



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIOLOGICAS
E AMBIENTAIS – FCBA
BIOTECNOLOGIA BACHARELADO



Larissa Martins Moura

“Avaliação de parâmetros reprodutivos após tratamento com o extrato aquoso de *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha) em ratos Wistar adultos”

"Assessment of Reproductive Parameters after Treatment with Aqueous Extract of *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha) in Adult Wistar Rats"

Orientador: Dr. Ramão Souza de Deus Júnior

Dourados/MS

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIOLOGICAS
E AMBIENTAIS – FCBA
BIOTECNOLOGIA BACHARELADO



Larissa Martins Moura

“Avaliação de parâmetros reprodutivos após tratamento com o extrato aquoso de *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha) em ratos Wistar adultos”

"Assessment of Reproductive Parameters after Treatment with Aqueous Extract of *Luffa operculata* (L.) Cogn (Sponge Gourd) in Adult Wistar Rats"

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia à Universidade
Federal da Grande Dourados.

Orientador: Dr. Ramão Souza de Deus Júnior
área de concentração 2.00.00.00-6 Ciências Biológicas

Dourados/MS

2023

LARISSA MARTINS MOURA

“Avaliação de parâmetros reprodutivos após tratamento com o extrato aquoso de *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha) em ratos Wistar adultos”

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Dr. Ramão Souza de Deus Júnior.

Aprovado em: 04/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **RAMAO SOUZA DE DEUS JUNIOR**
Data: 05/09/2023 07:36:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ramão Souza de Deus Júnior
Presidente

Documento assinado digitalmente
 **LARISSA PIRES MUELLER**
Data: 05/09/2023 11:50:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Larissa Pires Mueller
Membro

Documento assinado digitalmente
 **LAVINIA ALMEIDA MULLER**
Data: 05/09/2023 12:48:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Lavínia Almeida Muller
Membro

Resumo:

As plantas medicinais são uma opção acessível para curar ou aliviar enfermidades. No entanto, elas podem apresentar toxicidade por conta dos seus próprios componentes, por manuseio incorreto ou altas dosagens. Dentre estas plantas, a *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha) é usada popularmente para tratar os sintomas da sinusite e rinite, além de ser utilizada por conta das suas propriedades abortivas. Estudos recentes apontam alterações testiculares de ratos machos submetidos à infusão dessa espécie vegetal em experimentação, o que, por sua vez, prejudica diretamente a fertilidade masculina e, conseqüentemente, a reprodução. Contudo, na literatura, são escassos os estudos que investiguem essa correlação. Isto posto, o presente artigo teve por objetivo analisar a toxicidade do extrato aquoso de *L. operculata* (L.) Cogn (buchinha) sobre aspectos reprodutivos em ratos Wistar adultos. Para isso, foram empregadas análises histológicas testiculares, avaliação da contagem, morfologia e motilidade dos espermatozoides, além da determinação do peso corporal e de órgãos reprodutivos. Embora tenham surgido diferenças estatísticas quanto à contagem, produção diária e trânsito dos espermatozoides, a relação da buchinha com a saúde reprodutiva masculina demanda análises mais aprofundadas.

Palavras-chave: Saúde reprodutiva; Fitoterapia; Cucurbitáceas.

Abstract: The medicinal plants are an accessible option to heal or ease illnesses. However, they could exhibit toxicity because of their own components, due to improper manipulation or high dosages. Among these plants, the *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha) is popularly used for the treatment of sinusitis and rhinitis symptoms, in addition to being used because of their abortive purposes. Recent studies point to alterations of male rats testicles by being submitted to the experimentation of this plant species infusion, which directly affects male fertility and, therefore, the reproduction. Although, in literature, the studies that explore this correlation are scarce. With that being said, the present article had as objective to analyze the toxicity of the *L. operculata* (L.) Cogn (buchinha) aqueous extract over the adult Wistar rats reproductive aspects. To achieve that, testicle histological analyzes were applied, sperm count, morphology and motility evaluation, besides the reproductive organs and body weight determination. Even though statistical differences in sperm count, daily production and sperm transit, the correlation of the *L. operculata* (L.) Cogn with male reproductive health requests deeper analyzes.

Key-words: Reproductive Health; Phytotherapy; Cucurbitaceae.

1. Introdução

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), plantas medicinais são todas as espécies vegetais utilizadas para fins terapêuticos -popularmente em chás e infusões- as quais emergem como uma alternativa ou complemento ao uso de fármacos sintéticos, constituindo uma fonte terapêutica acessível, especialmente em comunidades periféricas, bem como, podem fornecer compostos que, quando modificados, apresentam maior eficiência e menor toxicidade, além da possibilidade de serem utilizados como protótipos para criação de fármacos com atividade símil (Brasil 2011; Turolla & Nascimento 2006). Nesse sentido, quando manipuladas para obtenção de medicamentos ou produtos profiláticos, caracteriza-se como um fitoterápico, enquanto que, quando há o isolamento de um composto bioativo específico para formação de drogas, considera-se um fitofármaco (Cechinel 2020).

Historicamente, é datado o uso de plantas medicinais em diversas civilizações da antiguidade. Na Grécia Antiga, Hipócrates -considerado pai da medicina- já detinha o conhecimento das propriedades terapêuticas das plantas, uma vez que, na obra intitulada *Corpus Hippocraticum*, descreveu inúmeras drogas vegetais, muitas dessas, inclusive, seguem sendo usadas na medicina moderna (Monteiro & Barelli 2017). Por sua vez, no Brasil, os povos indígenas e africanos são os responsáveis por difundir o conhecimento e o cultivo de espécies vegetais com potencial de curar ou aliviar enfermidades. Posteriormente, tal conhecimento foi absorvido pelos colonizadores europeus que formaram os primeiros boticários em território tupiniquim, baseando-se,

especialmente, na biodiversidade da flora brasileira e nas plantas trazidas da África e Ásia (Saad *et al.* 2018).

Ilustrando esse cenário, a *Luffa operculata* (L.) Cogn (buchinha), conhecida como buchinha, buchinha-do-norte ou cabacinha, é uma planta nativa brasileira pertencente à família Cucurbitaceae, apresenta flores de tonalidade amarela escura, seus frutos, em estágio inicial, são pequenos, com protuberâncias moles ao amadurecerem e após a secagem, esses frutos transformam-se em estruturas fibrosas e sólidas, com uma tonalidade amarelo claro (Caribé 2008; Revilla 2002). Popularmente, é usada para tratar os sintomas nasossinusais da rinite e sinusite, através de infusões de seu fruto seco em água que é, posteriormente, administrado por inalação ou instilado na narina (Menon-miyake *et al.* 2005). Ainda que a literatura científica a respeito seja incipiente, e não haja dados que indiquem seu mecanismo de ação nestas doenças respiratórias, sua eficiência é comprovada e apontada por diferentes artigos (Menon-miyake *et al.* 2005; Silva *et al.* 2018; Salviano 1992; Scalia *et al.* 2015). Além disso, outro uso popular se dá pela propriedade abortiva e de inibição de fertilidade do chá de seu fruto seco (Caribé 2008; Aguwa & Mittal 1983).

No entanto, concomitante aos seus benefícios, as plantas medicinais podem apresentar toxicidade, seja por componentes que as constituem, contaminantes no preparo ou superdosagens, assim como, reações alérgicas ou tóxicas (Mendieta *et al.* 2014; Veiga *et al.* 2005). Nesse ínterim, a *L. operculata* (L.) Cogn, quando usada incorretamente, está associada a casos de malformação fetal, hemorragia vaginal e óbito de gestantes, ademais, também foi relatado hemorragia nasal em tratamentos para doenças respiratórias (Lanini *et al.* 2009; Rodrigues *et al.* 2011; Barilli *et al.* 2007; Miró 1995). Embora observadas alterações macroscópicas e microscópicas e redução de células de Leydig nos testículos de ratos submetidos à infusão dessa espécie vegetal em experimentação, são escassas as análises datadas na literatura dos efeitos do uso da planta em aspectos reprodutivos masculinos (Silva *et al.* 2018).

Tais aspectos toxicológicos encontrados no sistema reprodutor masculino na buchinha foram também observados em outras espécies da família Cucurbitaceae, entre as quais, foram relatados diminuição na contagem de espermatozoides, motilidade e uma redução nos hormônios sexuais e capacidade de fertilidade após uso do extrato etanólico de *Momordia dioica* e do extrato hidroalcoólicos do caule e folha de *Ecballium elaterium*. (Pusuloori *et al.* 2017 ; Irisappan & Annamalai 2018).

À vista disso, o presente estudo teve como finalidade avaliar a estrutura dos testículos e epidídimos, a produção e qualidade espermática, bem como, a fertilidade de ratos Wistar adultos submetidos à infusão dos frutos secos de *L. operculata* (L.) Cogn (buchinha), de modo a elucidar os efeitos da planta sobre parâmetros reprodutivos masculinos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral: Analisar a toxicidade do extrato aquoso dos frutos secos de *Luffa operculata* (L.) Cogn em relação aos aspectos reprodutivos em ratos Wistar adultos.

2.2 Objetivos específicos: Mediante o desenvolvimento da pesquisa, os seguintes parâmetros foram avaliados a fim de alcançar o objetivo supracitado:

- a) peso corporal e dos órgãos reprodutivos;
- b) histologia dos testículos;
- c) qualidade espermática, através da determinação no número, morfologia e motilidade dos espermatozoides;

d) cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo e contagem do número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupo experimental

Este experimento utilizou os animais de acordo com os princípios éticos para o uso de animais de laboratório descritos pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e as diretrizes estabelecidas pelo CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, além da avaliação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal da Grande Dourados, com o protocolo N°17.2021. Foram utilizados 18 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), em idade reprodutiva (idade inicial de 80 dias), pesando cerca de 300g, oriundos do Biotério Central da UFGD e mantidos em gaiolas no Biotério Tecnológico da Faculdade de Ciências da Saúde em condições de controle de temperatura ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}$) e iluminação (ciclo 12h claro/12h escuro), sob dieta sólida e líquida *ad libitum*.

3.2 Extrato de *Luffa operculata*

Os frutos de *Luffa operculata* foram coletados e identificados pelo biólogo responsável Dr. Ramão Souza de Deus Júnior. O extrato foi preparado de acordo com o uso popular, a partir dos frutos secos da planta, por infusão. Em laboratório, 3 frutos secos foram adicionados a 1.020 mL de água filtrada em ebulição e mantidos em infusão por 10 minutos. Posteriormente, a infusão foi resfriada, filtrada, congelada (-70° C) e liofilizada, resultando no extrato aquoso, denominado ELO. Esse extrato foi diluído em soro fisiológico no momento da administração e, posteriormente, utilizado no experimento que será descrito a seguir.

3.3 Experimento

Para a realização do experimento, foram utilizados 18 ratos, divididos em 3 grupos, contendo 6 ratos cada grupo, entre os quais, elenca-se: o grupo TLO, tratados com ELO; o grupo Naive, que não recebeu tratamento, e, por fim, o grupo Controle, que recebeu apenas soro fisiológico. O extrato obtido foi diluído em soro fisiológico e administrado em 1 mg/kg, dose estabelecida pela literatura (Alves *et al.* 2018), por gavagem, durante cinco dias consecutivos, para os animais do grupo TLO, enquanto que, os outros grupos receberam tratamentos distintos, conforme exemplificado. Todos os ratos foram pesados durante os cinco dias de experimento.

Concluído o experimento, os animais foram eutanasiados e, posteriormente, decapitados. Esse método se faz necessário uma vez que o sangue foi colhido dos vasos cervicais rompidos para a realização de ensaios hormonais posteriores como parte do projeto ao qual esse artigo está inserido.

Foi coletada a cauda do epidídimo esquerdo para obtenção de espermatozoides e análise morfológica. A região da cabeça/corpo do epidídimo esquerdo, juntamente com o testículo direito, foi congelada a -20° C para contagem espermática e determinação do tempo de trânsito. O testículo esquerdo foi reservado para avaliação histológica. Além disso, realizou-se a pesagem dos órgãos reprodutivos, com o auxílio de uma balança analítica, entre os quais: testículo, epidídimo, próstata e vesícula

seminal cheia e vazia.

3.4 Coleta dos órgãos para histologia

O testículo retirado teve sua túnica albugínea seccionada nos polos utilizando uma tesoura cirúrgica pequena. Em seguida, foi imerso na solução fixadora de ALFAC, composta de álcool 80-85%, formaldeído 10% e ácido acético glacial 5%, seguindo o protocolo descrito por Russell *et al.* (1990). Os tecidos foram submetidos a processamento histológico, incluídos em parafina e cortados em seções de 5µm. Essas seções foram coradas com hematoxilina e eosina para a análise histológica.

3.5 Avaliação histológica

Foi conduzida uma análise histológica mediante a avaliação de 100 cortes de túbulos seminíferos. Foram examinados o estado do epitélio, o conteúdo da luz e o interstício dos testículos, categorizando anormalidades morfológicas do órgão conforme as especificações para estudos toxicológicos (Foley 2001). Os túbulos foram considerados irregulares se exibissem características como células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou esfoliação celular na luz. Adicionalmente, o aspecto do interstício testicular foi qualitativamente avaliado utilizando um microscópio de luz Leica® em ampliações de 100X, 200X e 400X.

3.6 Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo e contagem do número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo

Os testículos direitos, após serem descapsulados e centrifugados, foram congelados até o dia da homogeneização, seguindo o método de Robb *et al.* (1978) com ajustes. O tecido testicular foi descongelado e homogeneizado em solução STM de acordo com o peso do parênquima, realizando duas sessões de homogeneização de 15 segundos cada, separadas por um intervalo de 30 segundos em gelo. Em seguida, o tecido foi sonificado por 30 segundos. Após uma diluição de 10 vezes, uma amostra foi transferida para uma câmara de Neubauer (4 campos por animal) para contar espermátides maduras. Para calcular a produção diária de espermatozoides (PDE), o número de espermátides foi dividido por 6,1, que representa o número de dias do ciclo em que essas espermátides estão presentes no epitélio seminífero. De forma similar, as porções de cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram cortadas em fragmentos pequenos usando uma tesoura e homogeneizadas de acordo com o mesmo protocolo utilizado para os testículos. O tempo de trânsito dos espermatozoides através do epidídimo foi calculado dividindo o número de espermatozoides em cada porção pela PDE.

3.7 Motilidade espermática

Foi realizada a avaliação da motilidade utilizando espermatozoides da cauda epididimária, sendo esses suspensos em meio HTF (Human Tubal Fluid). Uma alíquota de 10 µL foi colocada em uma câmara de Makler (Irvine, Israel) e examinada sob microscópio de luz com um aumento de 400X. Analisou-se 100 espermatozoides por animal, categorizando sua motilidade da seguinte forma: Tipo A para espermatozoides móveis com movimento progressivo, Tipo B para espermatozoides móveis com movimento não progressivo e Tipo C para espermatozoides imóveis.

3.8 Morfologia espermática

Para esse fim, 100µl de solução contendo espermatozoides da cauda epididimária foram transferidos para 900 µl de uma solução de formol a 10%. Posteriormente, foram feitos esfregaços em lâminas histológicas, as quais foram deixadas secar ao ar livre durante 90 minutos. Após esse período, os esfregaços foram observados utilizando um microscópio de contraste de fase com aumento de 400x (Seed *et al.* 1996). Foram analisados 200 espermatozoides por animal, e as anormalidades morfológicas encontradas foram classificadas em duas categorias: a) anormalidades de cabeça (incluindo ausência de curvatura e isoladas) e b) anormalidades de cauda (enrolada, quebrada e isolada) (Filler 1993).

3.9 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente os grupos TLO e Naive foram comparados ao grupo Controle pelo teste de Dunnett. O nível de significância para as análises foi fixado em $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 8 foi utilizado para realização de todas as análises.

4. Resultados e Discussão

A *L. operculata* (L.) Cogn tem sido objeto de investigação no que diz respeito à utilização de sua infusão para fins abortivos, bem como possíveis complicações em gestantes (Revilla 2002). No entanto, há uma ausência de informações documentadas sobre os possíveis impactos da *Luffa operculata* no funcionamento e na saúde do sistema reprodutor dos indivíduos do sexo masculino. O presente estudo assume uma posição pioneira ao realizar avaliações abrangentes de alguns parâmetros reprodutivos, objetivando uma avaliação mais profunda da toxicidade reprodutiva em machos.

A avaliação do efeito tóxico de plantas é realizada por meio da observação de alterações no peso de órgãos dos animais, incluindo, os órgãos reprodutores, principalmente quando relacionada à avaliação da toxicidade reprodutiva. No sistema reprodutor masculino, a redução do peso desses órgãos, como os testículos, epidídimos e vesícula seminal, que pode estar associada à diminuição da fertilidade, é considerada um critério essencial para a identificação de substâncias tóxicas. Essas alterações podem, junto com outros fatores associados, indicar a presença de exposição a agentes tóxicos e interferir na atividade reprodutiva (Reboredo *et al.* 2007; Silva 2017).

Tabela 1. Peso corporal final dos ratos e peso dos órgãos reprodutivos.

Parâmetros	TLO	Controle	Naive
Peso final (g)	355,90±11,18	361,1±5,76	380,5±6,44
Próstata ventral (mg)	361,90±51,20	389±64,06	265,3±49,50
Próstata ventral relativa (mg/100g)	98,73±14,24	106,20±17,64	69,44±12,35
Testículo (g)	1,42±0,03	1,50±0,06	1,44±0,07
Testículo relativo (mg/100g)	384,70±9,15	409,90±20,21	377,00±13,85
Epidídimo (mg)	238,3±48,57	169,5±5,75	190,5±9,70
Epidídimo relativo (mg/100g)	64,61±13,04	46,32±1,54	50,03±2,19
Vesícula seminal cheia (g)	1,12±0,09	0,97±0,05	1,13±0,10
Vesícula seminal cheia relativa (mg/100g)	330,30±24,13	265,40±16,45	296,20±24,41
Vesícula seminal vazia (mg)	623,3±56,76	526,4±19,98	617,8±57,72
Vesícula seminal vazia relativa (mg/100g)	169,00±14,90	144,10±6,57	161,90±13,75

Valores expressos como média ± desvio padrão da média, $p > 0,05$. Teste de análise da variância - ANOVA com Dunnet a *posteriori*.

O presente estudo não verificou diferenças no peso corporal final entre os grupos do experimento, com todos valores $p > 0,05$ pela análise estatística, conforme exibido na Tabela 1, indicando que o tratamento com o extrato de *L. operculata* (*L.*) *Cogn* pelo tempo estabelecido neste estudo, não exerce influência sobre a massa corpórea e não apresenta capacidade de atuar como inibidor de apetite. Além disso, também não foram observadas diferenças significativas entre os pesos dos órgãos reprodutivos entre os animais do grupo TLO com os demais grupos. No entanto, os achados deste estudo não estão em concordância com os resultados de Alves *et al.* (2018), mesmo utilizando a mesma dosagem e tempo de administração, os quais demonstraram em sua pesquisa efeitos positivos quanto à toxicidade da *Luffa operculata* (*L.*) *Cogn* sobre o peso testicular e o peso relativo dos animais tratados, evidenciando aumentos significativos em comparação com o grupo controle.

Mesmo com os resultados anteriores, foi observada uma redução na contagem espermática testicular, tanto em relação à produção diária de espermatozoides quanto à contagem de espermátides maduras, quando comparados aos grupos não expostos ao extrato de *L. operculata* (Tabela 2). Entretanto, no que diz respeito à contagem epididimária, apesar de uma redução significativa ter sido observada na região da cabeça/corpo, o trânsito diário de espermatozoides não demonstrou alteração. Por outro lado, na região da cauda epididimária, observou-se uma diminuição na contagem de espermatozoides, o que conseqüentemente influenciou o trânsito espermático nessa parte do órgão, sendo este mais elevado nos ratos submetidos ao tratamento com ELO, o que pode ocasionar problemas a integridade e funcionalidade dos espermatozoides por meio da exposição prolongada às condições desfavoráveis, bem como aumento de oxidação e estresse oxidativo.

Tabela 2. Avaliação da produção diária de espermatozoides e trânsito espermático diário.

Parâmetros	TLO	Controle	Naive
<i>Contagem espermática testicular</i>			
Espermátides maduras (x10⁶/test)	82,13±5,47AB	148,8±6,49	135,3±7,89
Espermátides maduras (x10⁶/g/test)	59,68±8,89AB	125,30±13,46	149,10±39,73
Produção espermática (x10⁶/test/ diário)	13,46±0,90AB	24,39±1,06	22,18±1,29
Produção espermática (x10⁶/test/g/diário)	9,78±1,46AB	20,54±2,21	24,44±6,51
<i>Contagem de espermatozoides epididimários</i>			
<i>Cabeça/corpo</i>			
Número de espermatozoides (x10⁶/órgão)	67,51±7,83AB	113,90±6,09	140,30±17,36
Trânsito espermático (dias)	5,21±0,86	4,67±0,17	6,68±1,35
<i>Cauda</i>			
Número de espermatozoides (x10⁶/órgão)	150,60±10,25AB	198,30±10,01	246,10±14,85
Trânsito espermático (dias)	12,22±1,67AB	8,26±0,67	09,39±1,23

Valores expressos como média ± desvio padrão da média, A = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. B = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Naive. Teste de análise da variância - ANOVA com Dunnet *a posteriori*.

Segundo Dua e Vaidya (1996), uma diminuição na contagem de espermatozoides pode afetar significativamente a qualidade da composição seminal, não apenas pela quantidade, mas também interferindo em sua morfologia e motilidade. Ademais, embora os pesos dos órgãos não tenham apresentado alterações, a possibilidade de danos nos gametas não podem ser descartadas, o que torna necessário análises morfológicas e funcionais, por meio da relação estrutura-função associada a contagem espermática.

Da mesma forma, uma produção diária mais rápida pode resultar em espermatozoides imaturos e de qualidade inferior, levando a uma seleção inadequada, permitindo que aqueles com problemas genéticos ou morfológicos sejam ejaculados. Por outro lado, uma produção mais lenta, conforme evidenciado pelos resultados dessa pesquisa, pode resultar em uma contagem espermática reduzida, igualmente demonstrada nesses resultados, sendo essas variáveis possivelmente influenciadas por má formação dos túbulos seminíferos uma vez que são intrinsecamente relacionadas pela formação de espermátides imaturas, acarretando também em dificuldades funcionais e morfológicas (Dallegrave 2003).

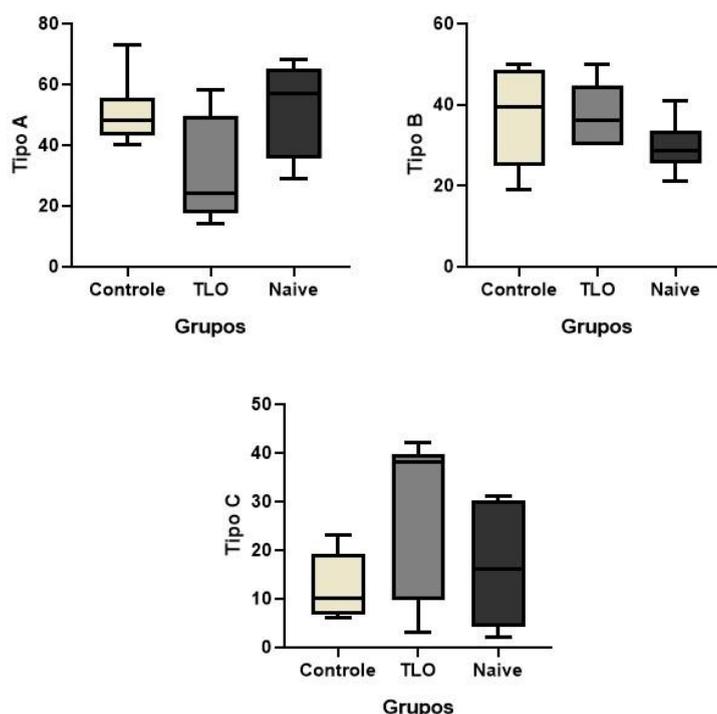


Figura 1. Motilidade espermática. Valores expressos como mediana (1° quartil -3° quartil), $p > 0,05$. Tipo A= Móvel com trajeto progressivo. Tipo B= Móvel com trajeto não progressivo. Tipo C = Imóvel. Teste de análise da variância - ANOVA com Dunnet *a posteriori*.

Independentemente da Tabela 2, as análises gráficas da Figura 1 mostram que não houve diferenças na motilidade espermática do grupo de ratos tratados com ELO e os grupos de ratos não tratados ou tratados apenas com soro. Logo, embora constatado uma diminuição numérica, a capacidade de movimento dos espermatozoides foi preservada.

Tabela 3. Avaliação das características morfológicas dos espermatozoides.

Parâmetros	TLO	Controle	Naive
espermatozoides normais (%)	96,00 (82,75-106,50)	105,00 (98,75-108,00)	107,00 (98,25-114,80)
<i>espermatozoides anormais (%)</i>			
Anomalias de cabeça	4,00 (2,23-8,25)	2,00 (0,75-3,50)	2,00 (0,00-3,00)
Anomalias da cauda	93,50 (88,75-100,00)	100,50 (90,50-114,00)	92,50 (89,25-99,25)
Gota citoplasmática	136,00 (92,25-161,00)	58,50 (49,75-89,50)	78,00 (53,75-120,30)

Valores expressos como mediana (1° quartil -3° quartil), $p > 0,05$. Teste de análise da variância - ANOVA com Dunnet *a posteriori*.

Os dados da Tabela 3 não exibiram alterações significativas para nenhum dos grupos, em relação à análise morfológica, ou seja, assumindo que as estruturas físicas dos espermatozoides avaliados não foram afetados pela exposição ao extrato aquoso

de *L. operculata* (L.) Cogn, seja por meio de anomalias de cabeça, cauda ou pela presença de gotas citoplasmáticas, que poderiam causar dificuldades na movimentação desses espermatozoides. Esse resultado era esperado em decorrência do curto período de tratamento, não sendo o necessário para completar um ciclo espermático, que dura em média 54 a 56 dias em ratos Wistar, tempo necessário para formação das espermatogônias e liberação dos espermatozoides maduros. Além disso, conforme Fernandez *et al.* (2008), existe uma maior probabilidade de comprometimento à motilidade e a morfologia dos espermatozoides quando há uma redução no tempo de trânsito dos espermatozoides. No caso deste estudo, foi observado um aumento no tempo de trânsito, reforçando essa afirmação.

Outras plantas da família *Cucurbitaceae*, mesma família da planta em estudo, também foram objeto de pesquisas sobre sua toxicidade, revelando reduções na contagem espermática, produção diária e aumento do trânsito de espermatozoides, porém com impactos na motilidade e morfologia espermática. Por exemplo, o estudo de Pusuloori *et al.* (2017) que examinou o extrato etanólico de *Momordica dioica*, demonstrou resultados semelhantes para a contagem espermática, no entanto, eles também observaram diferenças nos aspectos morfológicos e funcionais, indo em desacordo com os achados deste trabalho. Da mesma forma, a pesquisa de Irisappan e Annamalai (2018) com o extrato hidroalcoólico do caule e folha de *Ecballium elaterium*, mostrou resultados parcialmente divergentes em relação aos encontrados neste trabalho, uma vez que os autores relataram redução não somente na contagem espermática mas também na motilidade dos ratos tratados com extrato.

Uma contagem espermática baixa, ainda que sem anormalidades na morfologia e motilidade, pode estar associada a disfunções testiculares, indicando problemas na produção e maturação dos espermatozoides, que se refletem pela alteração da estrutura dos túbulos seminíferos, afetando as células germinativas e sua organização, principalmente quando há presença excessiva de células acidófilas, vacuolizadas, multinucleadas, entre outras (Carvalho 2009). Diante disso, são necessárias análises histológicas dos testículos para garantir a integridade dos tecidos e a influência dessa variável em outros parâmetros.

Tabela 4. Análise histológica dos testículos.

Parâmetros	TLO	Controle	Naive
Células normais	82,00 (75,50-88,50)	77,00 (68,00-87,50)	87,00 (76,00-87,00)
Células acidófilas	13,00 (8,00-15,50)	11,00 (6,60-19,00)	11,00 (8,00-11,50)
Células com vacuolização	5,00 (3,50-9,00)	7,00 (2,75-12,75)	6,00 (3,00-12,50)

Valores expressos como mediana (1° quartil -3° quartil), $p > 0,05$. Teste de análise da variância - ANOVA com Dunnet a posteriori.

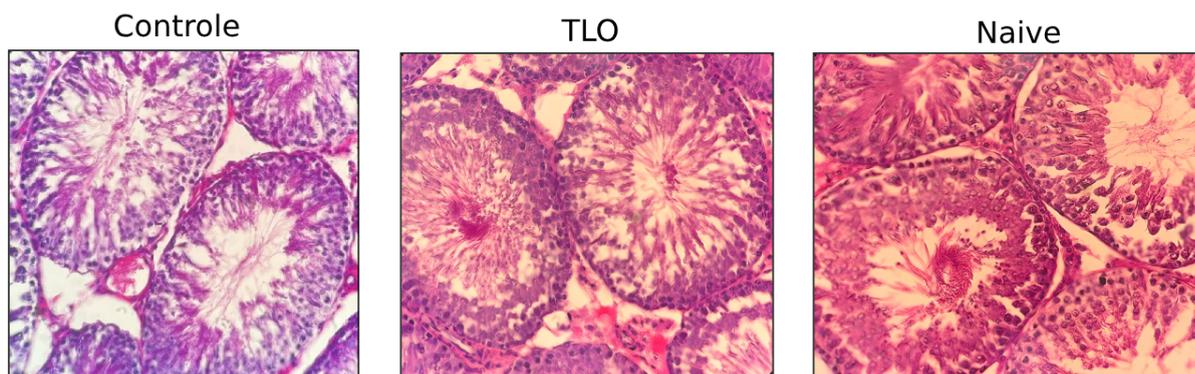


Figura 2. Microscopia histológica testicular dos grupos experimentais. Aumento de 400x.

Neste estudo, não foram identificadas anormalidades na histologia de nenhum dos grupos experimentais, conforme demonstrado na Tabela 4 e Figura 2. Não se constatou aumento de células acidófilas ou presença de vacuolizações, os achados histológicos quando encontrados sugerem potencial morte celular das células germinativas e susceptibilidade a alterações derivadas da exposição a níveis elevados de agentes tóxicos. Esses achados contrastam com os resultados obtidos por Alves *et al.* (2018), cujo estudo evidenciou alterações de natureza significativa, tanto em nível macroscópico quanto microscópico na estrutura tecidual dos testículos dos ratos tratados com extrato, onde houve uma diminuição do parênquima dos túbulos seminíferos dos ratos que receberam o extrato de *L. operculata* (L.) Cogn.

5. Conclusão

Apesar dos resultados terem mostrado uma redução na contagem e produção espermática, bem como aumento do trânsito diário, não é possível afirmar que o extrato aquoso de *L. operculata* (L.) Cogn promova algum efeito deletério na fertilidade masculina. Diante da lacuna de informações substanciais em relação ao sistema reprodutor masculino, fica evidente a necessidade de futuras pesquisas que se dediquem a avaliar de maneira prolongada os efeitos deletérios potenciais desta planta.

6. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

Aguwa, C. N.; Mittal, G. C. Abortifacient effects of the roots of *Momordica angustispala*. J. Ethnopharmacol., v.7, n.2, p.169-173, 1983.Brasil.

Alves, C. S.; Frias, H. V.; Kirsten, T. B.; *et al.* *Luffa operculata* fruit aqueous extract induces motor impairments, anxiety-like behavior, and testis damage in rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 222, p. 52–60, 2018.

Barilli, S. L. S.; Santos, S.T.; Montanari, T. An experimental investigation on *Luffa operculata* (L.) Cogn. (buchinha-do-norte) as abortifacient plant. ReprodClim22(4):165-168, 2007.

Caribé, R. A. Abordagem da atividade biológica do extrato de *Luffa operculata* Cogn (Cucurbitaceae). Recife: O Autor, 2008.

Carvalho, Fabíola de Araújo Resende. Testicular morphology and morphometry in mice chronically exposed to arsenic. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

Cechinel, V. Fitoterapia avançada: uma abordagem química, biológica e nutricional. Porto Alegre : Artmed, 2020.

Dallegrave, Eliane. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup em ratos Wistar. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup em ratos Wistar. 2003. 200 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

Dua AA, Vaidya S R. Sperm motility and morphology as changing parameters linked to sperm count variations. J Postgrad Med 1996;42:93

Fernandez, C. D., Porto, E. M., Arena, A. C., & Kempinas, W.deG. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International journal of andrology*, 31(4), 427–437.

Filler, R. Male reproductive toxicology. 1993. 334-43 p.

Foley, G. L. Overview of male reproductive pathology. Toxicologic pathology. 2001;29(1):49-63.

Irisappan, Sarath; Annamalai, Jayakumar. (2018). International Journal of Medicine and Pharmaceutical Research Male Antifertility Activity of Hydro-Alcoholic Stem and Leaf Extracts of Ecballium Elaterium on Male Wistar Rats. 253-255.

Lanini, J.; Duarte-Almeida, J. M.; Nappo, S.; Carlini, Elisaldo A. “O que vem da terra não faz mal”: relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 1a, p. 121–129, 2009.

Menon-Miyake, M. A.; Saldiva, P. H. N.; Lorenzi-Filho, G.; *et al.* Efeitos da *Luffa operculata* sobre o epitélio do palato de rã: aspectos histológicos. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 71, n. 2, p. 132–138, 2005.

Mendieta, M. C; Souza, A. D. Z.; Ceolin, S.; Ferreira, Marcelo Alves; Ossamu, Butugan; Oliveira, Regiani Carvalho. Plantas tóxicas: importância do conhecimento para realização da educação em saúde. Rev Enferm UFPE on line., Recife, 8(3):680-6, mar., 2014.

Miró, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytother Res* 9: 159-168, 1995.

Monteiro, S. C.; Brandelli, C. L. C. Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Pusuloori R, Radhika P, Vangoori Y. Evaluation of Effect of *Momordica Dioica* Extract on Reproductive System of Male and Female Rats. Biomed Pharmacol J 2017;10(3).

Reboredo, M. M.; Lucinda, L. M.F.; Rocha, C. B; Queiroz, G. T.; Faria, V. C.; Vieira, V. A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no

sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de fora, v. 26, n 1/2, p. 11-17, 2007.

Revilla, J., 2002. Plantas úteis da bacia Amazônica 1. INPA/SEBRAE, Manaus, pp. 391.

Robb, G.W.; Amann, R.P.; Killian, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. Journal of reproduction and fertility. 1978;54(1):103-7.

Rodrigues, H.G; Meireles, C.G; Lima, J.T.S; Toledo, G.P; Cardoso, J.L; Gomes, S.L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 13, n. 3, p. 359–366, 2011.

Russell, L. D., Ren, H. P., Sinha Hikim, I., Schulze, W., & Sinha Hikim, A. P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. The American journal of anatomy. 1990;188(1):21-30.

Saad, G. A.; Léda, P. H. O.; SÁ, I. M.; Seixlack, Antonio Carlos C. Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica - 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

Salviano, P. A. Tratamento de sinusite com preparação contendo *Luffa operculata* e solução fisiológica. Rev. Bras. Med., v. 49, n. 9, 1992.

Scalia, R. A., Dolci, J. E., Ueda, S. M., & Sassagawa, S. M. In vitro antimicrobial activity of *Luffa operculata*. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, v. 81, n. 4, p. 422–430, 2015.

Seed, J., Chapin, R. E., Clegg, E. D., Dostal, L. A., Foote, R. H., Hurtt, M. E., Klinefelter, G. R., Makris, S. L., Perreault, S. D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K. A., Veeramachaneni, D. N., & Wise, L. D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. Reproductive toxicology. 1996;10(3):237-44.

Silva, L., Costa, H. O., Souza, F. C., Lopes, E. M., & Ueda, S. M. Preclinical evaluation of *Luffa operculata* Cogn. and its main active principle in the treatment of bacterial rhinosinusitis. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, v. 84, n. 1, p. 82–88, 2018.

Silva, Neila Augusta Alves. Efeito da suplementação com extrato alcóolico das diferentes partes da melancia (*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM. & NAKAI.) e da L-citrulina sobre os testículos de camundongos suíços adultos. 2017. 39 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

Turolla, Monica Silva; Nascimento, Elizabeth Souza. R. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, n. 2, 2006.

Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C. ; Maciel, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

Wallach, E., Macleod, J., & Wang, Y. (1979). Male Fertility Potential in Terms of Semen Quality: A Review of the Past a Study of the Present. *Fertility and Sterility*, 31(2), 103–116.

ANEXOS

25/08/2023, 17:23

Submissões | Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science

(http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/fronteiras/about/submissions#author_guidelines).

✓ **AUTORIA:** Todos os autores deverão ser cadastrados no sistema, informando, obrigatoriamente: Nome completo, e-mail, ORCID, sua titulação e a instituição onde obteve o título, vínculo institucional completo contendo instituição, função, cidade e país.

✓ **ANEXO 1:** Texto do manuscrito, em docx, sem qualquer identificação dos autores, instituição de vínculo ou agências de fomento.

✓ **ANEXO 2:** Identificação dos autores e demais comentários: Para cada autor, nome completo, e-mail, ORCID, sua titulação e a instituição onde obteve o título, vínculo institucional completo contendo instituição, função, cidade, país. Incluir, quando aplicável, os agradecimentos e agências de fomento. Quaisquer outras informações que os autores julgarem necessárias para conhecimento dos editores.

✓ **ANEXO 3:** Indicação de 03 pareceristas sem conflitos de interesse com o trabalho submetido: Nome Completo, E-Mail, justificativa para a indicação, e Currículo On-line (ou página de vínculo Institucional).

✓ **ANEXO 4:** Imagens constantes no trabalho: arquivo jpg/300 dpi (apresentar, se necessário, a autorização de uso das imagens).

Diretrizes para Autores

DIRETRIZES GERAIS

- Antes da submissão, o autor deve estar ciente do [Foco, Escopo e Processo Editorial](#) de Fronteiras.
- As submissões na Revista Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science devem ser realizadas através do sistema e seguir as seguintes especificações:
 - O texto poderá estar em Português, Espanhol, Francês ou Inglês. Textos em Português, Espanhol ou Francês devem conter, também, título e resumo em inglês. Textos em inglês devem conter, também título e resumo em português.
 - O trabalho deve ser original e inédito, e não se encontrar sob revisão de outros periódicos. Casos especiais devem ser informados.

- Para submissão de manuscritos é necessário que o(s) autor(es) seja(m):
 - Para submissões até 31/01/2019:
 - mestre(es) ou
 - mestrando(s) em co-autoria com mestre(s).
 - Para submissões a partir de 01/02/2019:
 - doutor(es) ou
 - doutorando(s) em co-autoria com doutor(es).
 - doutorando(s) sem necessidade de co-autoria, apenas para submissão de *Book Reviews*
 - Para submissões a partir de 01/12/2019:
 - O autor principal deve ser doutor.
 - Para submissões a partir de 01/05/2020:
 - Ao menos um dos autores deve possuir título de doutor.
- No momento da submissão deverá ser informado para todos os autores, obrigatoriamente e através da inclusão na plataforma: nome completo, e-mail, ORCID, sua titulação e a instituição onde obteve o título, vínculo institucional completo contendo instituição, função, cidade, país.
- O envio dos manuscritos, inclusive os arquivos corrigidos após as revisões da etapa de avaliação, deverá ser realizado via plataforma digital da Fronteiras.

TIPOS DE TRABALHOS E SUAS ESPECIFICIDADES

- **ARTIGOS**
 - Textos originais resultantes de pesquisa avançada ou reflexão teórica.
 - Mínimo de 5000 e máximo de 10.000 palavras, incluindo notas de rodapé.
- **NOTAS TÉCNICAS, PEDAGÓGICAS OU CIENTÍFICAS**
 - Comunicações sobre experiências de ensino em Ciências Sociais, Tecnológicas, Ambientais ou da Saúde.
 - Máximo de 2.000 palavras, incluindo notas de rodapé.
- **BOOK REVIEWS**
 - Enfoque em livros publicados nos últimos três anos.
 - Não deve ser apenas uma descrição sequencial, mas sim uma análise crítica da obra e sua relação com outros trabalhos.
 - Deve conter título próprio e citação de referências que dialogam com o livro principal.
 - Máximo de 1.000 palavras.
- **ENTREVISTAS**
 - Efetuadas pelos Editores e Conselho Editorial

FORMATAÇÃO

- **TÍTULO**
 - Texto em Português, Espanhol ou Francês, deve conter, também, título em inglês.
 - Texto em Inglês deve conter, também, título em Português
- **PALAVRAS-CHAVE**
 - Entre 3 a 5 palavras-chave separadas por ponto e vírgula (;)
 - Texto em Português, Espanhol ou Francês, deve conter palavras-chave no idioma do texto e em inglês.
 - Texto em Inglês deve conter palavras-chave em inglês e em português.
- **RESUMO**
 - Entre 150 a 300 palavras no idioma do texto.

- Texto em Português, Espanhol ou Francês deve conter resumo no idioma do texto e em inglês.
- Texto em Inglês deve conter resumo em inglês e em português.
- **VISUAL**
 - Corpo do Texto: Letra Arial tamanho 12, espaçamento simples entre linhas, espaçamento duplo entre parágrafos.
 - Títulos e Subtítulos: Devem ser numerados seqüencialmente, indicando as seções. Letra Arial tamanho 12.
 - Resumos e notas de rodapé: Letra Arial tamanho 10, espaçamento simples entre linhas.
 - Citações diretas com mais de 3 linhas: Letra Arial tamanho 10, recuo de 4cm no parágrafo, espaçamento duplo entre parágrafos.
- **CITAÇÕES**
 - No caso de um único autor:
 - Pereira (1991) ou (Pereira 1991)
 - No caso de dois autores:
 - Pereira e Silva (1992) ou (Pereira & Silva 1992)
 - No caso em que mais de dois autores são citados, apenas o primeiro deve ser mencionado:
 - Pereira et al. (1993) ou (Pereira et al. 1993).
- **REFERÊNCIAS**
 - Todas as referências devem ser precisas e apenas citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados não devem ser citados a não ser que já tenha sido aceito para publicação. Neste caso, deve ser referido como "in press". Resultados não publicados devem ser citados como "unpublished observations". As referências devem ser colocadas no final do manuscrito, em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.
 - Formatação das Referências:
 - Artigo de Periódico: Baptista L, Pfeifer R, da Silva EC, Arbilla G 2011. Kinetics and thermodynamics of limonene ozonolysis. *J Phys Chem A* 115(40):10911-10919.
 - Livros: Cruz AL 1996. *Biodiversidade e Conservação*. Vol. XI, Edgard Blucher, Rio de Janeiro, 343 pp.
 - Teses: Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.
 - Capítulo em Livro: Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross. *The Prevention of Malaria*. John Murray, London, p. 390-398.
 - Artigo da Internet: Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>
 - Monografia na Internet: Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.
 - Homepage/Web site: Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.
 - Parte de uma homepage/Web site: American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited

2002 Aug 12]. *AMA Office of Group Practice Liaison*; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

- Bases de Dados na Internet:
 - Base de dados aberta: *Who's Certified* [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>
 - Base de dados fechada: Jablonski S. *Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes* [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html
 - Parte de uma base de dados: *MeSH Browser* [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005
- Fronteiras utiliza um padrão "autor, data" adaptado de [Chicago Manual of Style](#)

ARQUIVOS PARA SUBMISSÃO

- Durante a submissão deverão ser anexados os seguintes arquivos:
 - Texto do manuscrito, em docx, sem qualquer identificação dos autores, instituição de vínculo ou agências de fomento.
 - Identificação dos autores e demais comentários: Para cada autor, e-mail, ORCID, sua titulação e a instituição onde obteve o título, vínculo institucional completo contendo instituição, função, cidade, país. Incluir, quando aplicável, os agradecimentos e agências de fomento. Quaisquer outras informações que os autores julgarem necessárias para conhecimento dos editores.
 - Indicação de 03 pareceristas sem conflitos de interesse com o trabalho submetido: Nome Completo, E-Mail, justificativa para a indicação, e Currículo On-line (ou página de vínculo Institucional)
 - Imagens constantes no trabalho: arquivo jpg/300 dpi (apresentar, se necessário, a autorização de uso das imagens)

Declaração de Direito Autoral

Esta revista oferece acesso livre imediato ao seu conteúdo, seguindo o princípio de que disponibilizar gratuitamente o conhecimento científico ao público proporciona maior democratização mundial do conhecimento.

A partir da publicação realizada na revista os autores possuem copyright e direitos de publicação de seus artigos sem restrições.

A Revista *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science* segue os preceitos legais da licença [Creative Commons - Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional](#). 