 a.C.; os assírios e hebreus também as cultivavam em 2.300 a.C. e produziam vermífugos, purgantes, cosméticos, diuréticos e produtos para embalsamar, entre outros. Esses registros históricos relativos à utilização de plantas para tratamento de doenças são descritos no manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a.C.), que apresenta cerca de 800 prescrições e 700 drogas, e que contém os nomes, as doses e as indicações sobre o uso das plantas para o tratamento de doenças. Hipócrates (460-377 a.C.), o “Pai da Medicina”, escreveu sobre doenças e os remédios feitos com plantas para combatê-las (NOLLA; SEVERO; MIGOTT, 2005).

Os primeiros europeus, ao chegaram no Brasil, perceberam como os povos indígenas utilizavam algumas plantas com finalidade medicinal. Com o passar do tempo, o conhecimento sobre a flora local acabou se aprofundando a partir do interesse da Coroa Portuguesa em identificar as plantas e animais úteis. Nos séculos que se seguiram à descoberta do Brasil, outros povos foram trazidos, como os africanos, que embora estivessem sob a condição inumana de escravos, introduziram espécies vegetais ornamentais e medicinais oriundas da África. O conhecimento sobre o poder curativo de algumas plantas é uma das diversas formas de relação entre homens e plantas, e as práticas relacionadas ao uso tradicional de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa para a manutenção da saúde ou o tratamento de doenças, e cada dia mais vem crescendo seu uso medicinal. (AMOROZO, 2002).

O uso de cerca de 2.000 plantas medicinais pelos indígenas da Amazônia colombiana foi relatado pelo botânico norte-americano Richard Schultes em 1988. Em seu longo relato, constam espécies utilizadas para diversos fins, como aquelas com efeitos antifúngicos, como os relacionados à espécie *Virola calophylla*, conhecida popularmente como paricá. *Paullinia cupana* Kunth é uma espécie conhecida popularmente como guaraná, que pertence à família Sapindaceae; é muito utilizada como estimulante. *Banisteriopsis caapi*, espécie conhecida como jagube, é utilizada em rituais religiosos (SCHULTES, 1988).

A utilização de plantas medicinais se deu conforme foram surgindo as necessidades básicas do homem primitivo, que dependia da natureza para sua

sobrevivência e passou a utilizar plantas medicinais para se curar (ALMEIDA, 2011).

Conforme as diretrizes traçadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o Ministério da Saúde (Brasil, 2006) adapta sua política para que a população consiga ter acesso mais seguro às plantas medicinais e aos fitoterápicos. Em 2006, com este propósito, foi implantada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), ambas com a finalidade de promover o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. A PNPMF apresenta diretrizes que regulamentam desde o cultivo das plantas medicinais até a produção e comercialização dos fitoterápicos por indústrias farmacêuticas nacionais. Estudos relacionados à toxicidade são, portanto, fundamentais para regular o uso racional de fitoterápicos e plantas medicinais.

1.2.3 *Luffa operculata* no tratamento da rinossinusite

Luffa operculata, popularmente conhecida no Brasil como buchinha-do-norte, é muito utilizada para o tratamento da sinusite, porém apresenta efeito colateral abortivo, e frequentemente encontram-se relatos populares de consumo para esse fim (BALDISSERA, 2014). Pertence à família das Cucurbitaceae e é conhecida também como cabacinha, buchinha, bucha-dos-paulistas, purga-de-João-Pais, entre outros (SILVA et al., 2018). Espécies de *Luffa* apresentam atividade analgésica, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antidepressiva, ansiolítica, antiepiléptica e anti-úlceras (MODI; KUMAR, 2014 e KAO; HUANG; CHEN, 2012, sendo útil no tratamento da rinossinusite alérgica (SILVA et al., 2018).

L. operculata é uma planta de origem da América Tropical, cujo cultivo é comum no Nordeste e Norte do Brasil (SILVA et al., 2018). Seu fruto é ovóide-oblongo, com aspecto amarronzado quando seco; seu interior é esponjoso, formado por um tecido reticulado, às vezes utilizado como “esponja vegetal”.

Figura 2. Fruto seco de *Luffa operculata* (A); espécie vegetal (B).



Fonte: Cinthia dos S. A. Rocha

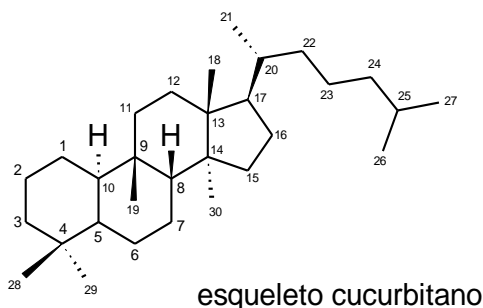
Fonte: Site: Neotropical plants

O fruto maduro da buchinha é conhecido na medicina popular pelo seu efeito purgativo. Quando secos, os frutos são indicados em casos de rinite e sinusite, e devem ser administrados por inalação ou solução nasal em gotas. Segundo MENGUE et al. (2001), a utilização dos frutos secos, em casos de sinusite, pode causar graves irritações e hemorragias nasais. Alguns tipos de intoxicação registrados estão relacionados, de modo geral, com tentativa de aborto. Em dez casos registrados junto ao CIT/SC, que ocorreram em mulheres entre 19 e 26 anos de idade após a ingestão de quantidade variável do chá preparado com o fruto seco, houve aborto (MENGUE et al., 2001). Ainda não há registros sobre os compostos responsáveis pela ação hemorrágica, nem tampouco se sabe o mecanismo de ação.

Em espécies de Cucurbitaceae podem ser encontrados esteroides, alcanos de cadeia longa (AHMED et al., 2018), carotenoides (licopeno e β -caroteno) (Frias et al., submetido J. Ethnopharmacol.), proteínas, triterpenos, fitoesteróis, lignanas, compostos fenólicos, ácidos graxos poli-insaturados e minerais (DARRUDI et al., 2017), polissacarídeos (RAISH et al., 2018), saponinas (SHI et al., 2018) e peptídeos cíclicos (ciclotídeos) (ZHANG et al., 2018). Os polissacarídeos apresentam propriedades biológicas antifúngica, anti-inflamatória, hipoglicêmica, antioxidante, cardioprotetora e imunoestimulante, e

são potentes agentes anti-úlceras gástricas (RAISH et al., 2018). O grupo de compostos que mais se destaca entre as Cucurbitaceae são as cucurbitacinas, cuja estrutura básica encontra-se representada na figura 3.

Figura 3. Representação do esqueleto cucurbitano, comumente encontrado em compostos que ocorrem em espécies de Cucurbitaceae.



Fonte: Ivana Barbosa Suffredini

Cucurbitaceae é uma família de trepadeiras com gavinhas laterais ramificadas ou simples, flores unissexuais esbranquiçadas ou amarelas, com sementes relativamente grandes e numerosas, ovário inferior com placentação parietal (HALLA et al., 2018), contemplando 130 gêneros (KOCYAN et al., 2007) e 1.100 espécies (MOYA-HERNÁNDEZ et al., 2018), sendo que 50% são monoicas e 50% são dioicas (HALLA et al., 2018).

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, e são 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; AMARO., 2010).

1.3 Toxicidade de plantas e métodos de avaliação

Plantas de uso medicinal podem se mostrar tóxicas, a depender de fatores inerentes ao vegetal, como a correta identificação da espécie vegetal, o órgão vegetal a ser utilizado, os processos de secagem, moagem, conservação, preparo, e de fatores relacionados ao indivíduo que os consomem, como a sensibilidade, a capacidade metabólica, estados especiais como gravidez e lactação, idade, sexo, ou consumo de outros medicamentos. Pode depender ainda de fatores relacionados à planta como medicamento fitoterápico, como a dose, a via de administração, a formulação e sua apresentação, tempo de validade, entre outros. Segundo a legislação, um fitoterápico deve ser fabricado segundo normas estabelecidas de controle de qualidade, o que o torna mais seguro de ser utilizado, se comparar ao consumo deliberado de plantas medicinais (RDC 10, de 09/03/2010; RDC 26, de 13/05/2014). Por esse motivo, é fundamental que o grau de intoxicação que uma planta medicinal possa apresentar seja estudado.

A avaliação de toxicidade de compostos químicos desconhecidos é tradicionalmente realizada em modelos que utilizam animais de laboratório, em geral roedores, por serem mamíferos e por apresentarem seus sistemas fisiologicamente mais próximos aos sistemas humanos. Embora por várias décadas a utilização sistemática de animais de laboratório tenha sido uma realidade, essas práticas têm mudado, recentemente, em função dos códigos de ética que se aprimoraram, visando ao bem-estar animal. Hoje, a determinação do grau de toxicidade, e mesmo a avaliação de toxicidade em animais, tem sido banida para algumas categorias de produtos, como os cosméticos, por exemplo (Lei Estadual n. 289/2015), sendo substituída por outros modelos experimentais *in vitro* (OECD guideline 476).

Com a adoção da filosofia dos 3Rs, o uso de animal em experimentos científicos pode ser feito mediante o compromisso e responsabilidade do pesquisador em delinear seu experimento de modo a primeiramente se certificar

de que (1) não é possível trocar o experimento *in vivo* por um modelo *in vitro*; (2) foi possível reduzir o número de animais; e (3) as técnicas adotadas foram cuidadosamente refinadas, de modo a se tornarem menos invasivas e realizadas por pessoal experiente.

Deste modo, no presente projeto, a avaliação da toxicidade foi conduzida em termos de avaliação de alterações comportamentais e locomotoras de animais que receberam tratamento com buchinha-do-norte. As alterações comportamentais foram realizadas com o auxílio de aparelhos clássicos empregados para essa finalidade, como o aparelho de campo aberto (CA) e caixa claro-escuro (CCE). O primeiro é ideal para avaliação da capacidade locomotora/exploratória perdida ou adquirida a partir da administração do fármaco e para a avaliação dos primeiros sintomas de depressão/estímulo, capacidade ansiolítica/ansiolítica. Já o segundo modelo oferece a possibilidade de se refinar as observações da capacidade ansiolítica ou ansiolítica do fármaco.

A ansiedade é retratada como um mecanismo defensivo do organismo em resposta à novidade. Geralmente é caracterizado por emoções negativas e sentimento de apreensão (WALIA; GARG; GARG, 2018). A ansiedade se distingue do medo por ser um estado de apreensão elevado, enquanto o medo é dirigido a uma ameaça específica (CARTER et al., 2013). Quando animais são expostos a estímulos ansiogênicos, são observados os impactos desses estímulos em seu comportamento. O comportamento exploratório e a atividade locomotora podem ser avaliados no teste do campo aberto (CA) (WALIA; GARG; GARG, 2018) ou na caixa claro-escuro (CCE).

1.3.1 Aparelho de campo aberto

O CA foi desenvolvido por Hall e Ballachey, em 1932, para analisar o comportamento espontâneo de roedores com o objetivo de avaliar a resposta comportamental do animal frente a uma aversão natural a lugares iluminados e abertos que se contrapõe ao comportamento exploratório. O teste de campo aberto é baseado no paradoxo entre o conflito causado por estímulos aversivos e os estímulos exploratórios (EILAM, 2003). O aparato consiste em uma arena circular (NASCIMENTO et al., 2017) e de iluminação artificial. Cada animal é colocado individualmente no centro da arena com iluminação intensa. No

aparelho, são mensurados os parâmetros frequência de locomoção (definida como o número de quadrantes cruzados pelo animal com as quatro patas); imobilidade (tempo total em segundos sem movimentos espontâneos, quando a cabeça, o tronco e os membros estavam imóveis); frequência de se levantar (unidade do ato de levantar que corresponde a um posicionamento das patas traseiras apoiadas no solo, com o tronco perpendicular ao chão, cabeça inclinada e membros dianteiros no ar, tocando ou não as paredes da arena); duração do *grooming* (o tempo total de movimentos de limpeza da cabeça, lambendo as patas, pele, cauda ou genitália); número de cíbalas fecais no final da sessão (GUSMÃO et al., 2013); número de transições dos quadrantes periféricos para o círculo central da arena; tempo gasto no centro da arena; tempo gasto na periferia (GARCIA et al., 2017). Esses parâmetros foram avaliados durante 3 minutos. A arena é limpa com uma solução alcoólica 5% antes de colocar os animais, para eliminar quaisquer odores deixados pelos animais anteriores (ESTORK et al., 2016). A simplicidade das configurações do teste e da quantificação fácil e rápida de diferentes parâmetros comportamentais e locomotores, como quantidade de locomoção e de imobilidade, exploração espacial, medo, curiosidade, diferentes tipos de neofobia (PERALS et al., 2017), ousadia e sociabilidade (CARTER et al., 2013), tornou o campo aberto popular para medir parâmetros comportamentais em animais. A aversão à novidade apresentada pelos animais, ao serem expostos ao CA, é conhecida como neofobia (CARTER et al., 2013). Na natureza, a neofobia faz com que o animal evite novos predadores. O estudo da neofobia quantifica o medo, ansiedade, curiosidade e memória, e ainda é comumente utilizado na psicofarmacologia e neurobiologia para avaliação de fármacos e mapeamento de neurocircuitos (GREGGOR; THORNTON; CLAYTON, 2015). No teste, um animal (geralmente um roedor) é introduzido em uma arena clara e iluminada e observado por períodos de minutos a horas, em nosso estudo, ele foi observado por 3 minutos (EILAM, 2003), a fim de se observar o comportamento animal frente à novidade ao ambiente não familiar. Ratos tendem a andar próximos à parede da arena do CA, um comportamento chamado de tigmotaxia. A redução da atividade no centro da arena indica efeito ansiogênico (KUNIISHI et al.,).

1.3.2 Caixa claro-escuro

O teste da caixa claro-escuro (CCE) foi popularmente descrito por Crawley e Goodwin, em 1980 (BOURIN; HASCOE, 2003), baseia-se no paradoxo existente entre a aversão inata dos roedores a ambientes abertos e iluminados e sobre o comportamento exploratório espontâneo induzido pela novidade. Esse teste costuma ser rápido e fácil de ser realizado, é um dos mais utilizados para avaliação do fenótipo comportamental (KULESSKAYA; VOIKAR, 2014).

A caixa é dividida em dois compartimentos chamados de escuro e claro, que apresentam, respectivamente, 1/3 e 2/3 do tamanho total, que é de 46 x 27 x 30 cm (comprimento x largura x altura). A área considerada segura é a escura e a área aversiva é o compartimento maior e iluminado. O equipamento foi desenvolvido de forma a permitir a mensuração de parâmetros de locomoção, tempo gasto no lado claro ou escuro (HASCOËT; BOURIN, 2009) e número de transições entre as regiões do compartimento (atividade locomotora) (SHIMADA et al., 1995), *grooming* e frequência de levantar (BOURIN; HASCOE, 2003). O tempo de latência para a primeira passagem do compartimento de luz para o escuro tem sido usado por alguns autores. Nesse caso, uma diminuição no tempo de latência pode ser o resultado de comportamento desinibitório e diminuição da atividade ansiolítica, a qual os animais passam mais tempo explorando a área clara. Outra explicação é a influência da sedação, sob a qual os animais são incapazes de se mover rapidamente para o compartimento escuro. A medida encontrada mais consistente e útil para avaliar a ação do tipo ansiolítico é o tempo que os ratos passam pela área iluminada, uma vez que esse parâmetro fornece os resultados de dose-efeito mais consistentes com drogas (HASCOËT; BOURIN, 2009). O teste claro-escuro baseia-se na observação de que, embora os roedores possuam hábitos noturnos, como os ratos e tendem a permanecerem mais tempo no lado escuro, o instinto de explorar um novo ambiente vai ocorrer, incentivando o animal a explorar as regiões claras do equipamento, mesmo que estas apresentem propriedades aversivas que inibiriam, a princípio, seu o comportamento exploratório. A abertura entre os dois compartimentos não é maior que 7 cm (BOURIN; HASCOE, 2003). Cada animal é colocado gentilmente no lado escuro (CRAWLEY; GOODWIN, 1980) ou no lado claro da câmara, onde o animal se

movimenta, geralmente, na periferia da câmara, até encontrar a abertura (acesso) para o lado claro do compartimento, e normalmente ocorre entre 7 e 12 segundos. A entrada em uma câmara é definida como a colocação de todas as quatro patas do animal, na câmara (BOURIN; HASCOE, 2003). No presente trabalho, os animais foram colocados no lado escuro do equipamento, e a latência para entrar no lado claro foi observada.

1.3.3 Sistema reprodutor masculino e toxicidade reprodutiva

Uma vez que os primeiros achados dos efeitos da administração oral do chá de buchinha-do-norte a ratos Wistar foram observados nos testículos, faz-se aqui importante abordar informações a respeito do sistema reprodutor masculino.

O testículo é um órgão complexo constituído morfofuncionalmente de dois compartimentos, o intersticial e o tubular. O intersticial contém células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e células de Leydig, que é a principal fonte de hormônios androgênicos. As células de Leydig, estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH), encontram-se em contato com os capilares, sendo sua principal função a produção de testosterona, hormônio importante para o desenvolvimento das características masculinas e para a manutenção da espermatogênese (O' DONNEL, 2001). Ainda no útero, a testosterona estimula o padrão de desenvolvimento masculino dos ductos do sistema genital e também a descida dos testículos. A testosterona se transforma em estrogênio no encéfalo desempenhando nos homens o desenvolvimento de determinadas regiões do encéfalo (TORTOLA, 2017). A testosterona, sob o efeito regulatório dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), estimula a espermatogênese, atua na diferenciação sexual durante o desenvolvimento embrionário e no controle da secreção destas mesmas gonadotrofinas (MORETTO et al., 2012).

O compartimento tubular é formado pelo parênquima testicular composto pelos túbulos seminíferos, no interior nos quais há a formação do gameta masculino no processo denominado de espermatogênese (TAKASHIBA, 2011). O túbulo seminífero é formado por células espermatogênicas, que consiste em

espermátide, espermatócitos e espermatogônia, entremeados pelas células de Sertoli (DADOUNE e DEMOUULIN, 1993). As células de Sertoli têm como função o controle da maturação e da migração das células germinativas, e estão envolvidas também na síntese proteica de esteroides e fagocitam células germinativas em degeneração (DADOUNE e DEMOUULIN, 1993; AMANN, 1993), conforme figura 4.

Figura 4. 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.

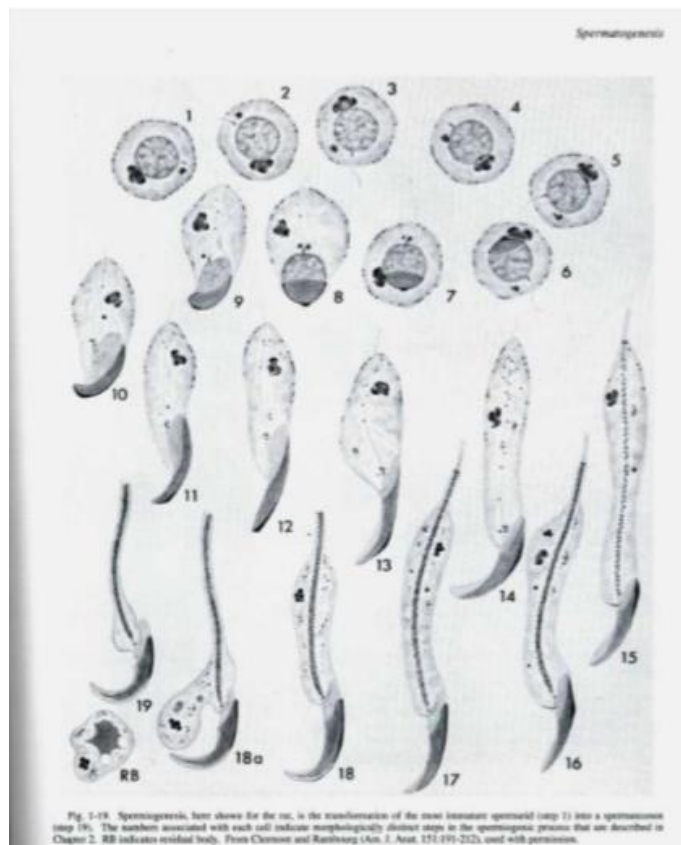


Fonte: Página do Laboratório Virtual de Embriologia da UFRN.
<http://embrioufrn.blogspot.com/2014/07/aula-pratica-de-gametogenese.html> acesso em:
03/04/2020

A espermatogênese é caracterizada por ser um processo cíclico altamente organizado e complexo que ocorre nos túbulos seminíferos e é dividido por três fases essenciais, sendo elas a proliferativa, em que as células sofrem sucessivas e rápidas divisões mitóticas; a meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinação e segregado; a espermiogênica, em que células haploides (espermatídes) se diferenciam em espermatozoides, célula altamente especializada e estruturalmente equipada para alcançar e fertilizar o ovócito (PANNOCCHIA et al., 2008). Esse processo, em particular, não foi abordado no presente trabalho.

Leblond e Clermont, em 1952, publicaram um artigo, no qual consta o ciclo da espermatogênese em ratos, camundongos e em cobaia, que foi amplamente aceito e ainda é bastante utilizado até a presente data. A espermiogênese é dividida e classificada com critérios morfológicos bem definidos com base na forma do acrossomo e das espermátides (RUSSEL, 1990) (Figura 5).

Figura 05. Etapas da espermiogênese em rato.



Fonte: Russel LD, Etlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, St. Louis, MO; pp 21 com permissão de Clermont e Rambourg (Am.J.Anat. 151:191-212).

A toxicidade do sistema reprodutor está relacionada à interferência de um agente tóxico sobre si, tanto em machos como em fêmeas, incluindo aquele adquirido durante o desenvolvimento pré-natal. As alterações específicas podem ser por efeito endógeno, na qual ocorre anomalias congênitas por questões genéticas, ou fatores externos, devido a toxicidade de alguma substância. Em ensaios de toxicidade reprodutiva, o potencial de uma determinada substância em interferir no sistema reprodutor é avaliada segundo seus efeitos indesejáveis sobre a fertilidade, na qualidade e no desenvolvimento do embrião, durante o parto e após o parto e no desenvolvimento até atingir a maturidade sexual, em fêmeas. Conforme Alves 2018, apresentou danos testicular após a utilização de buchinha-do-norte, para análise de toxicidade reprodutiva, normalmente é utilizado ratos e convencionalmente utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* e frequentemente a linhagem Wistar (LEMÔNICA, 2001). Conforme LEMÔNICA

(2001), os estudos de toxicidade reprodutiva podem ser divididos em três seguimentos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Os três seguimentos de toxicidade reprodutiva

Seguimento I	Toxicidade crônica: avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, sendo machos tratados antes e durante o acasalamento e a fêmeas durante a gestação e a lactação.
Seguimento II	Toxicidade pré-natal (teratogenicidade): avalia as alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese.
Seguimento III	Toxicidade peri- e pós-natal: avalia o desenvolvimento peri- e pós-natal da progênie exposta durante as etapas de desenvolvimento fetal e lactação.

1.3.4 Citocinas inflamatórias

As citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, secretadas pelas células do organismo, principalmente pelos leucócitos, em resposta a estímulos antigênicos, que atuam como mensageiros do sistema imune. As citocinas podem receber nomes específicos que se referem ao tipo celular que predominantemente as sintetizam e aos seus mecanismos de ação. Sendo assim, alguns exemplos são as citocinas predominantemente sintetizadas por fagócitos mononucleares que são denominadas de monocinas, enquanto as produzidas principalmente por linfócitos são linfocinas. As citocinas que agem em outros leucócitos são denominadas interleucinas (IL). As IL estão envolvidas na resposta e na apresentação de antígenos, principalmente pelos linfócitos T auxiliares. As citocinas do tipo IL-1 são mediadores importantes das reações imunes inatas, demonstram então um papel importante em doenças inflamatórias, assim como o TNF- α , também faz parte da resposta do processo inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

TNF- α é uma citocina que contempla várias funções, quando seus níveis estão baixos ela age na defesa contra patógenos, ajuda na regeneração de tecidos, regula o sistema imunológico, inibe o crescimento tumoral e promove a resolução da inflamação. Porém, em níveis elevado pode ocorrer inflamação e

lesão dos órgãos (ROBINSON; GENOVESE M; MORELAND, 2001). Os bloqueadores de TNF- α apresentam uma opção terapêutica para as doenças inflamatórias (ALEXIS; STROBER, 2005)

A IL-6 atualmente é considerada um biomarcador molecular muito utilizado (CERNADA., 2015). A interleucina-6 é uma citocina pró-inflamatória, secretada por monócitos, macrófagos, fibroblastos e linfócitos B e T. Este biomarcador é estimulado principalmente por um processo inflamatório sistêmico (ISTEMI, 2015).

1.3.5 Hormônios relacionados ao estresse.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) modula o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, estimula o córtex cerebral, além de produzir efeitos anti-inflamatórios e supressão da resposta imune (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011). As inúmeras atividades desenvolvidas pelo eixo HHA ocorrem em resposta aos hormônios esteroides, os quais são secretados pela glândula adrenal (ARAFAH, REVIEW, 2006). Estímulos estressantes, como o jejum, por exemplo, ativam o eixo HHA, o que leva à liberação de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, ocasionando, com isso, a estimulação da síntese e secreção de adrenocorticotrofina (ACTH) pela adeno-hipófise (ARAFAH, 2006). Após cair na corrente sanguínea, o ACTH passa a atuar no córtex adrenal, com o intuito de proporcionar a síntese e liberação de hormônios esteroidais, como os glicocorticoides (GC) (MARQUES; PEREIRA; NETO, 2003). Segundo ANTI et al. (2008), alguns medicamentos anti-inflamatórios suprimem o ACTH de 8 a 12 horas, como a cortisona e a prednisolona. Ao diminuir o ACTH, os níveis de corticosterona (hormônio do estresse) também diminuem. Neste estudo, foi retirada uma amostra de sangue para quantificação do ACTH, após a análise comportamental. Ainda sobre a reação anti-inflamatória, também foi feita a análise de melatonina. A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, localizada entre os dois hemisférios cerebrais, que pesa cerca de 0,13 gramas e possui aproximadamente 1,2 cm de diâmetro, dando origem no diencéfalo. (COMMENTZ; HELMKE, 1995). Esse hormônio está envolvido

diretamente na regulação e facilitação circadiana do sono, promove a inibição do desenvolvimento e crescimento cancerígeno e também atua no aprimoramento da função imunológica. (BLASK, 2009). Em diversos modelos experimentais de infecção/inflamação, a melatonina tem a função de proteger o organismo, diminuindo, assim, a taxa de mortalidade. Alguns desses efeitos protetores são: contra toxicidades, sua possível ação no retardo do envelhecimento e redução dos radicais livres (estresse oxidativo) (CUZZOCREA; REITER, 2001). A melatonina tem bastante atuação na fase crônica do processo inflamatório verificado em modelos experimentais. O padrão do processo inflamatório é restaurado após a reposição de melatonina, em doses farmacológicas, adicionada à água (LOPES; DELYRA; MARKUS; MARIANO, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo a verificação das alterações comportamentais e algumas alterações fisiológicas causadas pela administração oral do extrato aquoso de buchinha-do-norte a ratas prenhes (GD17 a GD21) e à prole masculina destas fêmeas, quando em idade referente a adultos jovens.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações comportamentais nas fêmeas em período pós reprodução;
- Avaliar alguns parâmetros de desempenho reprodutivo
- Avaliar as alterações de rins e fígado das fêmeas em período pós-reprodução
- Avaliar alterações na concentração sérica de citocinas inflamatórias de ratas pós reprodução;
- Avaliar alterações do peso das fêmeas em período pós reprodução;
- Avaliar alterações comportamentais de ratos da geração F1, em comparação com ratos da geração F0;
- Avaliar alterações na concentração sérica de testosterona, cortisona, hormônio adrenocorticotrófico e melatonina em ratos da geração F1, em comparação com ratos da geração F0;
- Avaliar alterações na concentração sérica de citocinas inflamatórias de ratos da geração F1, em comparação com ratos da geração F0;
- Avaliar alterações macroscópicas e microscópicas em testículo de ratos da geração F1, em comparação com ratos da geração F0.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto às fêmeas F0: A administração de uma dose sub-abortiva do extrato aquoso dos frutos secos de *L. operculata* (EBN) para ratos fêmeas grávidas em GD17 a GD21 resultou em aumento do comportamento de ansiedade e aumento do impulso de locomoção das barragens de geração F0, talvez relacionadas à diminuição dos níveis de soro de melatonina. As barragens de geração F0 apresentaram ganho de peso, uma diminuição nas citocinas inflamatórias, pode estar relacionada a um efeito glucocorticoide das cucurbitacinas. Foi observada vacuolização tubular nos rins nas barragens femininas, embora não tenham sido observadas alterações nos níveis de creatinina. O percentual de filhotes do sexo feminino foi maior do que o percentual de filhotes machos. Houve um ganho de peso nos filhotes machos, mas não nas fêmeas.

Quanto aos machos da geração F1: A administração por gavagem da dose sub-abortiva referente a 1,0 mg/kg do extrato aquoso dos frutos secos de *L. operculata* nas fêmeas gestantes em GD17 a GD21 mostrou que os machos nascidos de ratas que receberam a administração de buchinha-do-norte nos dias GD17 a GD21 de gestação apresentaram alterações no CA que foram observadas com maior precisão na CCE relacionadas à frequência de locomoção, imobilidade e frequência de levantar para os animais que receberam EBN por via transgeracional que apresentaram-se mais ativos que os animais da geração F0, o que foi causado basicamente por conta da diferença entre as gerações, com menor influência vinda do tratamento com EBN por gavagem, que está relacionada à geração F0. Em termos de atividade sobre a estrutura testicular, observou-se que não houve diferenças macroscópicas nos testículos, salvo um aumento do peso relativo dos testículos dos ratos que receberam EBN por via transgeracional. Em compensação, o fator “tratamento”, que está diretamente relacionado com a administração de EBN e indiretamente relacionado à via de administração, influenciou as alterações deletérias observadas microscopicamente nos parâmetros dos ratos de F0, como no diâmetro e na luz dos túbulos seminíferos e na quantidade de células de Leydig.

Essas alterações ficam ainda mais evidentes quando se observa que as citocinas inflamatórias se encontram mais elevadas nos animais da geração F0. Corticosterona e melatonina encontram-se mais elevadas nos animais da geração F1, mas não é possível relacionar esse dado a um fator de estresse existente em F1. A administração transgeracional de EBN se mostrou menos prejudicial sobre os parâmetros comportamentais, histológicos, inflamatórios e hormonais observados, e comprovam que a administração direta de EBN é mais prejudicial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2003, p. 243-274.
- AHMED, B.; ALAM, T.; KHAN, S. A. Hepatoprotective activity of *Luffa echinata* fruits. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, n. 2, p. 187–189, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00402-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00402-5).
- ALEXIS, A.; STROBER, B. Usos dermatológicos off-label de terapias anti-TNF- α . **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 9, n. 6, p. 296–302. 2005. <https://doi.org/10.1007 / s10227-005-0110-7>
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 3rd ed. Salvador, 2011. Available from Scielo Books. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acessado em: 27/12/2019.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Laverger, MT, Brasil. **Acta. Bot. Bras.**, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062002000200006>.
- ARAFAH, B. Review: Hypothalamic Pituitary Adrenal Function During Critical Illness: Limitations of Current Assessment Methods. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 10, p. 3725-45, 2006. <https://doi.org/10.1210 / jc.2006-0674>
- BALDISSERA, M. D. et al. Genotoxic effect in vitro of aqueous extract of *luffa operculata*. **Rev. Disc. Scientia**, v. 20, n. 3, p. 1-10, 2019.
- BARROSO, M. C. R. D.; LEITE, B. M. T.; PAIVA, K. C. C. Empiema subdural recidivante secundário à sinusite bacteriana frontal em adolescente imunocompetente: relato de caso. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 55, n. 3, p. 29-32, 2019.
- BLASK, D. E. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. **Sleep Med.**, v. 13, n. 4, p. 257-264, 2009. <https://doi.org/10.1016 / j.smr.2008.07.007>

- BRASIL. 2006. **Ministério da Saúde**. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 jun.2006.
- BROOK, I. Sinusitis of odontogenic origin. **Otolaryng. Head Neck.**, v. 135, n. 3, p. 349-55, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2005.10.059>
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. Ethanol Sensitization during adolescence or adulthood induces different patterns of ethanol consumption without affecting ethanol metabolism. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 11, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00046>
- CARTER, A. J. et al. Animal personality: What are behavioural ecologists measuring?. **Biol. Rev.**, v. 88, n. 2, p. 465–475, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1111/brv.12007>.
- CERNADA, B. V.; ROQUES, S.; VENTO, T. M. Interleuquina-6 y diagnóstico de sepsis neonatal: algunas matizaciones. **Rev. Del Serv. de Neonatol.**, España, v. 74, n. 2, p. 104-105, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.janpedi.2010.06.001>
- CHAMPNEY, R.; FERGUSON, N. M.; FERGUSON, G.G. Selected pharmacological studies of *Luffa operculata*. **J. Pharm. Sci.**, v. 63, n. 6, p.942-3, 1974. <https://doi.org/10.1002/jps.2600630631>
- COMMENTZ, J. C.; HELMKE, K. Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. **Horm. Res.**, v. 44, n. 6, p. 271-275, 1995. <https://doi.org/10.1159/000184640>
- CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v.426, n. 1-2, p. 1-10, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01175-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01175-X)
- DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. **Structure and functions of testis**. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C. HUNTER, R. H. F. Reproduction in mammals and man. Paris: Ellipses, 1993. *Cap. 13*, p. 227- 255.
- DARRUDI, R. et al. Genetic diversity of Cucurbita pepo L. and Cucurbita moschata Duchesne accessions using fruit and seed quantitative traits. **J. App. Res. Med. Aromat. Plants**, v. 8, p. 60–66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.11.003>.

- EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behav. Brain Res.**, v. 142, n. 1–2, p. 53–62, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00382-0).
- FERNANDES, L. F. C.; ALDRIGHI, J. M.; ALDRIGHI, A. P. S. Prescever ou não isoflavonas de soja à mulher no climatério? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 52, n. 03, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302006000300007>
- GARCIA, R. et al. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. **Toxicol.**, v. 376, p. 44-50, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.009>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000200010>.
- GREGGOR, A. L.; THORNTON, A.; CLAYTON, N. S. Neophobia is not only avoidance: Improving neophobia tests by combining cognition and ecology. **Curr. Opin. Behav. Sci.**, v. 6, p. 82–89, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.10.007>.
- HALLA, N. et al. Ammodaucus leucotrichus and Citrullus colocynthis from algerian Sahara: Ethnopharmacological application, phytochemical screening, polyphenols content and antioxidant activity of hydromethanolic extracts. **J. King. Saud. Univ. Sci.**, v. 31, n. 2, p. 541-548, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.018>. In Press.
- HENO, F. L. Hypertension and inflammation: contribution of obesity. **Rev. Bras. Hipertens**, v.14, n. 4, p. 239-244, 2007.
- HOFFMANS, R. et al. Acute and chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis in relation to comorbidity, ethnicity and environment. **PlosOne**, v.13, n. 2, p. 1–14, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192330>.
- HSU, C.; SHENG, C.; HO, C. Efficacy of sinus ultrasound in diagnosis of acute and subacute maxillary sinusitis. **J. Chinese Med. Assoc.**, v. 81, n. 10, p. 1–7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2018.03.005>
- ISTEMI, H. Función de la concentración sérica de interleucina 6 y proteína C-reactiva para diferenciar la etiología de la septicemia neonatal. **Rev. Unid. Neonatol.**, v. 113, n. 6, p. 534-543, 2015. <http://dx.doi.org/10.5546/aap.2015.534>

- 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. 386-395, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.128>.
- KOCYAN, A. et al. A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 44, n. 2, p. 553–577, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.022>.
- KONE, Y.; BOUA, B.; MAMYRBEKOVA-BEKRO, J. A.; BEKRO, Y. A. Analyse CPG-MS et activité anti sinusite in vitro de l'huile essentielle fractionnée des feuilles de *Diphasia klaineana* Pierre (Rutaceae) de Côte d'Ivoire. **Pharm. Méd. Trad. Afr**, v. 19, n. 1, p. 10-16, 2018.
- KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiol. Behav.**, v. 133, p. 30-38, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.006>.
- KUNIISHI, H. et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. **Neurosci. Res.**, v. 123, p. 27-35, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.04.012>.
- LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea-pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. **Am. J. Anat.**, v. 90, n. 2, p. 167-215, 1952. <https://doi.org/10.1002/aja.1000900202>.
- LEMÔNICA, I. P. **Tetarogêneses experimental e sua complicação em humanos**. Manual de Teratogênese. Porto alegre: Ed. da Universidade /UFRGS, 2001, p. 19-39.
- LOPES, C. et al. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. **J. Pineal. Res.**, v. 23, n. 1, p. 72-78, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1997.tb00338.x>
- MAGALHÃES, P. A. et al. Analysis of the quality of life after manual lymphatic drainage in individuals with sinusites. **Fisiot. Bras.**, v. 20, n. 1, p.62-69, 2019. <http://dx.doi.org/10.33233/fb.v20i1>

- MENGUE, S. S. et al. Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras. **Rev. Saúde Públ.**, v. 35, n. 5, p. 415-420, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102001000500002>
- MODI, A.; KUMAR, V. *Luffa echinata* Roxb.-A review on its ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological perspective. **Asian Pac J. Trop.**, v. 4, n. 1, p. 7–12, 2014. [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60409-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60409-6)
- MORETTO M. C. et al. Relationship between nutritional status and frailty in Brazilian elderly. **Rev. Bras. Clin. Med.**, v. 10, n. 4, p. 267-71, 2012.
- MOYA-HERNÁNDEZ, A. et al. South African Journal of Botany Analysis of genetic diversity of *Cucurbita ficifolia* Bouché from different regions of Mexico, using AFLP markers and study of its hypoglycemic effect in mice. **S. Afr. J. Bot.**, v. 116, p. 110-115, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.409>
- NOLLA, D.; SEVERO, B. M. A.; MIGOTT, A. M. B. M. **Plantas Medicinais**. 2 ed. Passo Fundo: UPF, 2005.
- O´ DONNEL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocr. Rev.**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001. <https://doi.org/10.1210 / edrv.22.3.0431>
- OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 5, p. 3177–3184, 2011. <https://doi.org/10.1074 / jbc.R110.179325>
- PANNOCCHIA, M. A. et al. Effective strategy of the testis fixation in Wistar rat to evaluate the morphological and morph metric parameters of seminiferous epithelium. **Com. Scient. e Saúde**, v. 7, n. 2, p. 227-233, 2008. <https://doi.org/10.5585 / conssaude.v7i2.946>
- PERALS, D. et al. Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality? **Anim. Behav**, v. 123, p. 69–79, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.10.006>.
- 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.
- QIAO, J. et al. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF-κB nuclear translocation. **Inflamm. Res.**, v. 62, n. 5, p. 461-469, 2013. <https://doi.org/10.1007 / s00011-013-0598-z>

- RAISH, M. et al. Momordica charantia polysaccharides ameliorate oxidative stress, inflammation, and apoptosis in ethanol-induced gastritis in mucosa through NF- κ B signaling pathway inhibition. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 111, p. 193–199, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.008>.
- ROBINSON, W.; GENOVESE, M.; MORELAND, L. Demyelinating and Neurologic Events Reported in Association With Tumor Necrosis Factor α Antagonism. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 9, p.1977–1983, 2001.
- RUSSEL, L. D. et al. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache river Press, St. Louis, MO, 1990.
- SANTOS, M. D. et al. Concentração Sérica de Testosterona em Touros Zebu. **Rev. Bras. Zootec**, v. 29, n. 3, p. 738-744, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000300015>
- SCHULTES, R. E. Ethnopharmacological Conservation: a key to progress in medicine. **Acta Amaz.**, v. 18, n. 1-2, p. 393-406, 1988.
- SHI, G. et al. New dammarane-type triterpene saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their anti-hepatic fibrosis activities in vitro. **J. Funct. Foods**, v. 45, p. 10–14, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.016>.
- SILVA, L. et al. Preclinical evaluation of *Luffa operculata* Cogn. and its main active principle in the treatment of bacterial rhinosinusitis. **Braz. J. Otorrinol.**, v. 84, n. 1, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.11.004>
- TAKASHIBA, K. S. et al. Testicular morphology in obese and sedentary Wistar rats submitted to physical training. **Health Sci.**, v. 33, n. 1, p. 25-33, 2011.
- TORTOLA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia**. 10ª Ed, Ed. Artmed. Porto Alegre, 2017.
- WALIA, V.; GARG, C.; GARG, M. Anxiolytic-like effect of pyridoxine in mice by elevated plus maze and light and dark box: Evidence for the involvement of GABAergic and NO-sGC-cGMP pathway. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 173, p. 96-106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.06.001>.
- ZHANG, R. et al. From nature to creation : Going around in circles, the art of peptide cyclization. **Bio. Med. Chemist.**, v. 26, n. 6, p. 1135–1150, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.017>.

APÊNDICES

Apendice 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 – <http://www.unip.br>