

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

KAROLINE DAYNEZ MISSON

**AVALIAÇÃO DA REGULARIDADE DAS FASES
DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS
FÊMEAS SUBMETIDAS AO USO DIÁRIO DE
EXTRATO DE *Momordica charantia* L.**

BAURU
2016

KAROLINE DAYNEZ MISSON

**AVALIAÇÃO DA REGULARIDADE DAS FASES
DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS
FÊMEAS SUBMETIDAS AO USO DIÁRIO DE
EXTRATO DE *Momordica charantia* L.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Ms. Márcia Clélia Leite Marcellino

BAURU
2016

Misson, Karoline Daynez

M67869a

Avaliação da regularidade das fases do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas submetidas ao uso diário de extrato de *Momordica charantia* L. / Karoline Daynez Misson. -- 2016.

42f. : il.

Orientadora: Profa. M.^a Marcia Clelia Leite Marcellino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
- Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. *Momordica charantia* L. 2. Fertilidade. 3. Ciclo estral. 4. Análise histológica. I. Marcelino, Marcia Clelia Leite. II. Título.

KAROLINE DAYNEZ MISSON

**AVALIAÇÃO DA REGULARIDADE DAS FASES
DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS
FÊMEAS SUBMETIDAS AO USO DIÁRIO DE EXTRATO DE
Momordica charantia L.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Ms. Márcia Clélia Leite Marcellino.

Banca examinadora:

Profa. M.^a Marcia Clelia Leite Marcellino
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Camila Buzalaf
Universidade do Sagrado Coração

Prof. M.e Fernando Tozze Alves Neves
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 30 de novembro de 2016.

Dedico este trabalho à minha família e a todos que apoiaram e me incentivaram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela capacidade de realizar este trabalho.

À minha família, pelo apoio, incentivo e oportunidade de estar frequentando a universidade.

À minha orientadora, Prof^ª Ms Marcia Clélia Leite Marcellino, pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho, bem como por toda ajuda, paciência e carinho durante toda a pesquisa.

Aos funcionários do biotério, Alexandre e Dayvid, pelo suporte e ajuda com os animais.

Às funcionárias do laboratório de microscopia, Fabiane e Lígia, pelo carinho, paciência e ajuda.

À Mayra, do laboratório de histologia, por compartilhar seu conhecimento e por toda ajuda durante a pesquisa.

Ao Prof^º Ms. Fernando Tozze Alves Neves, pela ajuda com o preparo dos extratos para a pesquisa.

Ao meu grande amigo, Bruno Campos, pela paciência e ajuda com a informática.

A todos os amigos e amigas que apoiaram, incentivaram, tiveram paciência de escutar desabafos e que permaneceram ao meu lado.

À minha psicóloga, Jacqueline Souza, que me ajudou a superar inúmeras dificuldades, pela sua disposição, e pelo seu carinho.

À vida de todos os animais utilizados nesta pesquisa, que contribuíram para novos conhecimentos e resultados significantes para a ciência.

A todos que contribuíram e me ajudaram nesta etapa, muito obrigada!

“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros. ”

(Wim Wenders)

RESUMO

A contracepção por meio de fármacos de via oral é comumente utilizada pelas mulheres a fim de evitar a gravidez. No entanto, estes causam inúmeros efeitos adversos, aumentando assim a busca por métodos alternativos, como a base de espécies vegetais. O objetivo do presente estudo foi investigar a regularidade do ciclo estral de camundongos suíços submetidos ao consumo dos extratos dos frutos e das sementes da *Momordica charantia* L. Foram utilizados 30 camundongos suíços, fêmeas e adultas, divididas em 3 grupos de experimentos (Controle, Frutos e Sementes). A administração dos extratos foi feita por 21 dias, por gavagem. Diariamente foi realizado o exame de esfregaço vaginal para determinação das fases do ciclo estral. No final do experimento, foi feita a remoção do útero para realização da biometria da sua largura; e do ovário esquerdo, para confecção de lâminas histológicas e posterior contagem dos corpos lúteos. A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca para dosagem dos hormônios ovarianos estradiol e progesterona. Foi evidenciada a diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$ - Teste T-Student) na média da largura dos cornos uterinos dos animais do grupo sementes; ocorreu redução significativa dos níveis séricos de progesterona dos animais do grupo sementes e aumento significativo dos níveis séricos de estradiol dos animais do grupo frutos; no grupo frutos e sementes houve aumento significativo na ocorrência da fase metaestro, sendo observada no grupo frutos a redução significativa da fase diestro e no grupo sementes a redução da fase estro; não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa do número de corpos lúteos entre os grupos tratados com os frutos e sementes da *Momordica charantia* L., respectivamente, em relação ao grupo controle. O extrato dos frutos da *Momordica charantia* L. promoveu aumento significativo do hormônio estradiol e alterações significativas na ocorrência das fases metaestro e diestro sugerindo que compostos triterpênicos dos frutos da *Momordica charantia* L. apresentem funções alterações quanto ao efeito estrogênico. Devido à redução na largura dos cornos uterinos, diminuição dos níveis de progesterona e redução da ocorrência da fase estro provocadas pelo extrato de sementes da *Momordica charantia* L., sugere-se que esta parte da planta apresenta possível capacidade de interferir na fertilidade dos animais tratados.

Palavras-chave: *Momordica charantia*. Fertilidade. Ciclo estral. Análise histológica.

ABSTRACT

The contraception by orally drug is commonly used by women to prevent pregnancy. However, these cause many side effects, thus increasing the search for alternative methods based on plant species. The purpose of this study was to investigate the regularity of the estrous cycle of Swiss mice submitted to the consumption of extracts of fruits and seeds of *Momordica charantia*. It was used a total of 30 Swiss mice, females and adults, and were divided into 3 groups of experiments (control, fruits and seeds). Administration of the extracts was taken for 21 days by gavage. Every day the animals has been submitted for vaginal smears to determine the phases of the estrous cycle. At the end of the experiment, the uterus was removed to perform its biometric width; and left ovary, for making histologic slides and subsequent counting of corpora lutea. A blood sample was taken by cardiac puncture for dosing estradiol and progesterone. A statistically significant decrease was observed ($p < 0.05$ -T-Student test) on the average width of the uterine horns of the animals of seeds group. There was a significant reduction in serum progesterone levels of the animals of seeds group and significant increase in serum estradiol levels of animals of fruits group; in fruits and seeds group there was a significant increase in the occurrence of metestrus phase and was observed in the fruits group a significant reduction in diestrus phase and in seeds group the reduction of the estrus phase; there was no evidence of a statistically significant difference in the number of corpora lutea between the groups treated with the fruits and seeds of *Momordica charantia* L., respectively, compared to the control group. The extract of the fruits of *Momordica charantia* L. promoted significant increase in estradiol hormone and significant changes in the occurrence of phases metaestrus and diestrus suggesting that triterpenic compounds of the fruits of *Momordica charantia* L. present similar functions and /or antagonistic to estrogen. Due to the reduction in the width of the uterine horns, decreased levels of progesterone and a reduction of the occurrence of the estrus phase caused by the seeds extract of *Momordica charantia* L., it is suggested that this part of the plant has a possible capacity of step in with fertility of animals treated.

Key-words: *Momordica charantia*. Fertility. Estrous cycle. Histological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Melão-de-são-caetano (<i>Momordica charantia</i> L.).....	12
Figura 2 – Esfregaços vaginais de roedores	14
Figura 3 – Sequencia da transformação da planta in natura em droga vegetal e processo de maceração.....	18
Figura 4 – Preparo dos extratos para início da administração.....	19
Figura 5 – Esfregaço vaginal.....	20
Figura 6 – Etapas da secção dos cornos uterinos, sua biometria e processamento do sangue.	21
Figura 7 – Corte com lâmina na linha pontilhada, separando cornos uterinos dos ovários.	22
Figura 8 – Inclusão na parafina.	23
Figura 9 – Bloco contendo os ovários no micrótomo.....	24
Figura 10 – Filtração de corante Hematoxilina (A) e eosina (B).	24
Figura 11 – Processo de coloração de lâminas.....	25
Figura 12 – Fixação da lamínula.....	27
Figura 13 – Médias da largura dos cornos uterinos dos grupos de experimento. Teste T-Student, $p < 0,05$. * Valores estatisticamente significativos.....	28
Figura 14 – Comparação das médias obtidas quanto aos níveis de progesterona e estradiol em ambos os grupos.....	29
Figura 15 – Comparação da ocorrência das fases do ciclo estral durante 21 dias de experimento.....	31
Figura 16 – Corte longitudinal do ovário esquerdo do camundongo suíço. C: Corpo lúteo. Aumento 40X. Coloração: HE.....	33
Figura 17 – Média de corpos lúteos observados em microscopia eletrônica de ambos os grupos de experimento.	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 AMOSTRAGEM.....	16
3.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	16
3.3 ETAPAS DE PREPARAÇÃO DO EXTRATO DOS FRUTOS E SEMENTES DA <i>Momordica charantia</i> L.	17
3.3.1 Transformação da planta <i>in natura</i> em droga vegetal e maceração.....	17
3.3.2 Evaporação do solvente e padronização da dosagem dos extratos	18
3.4 DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL	19
3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA DOS OVÁRIOS E ÚTERO.....	20
3.5.1 Fixação, desidratação e diafanização	21
3.5.2 Inclusão.....	22
3.5.3 Microtomia	23
3.5.4 Coloração das lâminas.....	24
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1 BIOMETRIA DOS CORNOS UTERINOS E DOSAGEM SANGUÍNEA DE ESTRADIOL E PROGESTERONA	27
4.2 OCORRÊNCIA DAS FASES DO CICLO ESTRAL.....	31
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS CORPOS LÚTEOS.....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	41

1 INTRODUÇÃO

A contracepção consiste em métodos tradicionalmente adotados para a prevenção da gravidez e na maioria das vezes é feita através do uso de fármacos conhecidos como contraceptivos orais. Estes são classificados como anticoncepcionais isolados, compostos apenas por progestogênio; ou por contraceptivos orais combinados, formados pela associação de um estrogênio associado a um progestogênio. (RANG; DALE; FLOWER, 2007).

Inúmeros efeitos adversos são atribuídos aos contraceptivos orais. O estrogênio etinilestradiol altera fatores de coagulação predispondo a ocorrência de trombose venosa. (GIROLAMI et al., 2007). O uso de contraceptivos orais combinados aumenta o risco de acidente vascular cerebral, promove elevação da pressão arterial, aumenta o risco de infarto do miocárdio, principalmente em fumantes. Efeitos colaterais como náuseas, dores nas mamas e retenção hídrica estão correlacionados os estrogênios, enquanto que a ocorrência de acne, aumento do apetite e depressão se correlacionam ao uso do progestogênio. O uso isolado do progestogênio também desencadeia amenorreias frequentes e aumento do risco de gravidez ectópica. (WELLS et al., 2006, p. 303).

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de inúmeras doenças é tão antiga quanto à civilização humana e nos dias atuais o interesse por tratamentos alternativos a base de extratos vegetais tem crescido. (CRAGG e NEWMAN, 2013). Muitas plantas medicinais são utilizadas empiricamente com objetivo de atuarem na contracepção ou mesmo como abortivas. (FARNSWORTH et al., 1975).

A *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano) é uma espécie vegetal silvestre facilmente encontrada em áreas urbanas e rurais, sendo conhecida e utilizada por suas propriedades medicinais (RIBEIRO et al., 2004, GIRON et al., 1991; LANS e BROWN, 1998). É usada tradicionalmente na medicina caseira em países como Brasil, China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru. Todas as partes da planta, incluindo o fruto, possuem sabor amargo. O fruto é alongado e semelhante a um pepino pequeno, sendo que o fruto novo é verde e se torna alaranjado quando maduro (GROVER; YADAV, 2004).

Os frutos possuem sementes vermelhas que se destacam devido à alta concentração de licopeno, substância que pode ser utilizada como corante natural em alimentos. O melão-de-são-caetano foi utilizado durante muito tempo na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças. Há pouco tempo, diversos fitoquímicos foram identificados e demonstrados

cl clinicamente apresentando grande quantidade de atividades medicinais tais como antibiótico, antimutagênico, antioxidante, antileucêmico, antiviral, anti-diabético, antitumor, aperitivo, afrodisíaco, adstringente, carminativo, citotóxico, depurativo, hipotensivo, hipoglicêmico, imuno-modulador, inseticida, lactagogo, laxativo, purgativo, refrigerante, estomáquico, tônico, vermífugo (ASSUBAIE; EL-GARAWANY, 2004).

Figura 1 - Melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.)



Fonte: Disponível em <<http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1957829>> Acesso em 30 jun. 2015.

O uso da *Momordica charantia* como planta medicinal para o tratamento empírico do diabetes foi confirmada com experimentos onde foi possível observar que o fruto ou o extrato aquoso desta espécie vegetal apresenta potente atividade hipoglicêmica em ratos com glicemia normal e em ratos com diabetes induzida por streptozotocina, assim como em humanos portadores de diabetes mellitus do tipo II (LEATHERDALE et al., 1981; BAILEY et al., 1985; WELIHINDA et al., 1986; ALI et al., 1993).

No entanto, estudos recentes mostram que frutos e folhas do melão-de-são-caetano têm demonstrado efeito antifertilidade *in vivo* em animais fêmeas (STEPKA et al, 1974 e KOENTJORO-SOEHADI, 1982) e em machos afeta negativamente a produção de esperma (JAMWAL et al, 1962). De acordo com DUKE, 1985; GUPTA, 1995, GROVER; YADAV, 2004, a planta também é conhecida como abortiva e emenagoga. BRINKER, (2013), também afirma que *Momordica charantia* é contraindicada na gestação e lactação.

CHANG; TAM; YEUNG (1984) citam que glicoproteínas isoladas das sementes da *Momordica charantia*, conhecidas como momorcharina inibiram a proliferação celular no endométrio e miométrio e mostraram ação abortiva em camundongos. Outros estudos

realizados por LEUNG; YEUNG, (1987); AGUWA; MITTAL. (1983), GROVER; YADAV (2004), também sugerem que o extrato da *Momordica charantia* têm propriedades abortivas.

BASCH; GABARDI; ULBRICHT (2003) mencionam que a *Momordica charantia* apresenta componentes com capacidade de reduzir a fertilidade e machos e fêmeas. Apesar de estudos favoráveis ao possível efeito antifertilidade, outros estudos contradizem esta condição. NG; LI; YEUNG (1987) realizaram um estudo com os componentes beta e alfa-momorcharina e observaram que não ocorreram alterações na produção e secreção dos hormônios luteinizante (LH) e testosterona de ratos. Também não foram evidenciadas alterações histológicas nas células de Leydig situadas nos testículos.

Estudo realizados por NASEEM et al., (1998) testaram o extrato alcóolico da *Momordica charantia* na dosagem de 25 mg/ 100g do peso corporal de ratos machos, sendo evidenciado potente redução da espermatogênese.

Inúmeras interferências, inclusive plantas medicinais podem afetar a integridade do sistema reprodutor feminino. Em experimentação animal, fatores como idade, estação do ano e luminosidade podem provocar variações no ciclo estral, levando a um ciclo irregular (SIMÕES et al., 2001). Estrógenos derivados de espécies vegetais e de outras fontes têm, além de potencial terapêutico específico, potencial para causar alterações no ciclo estral dos animais, sendo, portanto, importante a avaliação desta atividade. (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2001).

Os roedores são mamíferos que apresentam ciclo estral regular, caracterizado por mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina, características facilmente observadas durante quatro a seis dias (SIMÕES, 1984).

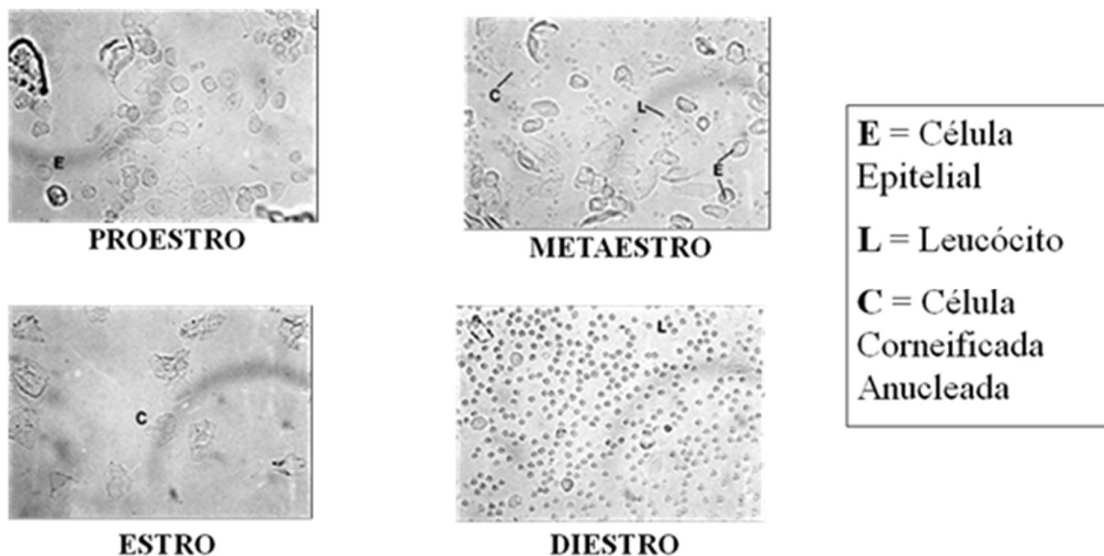
Segundo AIRES (1999), nas ratas, o ciclo hormonal dura de quatro a cinco dias e tem quatro fases, denominadas de estro, metaestro, diestro e proestro (Figura 2). MARCONDES et al. (2002) afirma que as fases do ciclo estral podem ser determinadas pelos tipos celulares observados em esfregaço vaginal.

No *proestro*, com a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) pela glândula adeno-hipófise, promoverá o crescimento dos folículos ovarianos que secretam principalmente estrógenos, promovendo a proliferação do epitélio do útero e da vagina e o edemaciamento do tecido conjuntivo subjacente. No esfregaço vaginal, são encontradas células epiteliais nucleadas e anucleadas. Essa fase tem uma duração aproximada de 15h. No *estro*, o alto nível de estrógenos provoca a queratinização do epitélio vaginal, preparando-o para o coito. Nesta fase são observadas, no esfregaço vaginal, somente células anucleadas ou corneificadas. Nessa fase, ocorre a ovulação, e a fêmea aceita o macho. O corpo lúteo é

mantido pelo hormônio luteinizante (LH) e secreta principalmente progesterona. Esse hormônio é responsável pela infiltração leucocitária do útero e da vagina. Assim, no esfregaço vaginal em *metaestro* (ou *diestro I*), são identificadas células nucleadas (epiteliais) e anucleadas (corneificadas) e leucócitos. Essa fase tem aproximadamente 14h. Os níveis elevados de progesterona também estimulam a secreção das glândulas uterinas e das células do epitélio vaginal. Um muco viscoso, além das células nucleadas e anucleadas e dos leucócitos, está presente no esfregaço em *diestro* (ou *diestro II*). Essa é a fase mais longa: 49h (MONTANARI, 2013).

Durante o ciclo estral, o útero das fêmeas domésticas sofre diversas transformações morfológicas devido à influência dos estrógenos e da progesterona. A atividade cíclica da fêmea é observada macro e microscopicamente, bem como mudanças comportamentais. Estes estágios morfológicos, funcionais e comportamentais estão diretamente relacionados ao ciclo estral (BANKS, 1991).

Figura 2 – Esfregaços vaginais de roedores



Fonte: Marcondes et al. (2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ocorrência do ciclo estral em camundongos suíços submetidos ao tratamento com extrato dos frutos e das sementes da *Momordica charantia*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Mensurar a largura dos cornos uterinos;
- ✓ Realizar a avaliação dos níveis séricos de progesterona e estradiol;
- ✓ Promover a análise histológica descritiva dos ovários após o término do tratamento;
- ✓ Quantificar microscopicamente os corpos lúteos para dedução da fertilidade dos animais em estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

A amostragem foi constituída de 30 camundongos da linhagem *Swiss*, fêmeas e com 90 dias, provindas do Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante o período experimental, os animais permaneceram acondicionados em gaiolas de polietileno, contendo cada uma 10 animais. A alimentação foi feita com ração comercial para roedores, ofertada na proporção de 100 gramas por gaiola e o fornecimento de água foi *ad libitum*. O ambiente de manutenção foi mantido com ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura entre 22 a 25°C, constantemente limpo e arejado. Durante todo o experimento, o controle, a manutenção e a observação dos animais foram executadas no Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Sagrado Coração – USC, protocolado sob o CEUA com número 5698260815.

Os animais foram submetidos a um período de teste de 5 dias para verificar se o ciclo estral era regular.

3.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram distribuídos em três grupos de experimento:

- ✓ **Grupo Controle (GC)** = durante o procedimento recebeu por gavagem 0,2 mL de solução fisiológica 0,9%, contendo metilparabeno e propilparabeno (0,5:0,5), durante 21 dias.
- ✓ **Grupo frutos *Momordica charantia* (GFMC)**= recebeu 0,2 mL de solução fisiológica 0,9% contendo os conservantes na mesma proporção do grupo controle acrescentando a este veículo o equivalente a 100 mg / kg de peso corporal (SINGH; GUPTA, 2007) do extrato bruto dos frutos da *Momordica charantia* L. A concentração foi convertida de acordo com a média de peso dos animais. A administração foi feita por gavagem, durante 21 dias.
- ✓ **Grupo sementes *Momordica charantia* (GSMC)** = recebeu 0,2 mL do mesmo veículo administrado no grupo controle, contendo o equivalente a 150 mg / kg de peso corporal (SATHISHEKAR, 2005) do extrato bruto obtido das sementes da *Momordica*

charantia L.. A concentração foi convertida de acordo com a média de peso dos animais e a administração foi feita por gavagem, durante 21 dias.

3.3 ETAPAS DE PREPARAÇÃO DO EXTRATO DOS FRUTOS E SEMENTES DA *Momordica charantia* L.

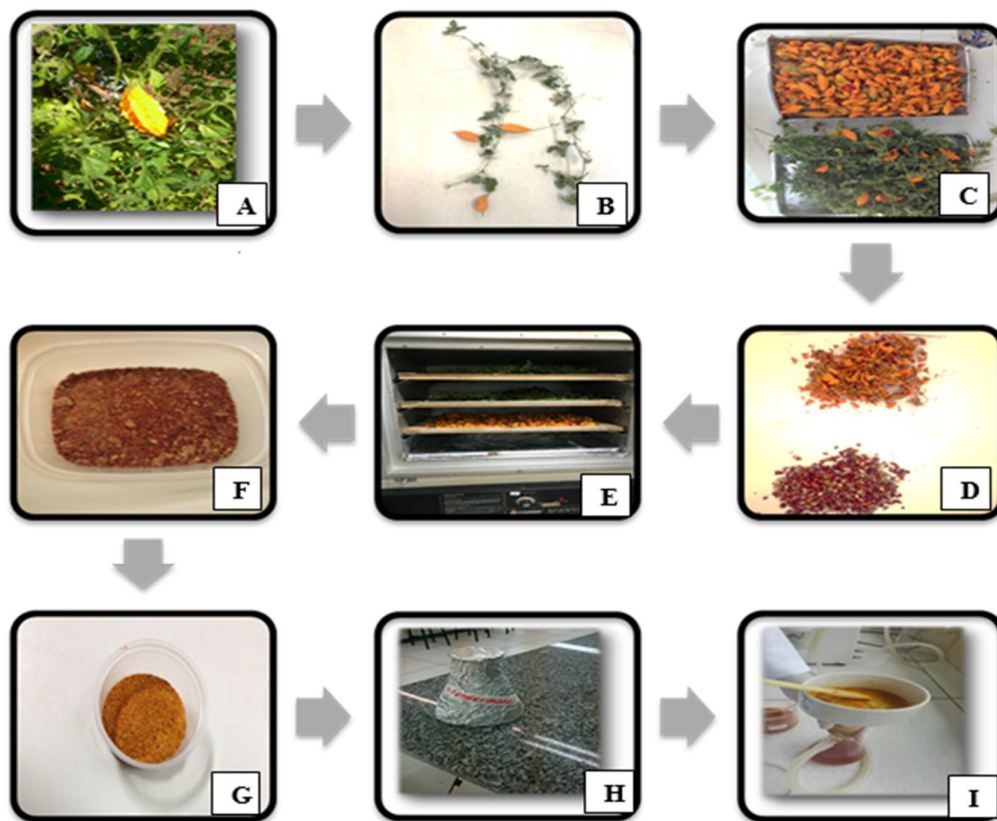
3.3.1 Transformação da planta *in natura* em droga vegetal e maceração.

A *Momordica charantia* L. foi obtida numa propriedade rural na cidade de Bauru. A planta foi coletada em setembro de 2015. A identificação botânica foi feita no Herbário da Universidade do Sagrado Coração, tendo o número de registro: 5588 (Anexo B)

Foi feita a seleção das partes da planta, sendo separados os frutos das sementes. Em seguida ambos (frutos e sementes) foram colocados em bandejas específicas para alimentos, respectivamente. As bandejas foram colocadas em estufa com circulação de ar numa temperatura de 40°C. A secagem foi realizada num período de 3 dias. Posteriormente, as partes secas foram pulverizadas por turbólise, completando a transformação da planta *in natura* em droga vegetal.

O macerado foi feito com álcool 70° (85mL) misturado a 10 gramas das sementes e dos frutos secos e pulverizados. O período de maceração foi realizado em 21 dias, sendo que diariamente foi feita a homogeneização dos respectivos macerados (frutos e sementes). Finalizado o período de 21 dias, os respectivos macerados foram filtrados a vácuo. A sequência do procedimento encontra-se na figura 3.

Figura 3 – Sequencia da transformação da planta in natura em droga vegetal e processo de maceração. A- Planta in natura; B- Identificação botânica; C e D- Separação das sementes e dos frutos; E- Secagem em estufa com circulação de ar a 40°C; F- Sementes pulverizadas; G- Frutos pulverizados; H- Maceração por 21 dias com álcool 70°; I- Filtração a vácuo do macerado.

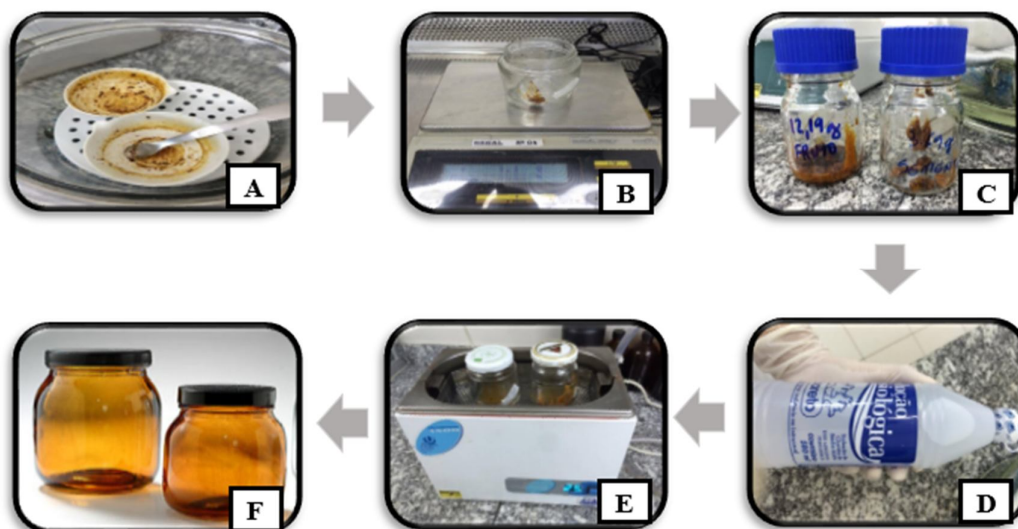


Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Evaporação do solvente e padronização da dosagem dos extratos

O macerado filtrado dos frutos e das sementes foram transferidos para cápsulas de porcelana e acondicionados em capela com circulação de ar para a evaporação do solvente (álcool 70°). Ocorrida a evaporação, foi feita a pesagem dos extratos brutos e diluição das concentrações estabelecidas em soro fisiológico 0,9% contendo metilparabeno e propilparabeno (0,05 g de cada). A figura 4 ilustra algumas etapas deste procedimento.

Figura 4 – Preparo dos extratos para início da administração. A- Extrato bruto após evaporação do solvente; B- Pesagem do extrato bruto; C- Rendimento dos extratos; D- Diluição em soro fisiológico com antimicrobianos; E- Ultrassom para homogeneização do extrato com veículo; F- Embalagens para embalar os extratos padronizados.

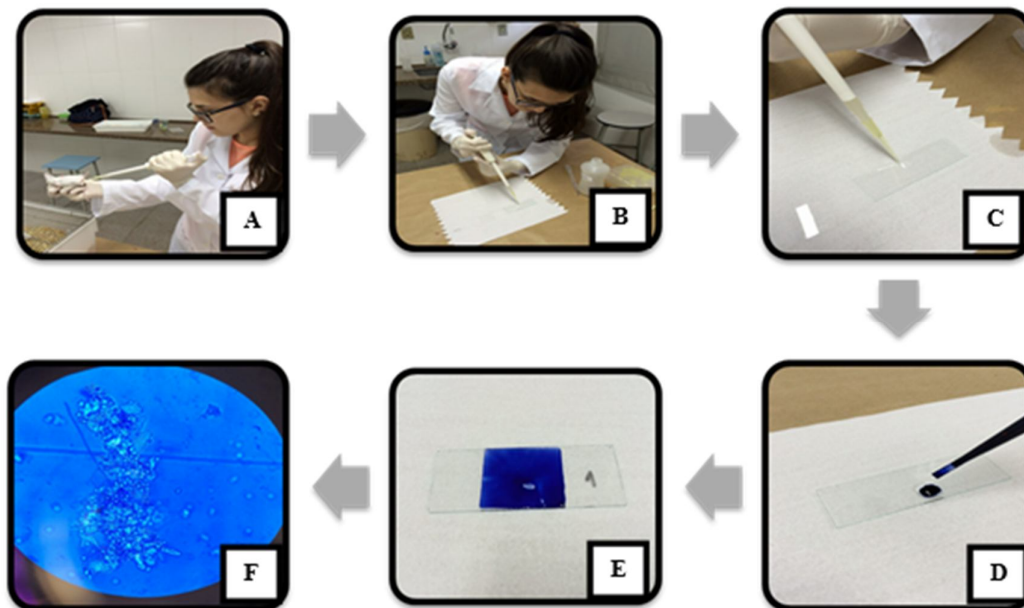


Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL

Após o início da administração dos extratos, foi realizado o esfregaço vaginal segundo o fundamento proposto por MARCONDES et al. (2002). Com micropipeta automática foi obtido uma alíquota de 50 microlitros (μL) de soro fisiológico 0,9% que foi introduzido no canal vaginal do camundongo para obtenção dos lavados células. O lavado foi distendido em uma lâmina para microscopia de luz e observado em microscópio com aumento de 40 vezes. Os lavados vaginais foram coletados diariamente, às 9 horas, durante os 21 dias de tratamento, sendo observadas as fases Metaestro e Diestro, Proestro e Estro. Os dados foram diariamente anotados em formulários para posterior análise estatística. A figura 5 mostra algumas etapas do esfregaço vaginal.

Figura 5 – Esfregaço vaginal. A- Obtenção do lavado de células; B e C- Transferência do lavado para lâmina de histologia; D- Adição do corante azul de metileno; E- Lamínula; F- Microscopia das células da mucosa vaginal com aumento de 40 vezes.



Fonte: Elaborada pela autora.

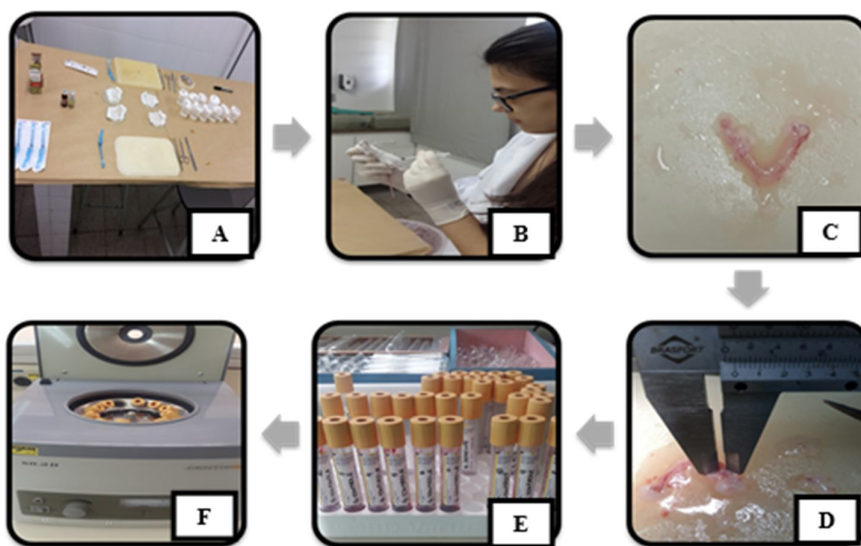
3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA DOS OVÁRIOS E ÚTERO

Após 21 dias de tratamento foi feita a eutanásia dos animais. As fêmeas foram submetidas à laparotomia com dose letal de Tiopental (150mg/Kg) e Lidocaína (10mg/Kg), para a coleta do sangue. Após a obtenção do sangue, este foi acondicionado em tubos sem anticoagulante, centrifugados por 5 minutos a 3000 giros por minuto. O material foi encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas Fundação Veritas, localizado no campus da Universidade do Sagrado Coração – USC, para realização da dosagem de estradiol e progesterona pelo método de Quimioluminescência ABBOT-ARCHITECT C18200SR. Detalhes dos procedimentos descritos estão expostos na figura 6. Em seguida, os cornos uterinos e ovários foram expostos e seccionados, sendo posteriormente embebidos em solução fisiológica 0,9%. Os cornos uterinos foram submetidos a análise biométrica com auxílio de paquímetro, sendo avaliados seu comprimento (cm) e largura (cm). Os ovários, foram acondicionados em potes estéreis com formol a 10% e encaminhados para o laboratório de Histologia da Universidade

Sagrado Coração- USC, para a confecção dos cortes histológicos e lâminas, coradas com Hematoxilina-Eosina – HE.

Figura 6

Figura 6 – Etapas da secção dos cornos uterinos, sua biometria e processamento do sangue: A- Materiais selecionados para o procedimento; B- Administração por vias intraperitoneal do anestésico e relaxante muscular; C- Cornos uterino e ovários expostos para realiz realização da biometria; D- Biometria com paquímetro; E- Tubos de ensaio com sangue coletado por punção cardíaca; F- Centrifugação do sangue.

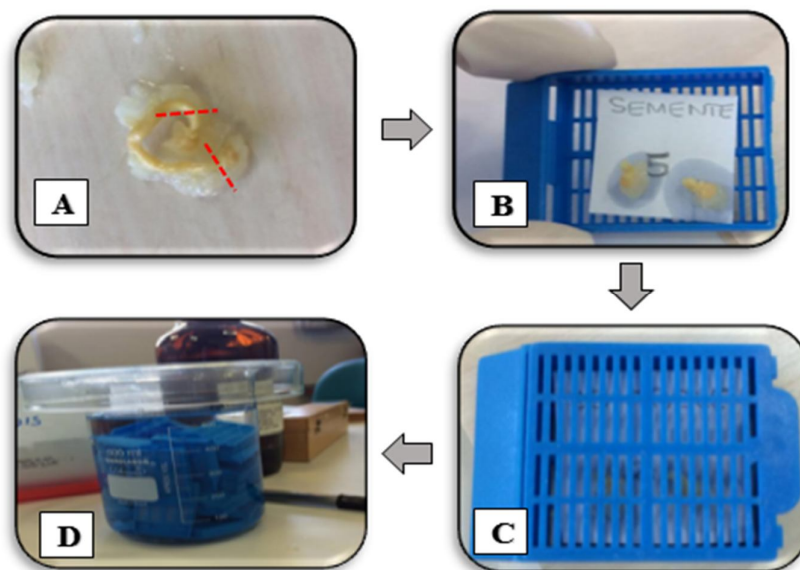


Fonte: Elaborada pela autora

3.5.1 Fixação, desidratação e diafanização

As etapas da preparação das lâminas estão descritas na figura 7. Inicialmente foram realizados cortes separando os cornos uterinos dos ovários. Os ovários devidamente identificados foram acondicionados em cassetes histológicos e imersos em álcool 70% por 24 horas, sendo transferido para álcool 80% durante um período de uma hora. Posteriormente foi transferido para o álcool 95% por uma hora, em seguida para o álcool absoluto (primeiro frasco) por 4 horas. Posteriormente foi transferido por mais 4 horas no segundo frasco de álcool absoluto, e no 3º frasco de álcool absoluto por 24 horas (overnight).

Figura 7 – Corte com lâmina na linha pontilhada, separando cornos uterinos dos ovários (A); acondicionamento dos ovários em cassette histológico com devida identificação (B e C); cassetes histológicos imersos em álcool 70% (D).



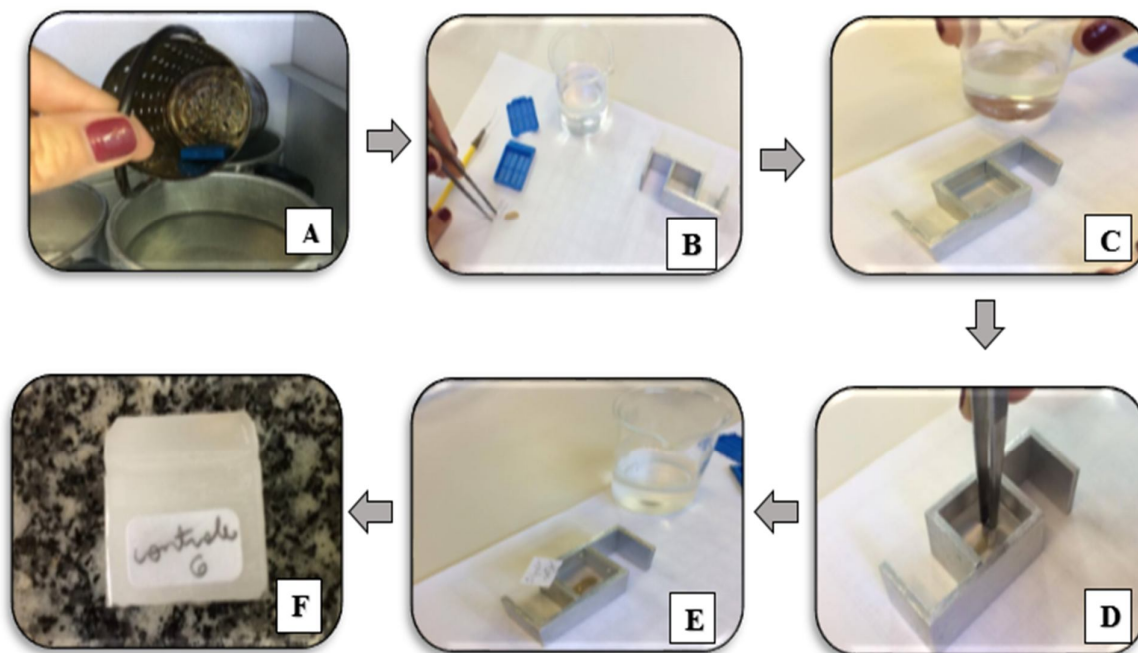
Fonte: Elaborada pela autora

Após estes períodos no álcool, os cassetes foram colocados em 2 frascos de xilol, 3 horas em cada frasco. Em seguida, foram tirados do xilol e passados para a parafina na estufa (60°C), também divididos em 2 frascos (1 hora em cada frasco de parafina).

3.5.2 Inclusão

Após a diafanização, a amostra foi colocada em parafina a fim de torná-la rígida e, dessa forma, permitir o corte em lâminas finas no micrótomo. A amostra foi imersa em parafina fundida e colocada em estufa a 58-60°C, onde o calor promove a evaporação do xilol e a ocupação dos espaços teciduais por parafina. O tecido embebido por parafina se torna rígido após ser retirado da estufa. As etapas da inclusão estão expostas na figura 8.

Figura 8 – Inclusão na parafina. Retirada dos cassetes histológicos do frasco de parafina (A e B); Base de parafina no molde (C) e colocação dos ovários com pinça e agulha para auxiliar (D); Molde completo de parafina após a colocação dos ovários e sua devida identificação (E); Bloco com ovários, pronto para corte histológico em micrótomo (F)

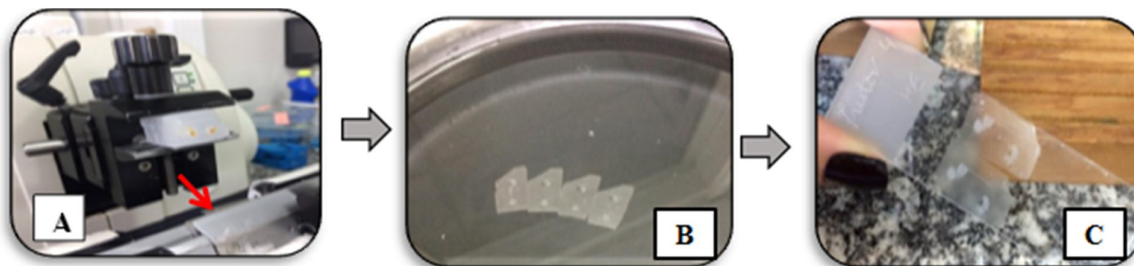


Fonte: Elaborada pela autora.

3.5.3 Microtomia

As lâminas foram devidamente identificadas e uma camada fina de albumina foi passada sobre sua superfície para melhor adesão dos cortes à lâmina. Os blocos de parafina contendo os ovários foram cortados em um micrótomo, na espessura de $6\mu\text{m}$, usando-se 2 cortes em cada lâmina. Os cortes foram colocados em banho-maria e foram selecionados os 2 melhores cortes, aderindo-os à lamina com o auxílio de pinças e pincel. A figura 9 apresenta os procedimentos realizados durante a microtomia.

Figura 9 – Bloco contendo os ovários no micrótomo. A seta vermelha indica a lâmina do aparelho responsável pelos cortes (A). Cortes em banho-maria (B). Os dois melhores cortes aderidos à lâmina (C).

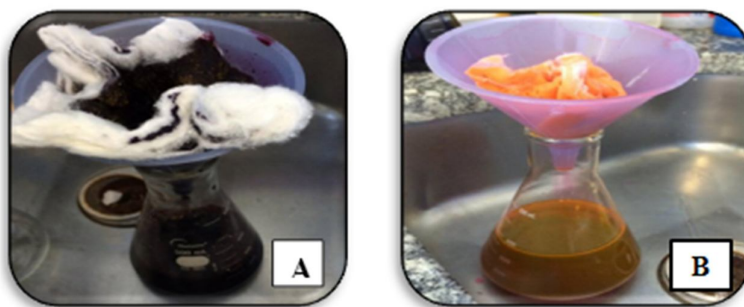


Fonte: Elaborada pela autora

3.5.4 Coloração das lâminas

Após o processo de aderência dos cortes às lâminas, foi necessária a desparafinização antes de corar. A desparafinização foi feita em dois frascos de xilol, deixando as lâminas durante 15 minutos em cada frasco. Enquanto as lâminas estavam mergulhadas em xilol, foi feita a filtração do corante hematoxilina (já havia pronto no estoque do laboratório) com algodão. O corante eosina precisou ser preparado no momento do uso (preparou-se 200 mL) utilizando 20 mL de eosina 1% (guardado em estoque do laboratório), 2 mL de floxina 1% (guardado em estoque), 156 mL de álcool 95% e 1 mL de ácido acético glacial, sendo também filtrado após a colocação de todos os reagentes. As principais etapas estão expostas na figura 10.

Figura 10 – Filtração de corante Hematoxilina (A) e eosina (B).

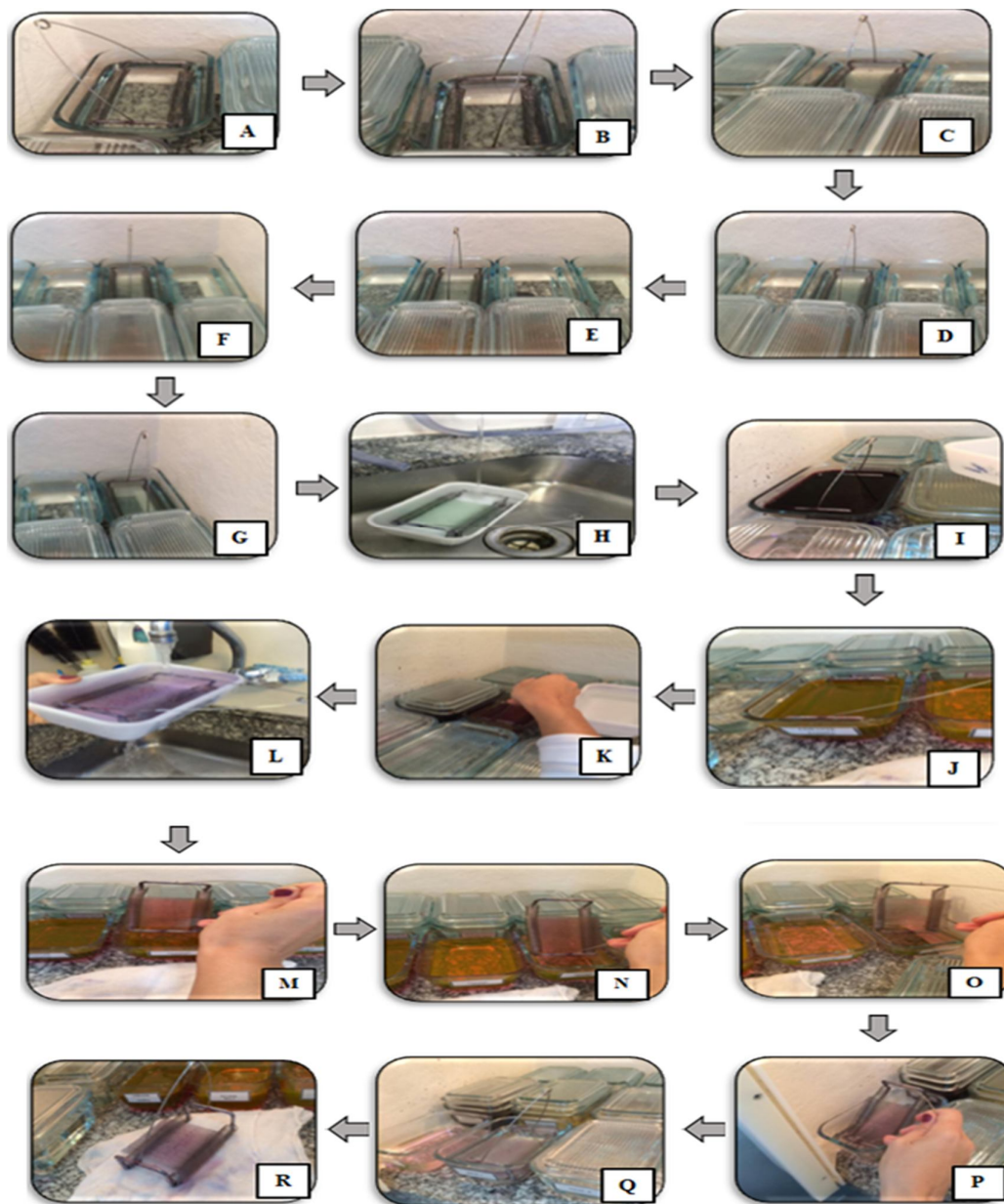


Fonte: Elaborada pela autora.

Após o tempo de 15 minutos em cada frasco de xilol, as lâminas foram mergulhadas em 2 frascos de álcool absoluto, por cerca de 1 minuto em cada frasco, e o mesmo aconteceu com álcool 95%. Depois, as lâminas foram rapidamente mergulhadas em um frasco contendo álcool 70% e deixadas em água corrente por alguns minutos. Em seguida as lâminas foram colocadas em um frasco com hematoxilina durante 7 minutos e depois lavadas em água

corrente para a remoção do excesso de corante; após a retirada do excesso de hematoxilina, as lâminas foram brevemente mergulhadas em álcool 80%, pois este torna-se miscível à eosina. Após estas etapas as lâminas ficaram no frasco de eosina por 1 minuto, sendo que após este tempo elas foram lavadas duas vezes seguidas com álcool 95% e depois com álcool absoluto da mesma maneira. Por fim as lâminas passaram por 3 frascos de xilol, ficando 15 minutos nos dois primeiros, e no último são mergulhadas e já retiradas (Figura 12).

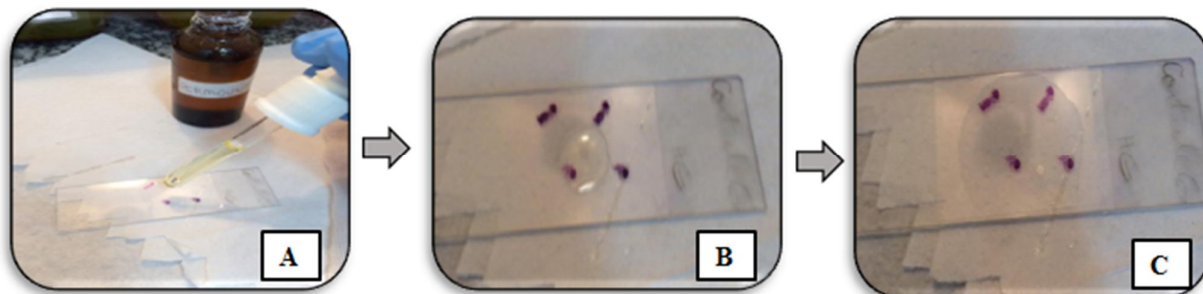
Figura 11 – Processo de coloração de lâminas. Lâminas em xilol (A e B); em álcool absoluto (C e D); em álcool 95% (E e F); em álcool 70 % (G); água corrente por alguns minutos (H); lâminas colocadas em hematoxilina (I); passadas em água corrente (J); mergulhadas em álcool 80% (K); eosina por 1 minuto (L); lavagem em álcool 95% (M e N); lavagem em álcool absoluto (O e P); lâminas mergulhadas no primeiro xilol (Q); retirada do excesso de xilol após o mergulho nos 3 frascos (R).



Fonte: elaborada pela autora

Para finalizar a montagem da lâmina, foi necessário secá-la ao redor dos cortes em estudo, pingar uma gota de *Permout* (para melhor fixação) e a colocação da lamínula removendo cuidadosamente as bolhas formadas (Figura 12).

Figura 12 – Fixação da lamínula. Uma gota de Permout é aplicada na lâmina já corada para melhor fixação da lamínula (A e B); lamínula é colocada em seguida e posicionada correta e cautelosamente (C).



Fonte: Elaborada pela autora

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

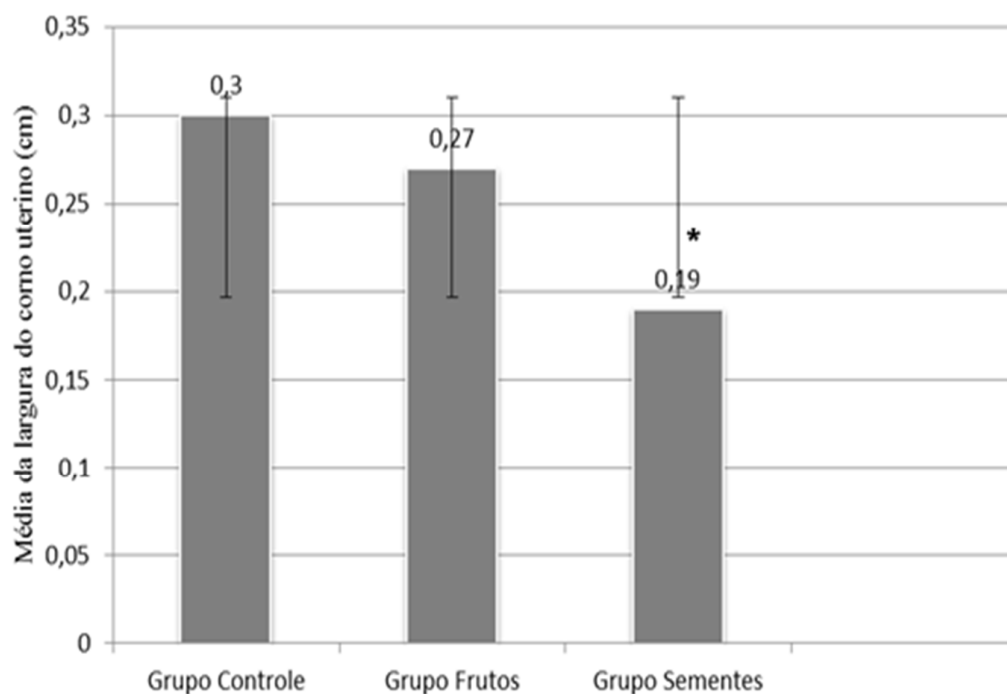
A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do Software Sigma Stat 3.5, Teste *T-Student* (paramétrico), onde $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 BIOMETRIA DOS CORNOS UTERINOS E DOSAGEM SANGUÍNEA DE ESTRADIOL E PROGESTERONA

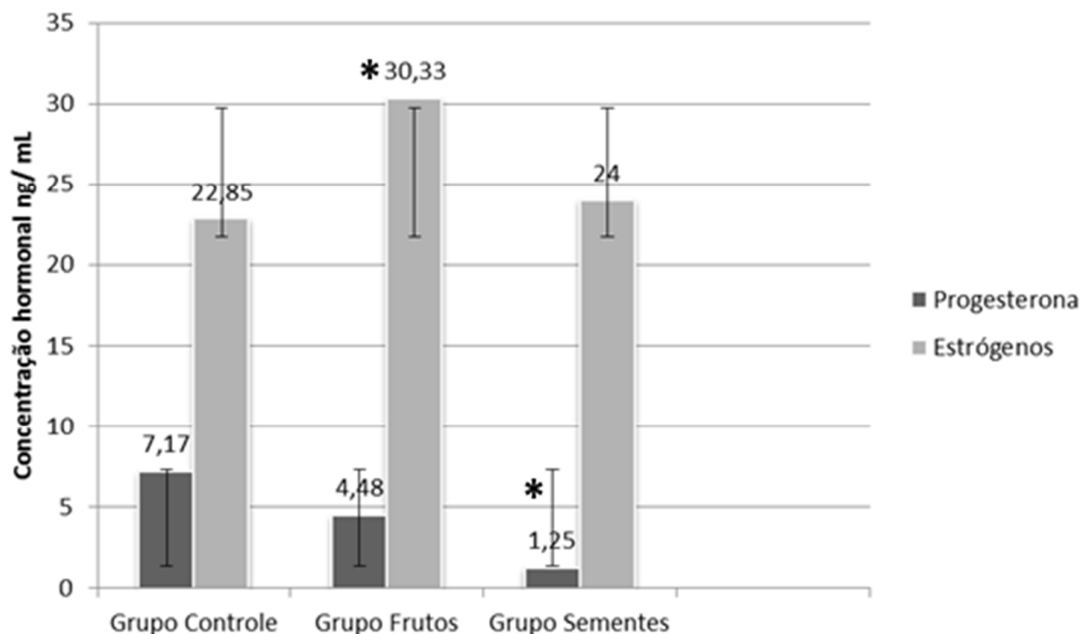
A figura 13 apresenta a média da largura dos cornos uterinos de ambos os grupos. Foi evidenciada diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$ - Teste *T-Student*) na média da largura dos cornos uterinos dos animais tratados com extrato aquoso das sementes da *Momordica charantia* L.

Figura 13 – Médias da largura dos cornos uterinos dos grupos de experimento. Teste *T-Student*, $p < 0,05$. * Valores estatisticamente significativos.



Na figura 14 estão expostas as médias obtidas das concentrações de progesterona e estradiol em ambos os grupos. Nota-se que ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) na concentração de progesterona no Grupo Sementes *Momordica charantia* (GSMC). Quanto aos níveis de estradiol, foi evidenciado aumento significativo ($p < 0,05$) de estradiol no Grupo Frutos *Momordica charantia* (GFMC).

Figura 14 – Comparação das médias obtidas quanto aos níveis de progesterona e estradiol em ambos os grupos. Teste *T-Student* ($p < 0,05$). * Valores estatisticamente significativos.



O ciclo estral de roedores como os camundongos duram em média quatro a cinco dias e sua ocorrência é marcada por 4 fases (proestro, estro, diestro e metaestro), onde nota-se alterações citológicas ocorridas na mucosa vaginal, as quais podem ser identificadas pelas características obtidas pelo esfregaço vaginal (CONSTANZO, 1999). Estas fases sofrem interferência dos hormônios ovarianos estradiol e progesterona. Para COSTA (2010) o metaestro e o diestro correspondem à fase luteínica do ovário, sendo o metaestro um estágio intermediário, onde a queda nos níveis de estrógenos é compensada pelos níveis de progesterona em ascensão, devido ao início do funcionamento dos corpos lúteos. O diestro é o período do ciclo em que se encontram as maiores concentrações de progesterona de fase luteínica ativa e as glândulas endometriais atingem o pico da sua atividade secretora. Neste estudo, o grupo tratado com o extrato das sementes de *Momordica charantia* L. apresentou significativa redução dos níveis séricos de progesterona em comparação ao grupo controle, sugerindo que possivelmente o espessamento do endométrio foi comprometido.

Para THORNHILL e GANGESTAD (2008), o estro dos roedores, por exemplo, é facilitado pela taxa de progesterona com relação ao estrógeno e isso ocorre especialmente na linhagem dos roedores e seus ancestrais, e não em outros mamíferos. Diante do exposto, fica pressuposto que a redução de progesterona implica em interferência na fase do cio (estro) de roedores.

MARTIN e FINN (1969) realizaram estudos clássicos sobre a influência hormonal dos órgãos da reprodução. Estes estudos foram recentemente revisados por WOOD et al.,(2007) e evidenciaram intensa remodelação uterina durante o ciclo estral. Neste estudo foi mencionado que a progesterona é capaz de inibir a proliferação de células epiteliais e estimular a multiplicação e diferenciação de células estroma endometrial, sendo este processo relevante para a decidualização do endométrio que é uma reação que ocorre durante a implantação do óvulo na parede do endométrio.

No presente estudo, a largura dos cornos uterinos do grupo tratado com o extrato da semente da *Momordica charantia* L. apresentou menor média quando comparada a média da largura do grupo controle. De acordo com CHANG; TAM; YEUNG; (1984) as sementes da *Momordica charantia* apresentam glicoproteínas que mostram ação abortiva e inibitória sobre a multiplicação celular do endométrio e miométrio, podendo justificar a suposta atrofia evidenciada na largura dos cornos uterinos evidenciadas no presente estudo. A redução da progesterona no sangue supostamente corrobora com os resultados biométricos obtidos no presente estudo.

Segundo SILVA e LARA (2011), a progesterona é um hormônio que em condições fisiológicas tem um papel modulador na pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) além de uma ação secretora das gonadotrofinas ou hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), enquanto, o estrogênio tem ação, principalmente, na produção hipofisária desses hormônios. Com a proximidade da ovulação e após o acúmulo de gonadotrofinas hipofisárias por ação do estradiol ovariano, ocorre uma elevação súbita, efêmera e discreta da progesterona, a qual é responsável pela liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) acumulado, o que corresponde ao pico pré-ovulatório dessas gonadotrofinas, as quais são imprescindíveis para a ocorrência da ovulação. Diante do exposto, os resultados encontrados no presente estudo evidenciaram redução na concentração plasmática de progesterona no grupo tratado com o extrato das sementes da *Momordica charantia* L., .

Quanto aos níveis séricos de estradiol, HSU et al.,(2011), realizaram um estudo como objetivo de investigar a atividade estrogênica dos compostos ativos do tipo triterpenóides dos frutos da *Momordica charantia* L. e evidenciaram que quatro novos compostos triterpênicos e um já conhecido dos frutos desta planta apresentaram atividade agonista / antagonista parcial nos receptores de estrógenos. Diante desta citação surgem indícios que corroboram com o aumento de estradiol evidenciado na análise bioquímica do sangue do grupo de animais tratados com os frutos da *Momordica charantia* L., o que sugere possível similaridade

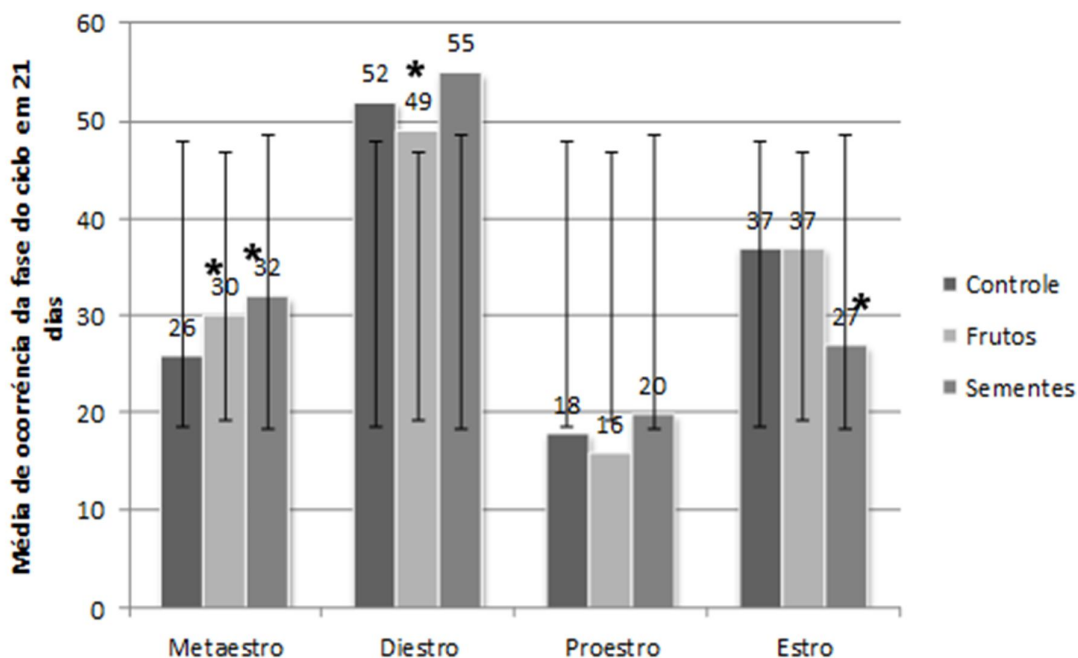
química de compostos químicos presentes no extrato dos frutos que poderiam ser mensurados na análise do sangue, sendo uma suposta justificativa para este aumento hormonal.

Segundo MARTINELLO e SILVA (2003), a interferência de componentes químicos derivados de fármacos ou plantas em análises clínicas assume importante papel na rotina laboratorial podendo interferir nos ensaios e modificar o diagnóstico clínico-laboratorial. Esta citação corrobora com o aumento de estradiol mensurado no exame de sangue dos animais que foram tratados com o extrato dos frutos da *Momordica charantia* L. do presente estudo.

4.2 OCORRÊNCIA DAS FASES DO CICLO ESTRAL

As médias obtidas das fases do ciclo estral dos grupos de experimentos estão expostas no figura 15. Nota-se que no grupo tratado com os frutos da *Momordica charantia* ocorreu aumento significativo na ocorrência do metaestro, seguida de uma queda também significativa da fase subsequente que é o diestro. No grupo semente, a ocorrência do metaestro também foi significativamente superior que a média do grupo controle. Neste grupo também ocorreu redução significativa na ocorrência do estro. Os valores estatisticamente significativos apresentam $p < 0,05$, segundo o Teste *T-Student*.

Figura 15 – Comparação da ocorrência das fases do ciclo estral durante 21 dias de experimento. Teste *T-Student*, $p < 0,05$. * valores estatisticamente significativos.



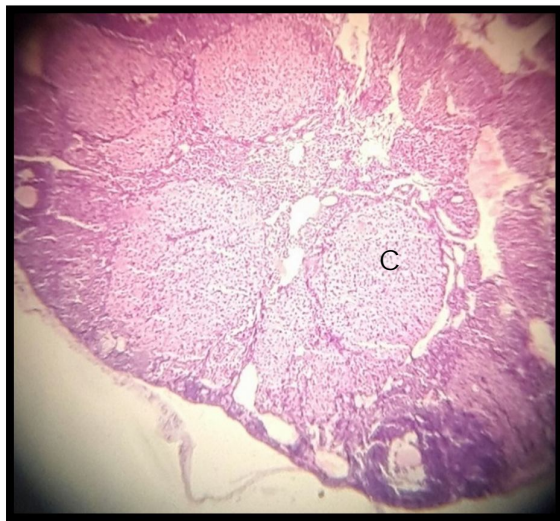
Para COSTA (2010) o metaestro e o diestro correspondem à fase luteínica do ovário, sendo o metaestro um estágio intermediário, onde a queda nos níveis de estrógenos é compensada pelos níveis de progesterona em ascensão, devido ao início do funcionamento dos corpos lúteos. O metaestro é a fase luteínica, muito curta em roedores, durando em média 24 horas e representa a fase progesteronal. (MARCONDES, 1999). De acordo com os resultados aqui expostos, tanto o extrato dos frutos quanto das sementes da *Momordica charantia* promoveram aumento na ocorrência do metaestro, sendo que o grupo sementes promoveu também a redução na ocorrência do estro (corresponde ao cio dos roedores), concomitantemente à redução do hormônio progesterona, sugerindo potencial de alterar parâmetros relacionados à fertilidade.

Publicações feitas por LIMTRAKUL; KHANTAMAT; PINTHA (2004) e BASCH; GABARDI; ULBRICHT (2003), atribuem a diferentes partes da *Momordica charantia* L. atividade antiespermatogênica e androgênica, novamente corroborando com os resultados aqui apresentados que sugerem à esta planta potencial de alterar o perfil hormonal e a ocorrência de algumas fases do ciclo estral dos roedores tratados com suas sementes e frutos.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS CORPOS LÚTEOS

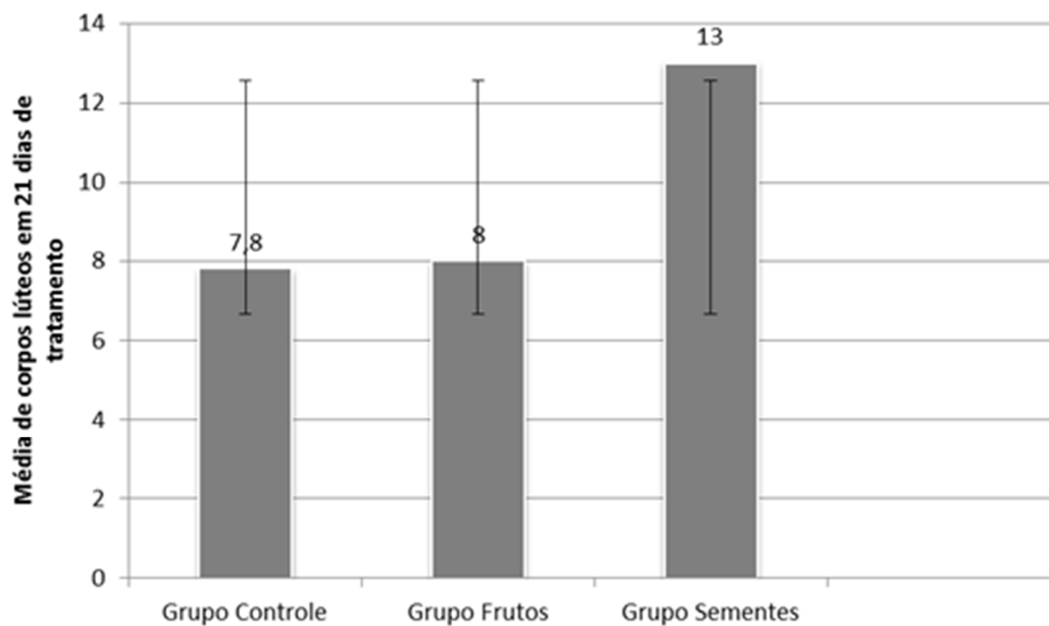
A figura 16 apresenta o corte histológico do ovário apresentado o corpo lúteo. A média de corpos lúteos mensurados em ambos os grupos de experimento estão expostas na figura 17. Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Teste *T-Student*) entre os grupos tratados com os frutos e sementes da *Momordica charantia* L., respectivamente, em relação ao grupo controle.

Figura 16 – Corte longitudinal do ovário esquerdo do camundongo suíço. C: Corpo lúteo. Aumento 40X. Coloração: HE.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 17 – Média de corpos lúteos observados em microscopia eletrônica de ambos os grupos de experimento (controle, frutos e sementes, respectivamente). Teste *T-Student*, $p < 0,05$.



De acordo com FRANKS (2012), o ciclo ovulatório em camundongos e demais roedores é poliovulatório, ou seja, se difere do ciclo mensal feminino onde apenas um folículo ovariano é recrutado para maturação do ovócito secundário. Nos roedores, a ovulação se

manifesta no início da fase proestro e se completa até o término do estro. Apesar dos roedores apresentarem ciclo mais curto que as mulheres, estes animais são rotineiramente utilizados na investigação de alterações que ocorrem no ciclo feminino. (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Diante do exposto se apoia a justificativa da metodologia adotada no presente estudo.

LOMBARDI et al., (2012) utilizaram o método de contagem de corpos lúteos em um estudo feito com ratas portadoras de ovários policísticos induzidos pela luz contínua, onde associaram a ausência de corpos lúteos com baixos níveis de progesterona. No presente estudo, a concentração sanguínea do hormônio progesterona apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado com o extrato das sementes da *Momordica charantia* L. em relação à média mensurada no grupo controle, no entanto, esta redução não foi suficiente para interferir na quantidade dos corpos lúteos do ovário dos animais deste grupo, possivelmente pelo tempo de administração do extrato.

RESENDE et al., (2008) observaram no estudo histológico dos ovários de ratas ictéricas a ausência de corpos lúteos funcionais, sugerindo a existência de anovulação. Embora a média de corpos lúteos do grupo sementes tenha sido superior que os demais grupos, a diferença entre os mesmos não foi significativa, mostrando novamente que a administração deste extrato não interferiu na formação de corpos lúteos comparado ao grupo controle.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- ✓ O extrato dos frutos da *Momordica charantia* L. promoveu aumento significativo do hormônio estradiol e alterações significativas na ocorrência das fases metaestro (aumento de ocorrência) e diestro (redução de ocorrência). De acordo com a literatura consultada, postula-se que compostos triterpênicos dos frutos da *Momordica charantia* L. apresentem funções análogas e/ou antagônicas aos estrógenos, o que supostamente justificaria as alterações evidenciadas no presente estudo;
- ✓ Quanto ao extrato obtido das sementes da *Momordica charantia* L., foi evidenciada redução significativa na largura dos cornos uterinos dos animais tratados durante 21 dias, concomitantemente a redução sérica do hormônio progesterona e diminuição na ocorrência da fase estro no ciclo estral. Estas alterações sugerem que esta parte da planta apresenta possível capacidade de interferir na fertilidade dos animais tratados.
- ✓ Não foram encontradas alterações na quantidade de corpos lúteos em ambos os grupos, o que supostamente esteja relacionado ao curto tempo de tratamento dos animais dos grupos extrato dos frutos e sementes da *Momordica charantia* L.
- ✓ Novos estudos, cuja administração dos extratos seja mais prolongada, assim como dosagens de outros hormônios envolvidos no ciclo feminino (hormônios da hipófise) devem ser realizados para elucidar os resultados aqui expostos. A análise fitoquímica dos metabólitos secundários dos extratos obtidos também deve ser objetivo para novas pesquisas.

REFERÊNCIAS

AGUWA CN, MITTAL GC. Abortifacient effects of the roots of *Momodica Charantia* *Angustisepala*. **J Ethnopharmacol.** 1983;7:169–173. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6865449>>

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.908. 1999.

ALI, L., KAHN, A.K.Z., MAMUN, M.I.R., MOSIHUZZAMAN, M., NAHAR, N., NUR-E-ALAM, M., ROKEYA, B. 1993. Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. **Planta Medica**, 59, 408–412.

ASSUBAIE, N. F. E EL-GARAWANY, M. M. 2004. Evaluation of Some Important Chemical Constituents of *Momordica charantia* Cultivated in Hofuf, **Saudi Arabia Journal of Biological Sciences**, 4, 628-630.

BAILEY, C.J., DAY, C., TURNER, S.L., LEATHERDALE, B.A. 1985. Cerasee, a traditional treatment for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. **Diabetes Research**, 2, 81–84.

BANKS, W. J. Sistema reprodutor feminino. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, p. 565-587. 1991.

BASCH E, GABARDI S, ULBRICHT C. Bitter Melon (*Momordica Charantia*) a review of efficacy and safety. **Am J Health Syst Pharm.** 2003;60(4):356–359. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625217>>

BRINKER, F. Herb Contraindications and Drug Interactions. **Eclectic Medical Publications**. Fourth edition; p.59. 2013.

CHANG, W.Y., TAM, P.P., YEUNG, H.W. The termination or early pregnancy in the mouse by beta-momorcharin. **Contraception.** 1984;29(1):91–100. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6734206>>

CONSTANZO L.S. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1999. 392p.

COSTA, M. C. **Estral cicle, ovarial and uterine histomorfometry of female mice after long-term treatment with medroxyprogesterone acetate.** Universidade Federal de Viçosa, 2010. Disponível em:

<<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/biologia%20celular%20e%20estrutural/2010/235012f.pdf>>

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

DUKE, J. **Handbook oh Medicinal Herbs.** Boca Ranton., p.677. 1985.

FARNSWORTH, N.R., BINGEL, A.S., CORDELL, G.A., CRANE, F.A., FONG, H.H. . Potential value of plants as sources of new antifertility agents. **J Pharm Sci**, 1975, p.64: 535-598.

FRANKS, S. Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction. **Endocrinology.** 2012;153(6):2536-8. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-72032012000700006&script=sci_arttext>

GIROLAMI A, SCANDELLARI, R, TEZZA. F., PATERNOSTER, D., GIROLAMI, B. Arterial thrombosis in young women after ovarian stimulation: case report and review of the literature. **J Thromb Thrombol.** 2007; 24 (2): 169-7.

GIRON, L.M., FREIRE, V., ALONZO, A., CACERES, A. 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, 34, 173–187.

GROVER JK, YADAV SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica Charantia*. **J Ethnopharmacol.** 2004;93(1):123–132. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182917>>

GUPTA, M.P. **Plantas Medicinales Iberoamericanas.** Bogotá, p.617. 1995.

HSU, C.; HSIEH, C.L.; KUO, Y.H.; HUANG, C.J. Isolamento e identificação do tipo cucurbitane triterpenoids com agonista parcial / potencial antagonista para receptores de

estrogênio de *Momordica charantia* **Jornal da química agrícola e alimentar**, vol.59 (9), 2011, p.4553-61.

JAMWAL, K. S., et al. "Preliminary screening of some reputed abortifacient indigenous plants." **Indian J. Pharmacy**. 1962; 24: 218–20.

KOENTJORO-SOEHADI, T., et al. "Perspectives of male contraception with regards to Indonesian traditional drugs." Proc. Second National **Congress of Indonesian Society of Andrology**. 1982; Aug. 2–6: 12.

LANS, C., BROWN, G. 1998. Observations on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, 35, 125–142.

LEATHERDALE, B.A., PANESAR, R.K., SING, G., ATKINS, T.W., BAILEY, C.J., BIGNELL, A.H.C. 1981. Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (karela). **British Medical Journal**, 282, 1823–1824.

LEUNG SO, YEUNG KN. The immunosuppressive activities of two abortifacient isolated from the seeds of bitter melon (*Momordica Charantia*) **Immunopharmacology**. 1987;133:159–171. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3497134>>

LIMTRAKUL, P., KHANTAMAT, O, PINTHA, K. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2004;54(6):525-30.

LOMBARDI, L.A. et al. Morfologia das células intersticiais de ovários policísticos de ratas: um estudo experimental. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Jul 2012, vol.34, no.7, p.323-328. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-72032012000700006&script=sci_arttext> Acesso: 15 de maio, 2016.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J. and TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, p.609-614, 2001.

MARCONDES, F. K.; et al. Determination Of The Estrous Cycle Phases Of Rats: Some Helpful Considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 55-68, n.4a. 2002.

MARCONDES, FK. Influência do ciclo estral sobre as respostas hormonais de ratas submetidas a estresse, [Tese Doutorado] Unicamp, 1999.

MARTIN L, FINN CA. Duration of progesterone treatment required for a stromal response to estradiol-17 β in the uterus of the mouse. **J Endocrinol**. 1969; 44: 279-80.

MARTINELLO, F.; SILVA, E. L.; Interferência do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos: estudos in vivo e in vitro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 323-334, 2003. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/1497/1/5859-22025-1-PB.pdf>>

MONTANARI, T. Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodeembrio>. ISBN 978-85-915646-1-3>

NASEEM, M.Z., PATIL, S.R., PATIL, S.R., RAVINDRA-PATIL, R.S., 1998. Antispermatic and androgenic activities of *Momordica charantia* (karela) in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology** 61, 9–16. Disponível em: <<http://www.jami.com.hr/additional/FARMAKOLO%C5%A0KI%20U%C4%8CINAK%20GORKE%20DINJE-PREGLED%20SVIH%20ISTRA%C5%BDIVANJA.pdf>> Acesso em 29 jun. 2015.

NG, T.B., Li, W.W., YEUNG, H.W., 1987. Effects of ginsenosides, lectins and *Momordica charantia* insulin-like peptide on corticosterone production by isolated rat adrenal cells. **Journal of Ethnopharmacology** 21, 21–29. Disponível em: <<http://www.jami.com.hr/additional/FARMAKOLO%C5%A0KI%20U%C4%8CINAK%20GORKE%20DINJE-PREGLED%20SVIH%20ISTRA%C5%BDIVANJA.pdf>> Acesso em 29 jun. 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M., FLOWER, R. J. **Rang e Dale: Farmacologia**. 4ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p.454-455.

RESENDE, Vivian et al . Influência da icterícia obstrutiva na capacidade reprodutiva, desenvolvimento fetal e morfologia ovariana em ratas. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro , v. 36, n. 4, p. 339-346, Ago. 2009 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912009000400012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 Out. 2016.

RIBEIRO, L. F.C.; MELLO, A. P. A.; BEDENDO, I. P.; KITAJIMA, E. W.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. 2004. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao

enfazamento em melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathol.**, 30, 3.

SATHISHEKAR, D., Subramanian S. Beneficial effects of *Momordica charantia* seeds in the treatment of STZ-induced diabetes in experimental rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(6):978–983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930730>> Acesso em 02 Out 2016.

SILVA, A.C.J.S.R.; LARA, L.A.S. Moduladores seletivos dos receptores da progesterona: revisão da literatura. **Femina**, vol 39; nº 12, 2011. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n12/a2973.pdf>>. Acesso em 21 de dez de 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. L.; GOSMANN, G.; MELLO, J. P. C. L.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre – Editora da UFSC, p. 83, 2001.

SIMÕES, M. J. **Aspectos morfológicos e morfométricos de endométrio de ratas albinas nas subfases inicial, intermediária e final do poestro e do metaestro**. 1984. Tese (Doutorado em Histologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984

SINGH, N., GUPTA, M. Regeneration of β cells in islets of Langerhans of pancreas of alloxan diabetic rats by acetone extract of *Momordica charantia* (Linn.) (bitter gourd) fruits. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2007;45(12):1055–1062. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18254212>>

STEPKA, W., et al. “Antifertility investigation on *Momordica*.” **Lloydia**. 1974; 37(4): 645c.

THORNHILL, R. e GANGESTAD, S. W. The evolutionary biology of human female sexuality. Nova Iorque: Oxford University Press, 2008.

WELIHINDA, J., KAUNANAYAKE, E.H., SHERIFF, M.H.R., JAYASINGHE, K.S.A .1986. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, 17, 277– 282

WELLS, B.; DIPIRO, J.T.; SCHWINGHAMMER, T.L.; HAMILTON, C. **Manual de Farmacoterapia**. São Paulo: McGraw-Hill, 2006, p.303.

WOOD GA, FATA JE, WATSON KLM, KHOKHA R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 2007; 133:1035-44.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais sob protocolo 5698260815.



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA REGULARIDADE DAS FASES DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS SUIÇOS FÊMEAS SUBMETIDAS AO USO DIÁRIO DE EXTRATO DE Momordica charantia ", protocolado sob o CEUA nº 5698260815, sob a responsabilidade de **Márcia Clélia Leite Marcellino** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 03/09/2015.

We certify that the proposal "REGULARITY EVALUATION STAGE OF MICE OF CYCLE ESTROUS SWISS FEMALES SUBMITTED TO USE Momordica charantia EXTRACT OF DAILY ", utilizing 30 Heterogenics mice (30 females), protocol number CEUA 5698260815, under the responsibility of **Márcia Clélia Leite Marcellino** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - It's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 09/03/2015.

Vigência da Proposta: de 09/2015 a 12/2015

Area: Centro Da Saúde/ Farmacologia

Procedência: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Gênero: Fêmeas

Idade: 30 a 45 dias N: 30

Linhagem: sulços

Peso: 35 a 40 g

Nota: Extratos obtidos dos frutos e das sementes da Momordica charantia são comumente utilizados pela população para o tratamento da hiperglicemia em portadores de diabetes, no entanto, relatos sugerem que componentes desta espécie vegetal apresentam capacidade de reduzir a fertilidade. O objetivo do presente estudo será investigar a regularidade do ciclo estral de camundongos sulços submetidos ao consumo dos extrato dos frutos e das sementes da Momordica charantia. Serão utilizados 30 camundongos sulços, fêmeas e adultas, divididas em 3 grupos de experimentos. A administração dos extratos será feita por 45 dias, por gavagem. Diariamente será realizado o exame de estrogo vaginal para determinação das fases do ciclo estral. Os animais serão pesados uma vez por semana e no final do experimento, será feita a remoção do útero para avaliação histológica.

Bauru, 21 de setembro de 2015

Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração

Anexo B – Documento de identificação botânica emitido pelo Herbário BAUR – USC.



Bauru, ___ de Setembro de 2015

A
Karoline Daynez Misson

Referente a identificação de planta.

Informo que a planta enviada a este herbário para identificação como parte da monografia intitulada **AVALIAÇÃO DA REGULARIDADE DAS FASES DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS SUIÇOS FÊMEAS SUBMETIDAS AO USO DIÁRIO DE EXTRATO DE (*Momordica Charantia* L.)** foi incorporada ao acervo do herbário BAUR com o número 5588 e trata-se da espécie ***Momordica Charantia* L.** conforme pesquisa feita em literatura especializada e também através da comparação com exemplares já depositados em nosso acervo.

Atenciosamente,



Prof.º Dorival José Coral
Curador Herbário BAUR