

EFEITO DA PAPAÍNA NA REPRODUÇÃO DE RATOS WISTAR

Nadia Cristina Marin Moreira, Nayara Cristine Gardelli, Marcela Rosana da Silva Santos, Claudemir de Carvalho

Faculdade de Pindamonhangaba, Biotério, Rod. Presidente Dutra Km99 s/n, claudemirdec@yahoo.com

Resumo- A possibilidade do desenvolvimento de produtos naturais, de baixa ou nenhuma toxicidade e que tenha efeito sobre a taxa de natalidade levou vários grupos de pesquisadores a investigar a realidade da ação contraceptiva do mamão, cientificamente conhecido como *Carica papaya*. Neste trabalho foi avaliada a ação da Papaína®, principal enzima presente na espécie *Carica papaya*, sobre a reprodução de ratos Wistars. Foram tratados oito machos com 50 mg/animal/dia por via oral, por um período de 15 dias. Após o tratamento, cada macho foi colocado para acasalar com fêmeas de mesma linhagem, não tratadas e com proestro ou estro confirmado por esfregaço vaginal. O acasalamento foi confirmado pela presença de espermatozóides nos esfregaços. Foi observado que o tratamento não alterou a libido, a habilidade para o acasalamento, nem o desempenho reprodutivo dos machos tratados. Por outro lado, levou a um alto percentual de cabeças e caudas espermáticas separadas. No entanto, esta alteração não interferiu significativamente na fertilidade dos animais tratados levando ao nascimento de grande número de filhotes saudáveis.

Palavras-chave: Papaína. *Carica papaya*. Decapitação Espermática. Fertilidade.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A papaína é uma enzima proteolítica, portanto com uso farmacêutico, sendo utilizada na remoção de tecido necrótico facilitando a cicatrização, na cosmética para remoção de manchas da pele devido sua ação esfoliante e no tratamento da acne, e como promotora de absorção de outros fármacos. Na indústria é empregada na limpeza de resíduos de lentes de contato gelatinosas; na culinária, como amaciante de carne devido sua propriedade proteolítica. Seu mecanismo de ação não está ainda estabelecido; seu uso, assim como o de todas as enzimas proteolíticas, oferece perigo em casos de afecções hepáticas ou renais e durante o tratamento com anticoagulantes, além de poder provocar reações alérgicas (ITAYA; YAKUKO, 2002)

Por influência da medicina asiática, novas propriedades dos ativos encontrados na *C. papaya*, como sua ação contraceptiva para mulheres e homens e seus efeitos sobre a reprodução de maneira geral, vem sendo investigadas por diferentes pesquisadores, em diferentes modelos animais. No Sri Lanka e em outras regiões da Índia e do Continente Asiático a ingestão do mamão tem proibição médica para as gestantes e, quando as mulheres não querem engravidar elas fazem o uso diário do mamão verde na dieta alimentar (ADEBIYI; ADAIKAN; PRASAD, 2002).

Atualmente a indústria farmacêutica dispõe de várias formas e formulações com atividade

anticoncepcional, a maioria de administração oral e voltada para o uso pelas mulheres. No entanto, tem sido crescente a busca de novas drogas, principalmente de origem vegetal, com reduzida ação adversa e de aplicação principalmente para os homens, já que o mercado é carente de contraceptivos masculinos e grande parte dos homens ainda não aceita a vasectomia e o uso de preservativo.

A literatura discute o uso contraceptivo de várias plantas bem como de diferentes extratos do mamão com esta finalidade. Por essa razão, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da papaína, enzima que se constitui no principal ativo presente na espécie *C. papaya*, na reprodução de ratos albinos Wistar machos.

Metodologia

Foram utilizados oito ratos albinos Wistar, machos adultos, provenientes do Biotério da Faculdade de Pindamonhangaba- FAPI. Os animais foram mantidos todos em uma mesma gaiola (60x50x22 cm), sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e regime de claro/escuro de 12 horas. Água e ração apropriada foram mantidas *ad libitum*.

Para o tratamento utilizou-se Papaína® (cód. P 3250, *from Papaya Latex* - Látex bruto Desidratado) do Laboratório Sigma-Alemanha, na dose de 50 mg/animal, por via oral, uma vez ao dia, durante 15 dias. A solução era preparada

diariamente diluindo-se 400 mg de papaína em 8 ml de água destilada, mantendo-se a mistura à 40 °C durante 1 hora para facilitar a diluição.

Após o término do tratamento, os ratos foram transferidos para gaiolas individuais (49x34x16 cm) e acasalados com fêmeas não tratadas, cuja ciclicidade estava sendo acompanhada há 12 dias, por citologia vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Os esfregaços vaginais foram realizados no início da manhã e as fêmeas em início de estro colocadas imediatamente na presença do macho, com quem permaneciam até o final da tarde para acasalamento. As fêmeas detectadas em proestro no início da manhã eram colocadas com o macho no final da tarde e retiradas na manhã seguinte. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço.

Confirmada a cópula, a fêmea foi retirada da presença do macho e mantida em gaiola individual (49x34x16 cm) para observação e espera pelo possível parto. Quando da colocação dos machos e fêmeas para o acasalamento, foi observado o comportamento dos machos para detecção de possíveis alterações da libido e da habilidade para cópula.

Foi realizada contagem de cabeças isoladas em três campos escolhidos aleatoriamente para cada lâmina. Cada campo foi analisado separadamente por dois avaliadores sem que um tivesse conhecimento do resultado estabelecido pelo outro. Em cada campo foram contados todos os espermatozóides íntegros e todas as cabeças isoladas e foi calculado o percentual de cabeças isoladas em relação ao total de estruturas contadas (espermatozóides íntegros + cabeças isoladas). Dois machos não tratados foram colocados para acasalar, cada um com uma fêmea anteriormente coberta por macho tratado, cujo acasalamento não resultou em prenhez. Foram usados os mesmos procedimentos empregados com o grupo experimental.

Resultados

Ao início do tratamento os animais foram observados para detecção de sinais característicos de intoxicação aguda, como ereção dos pêlos, diarreia, perda de apetite, emagrecimento acentuado, alterações motoras (MARUO; BERNARDI; SPINOSA, 2003) e não se detectou nenhum desses sinais.

Os machos tratados apresentaram o mesmo comportamento dos dois controles, não tratados, demonstrando acentuado interesse sexual e realizando a primeira cópula nos primeiros cinco minutos de contato com a fêmea. Entre a primeira e a segunda cópula também não transcorreram mais que cinco minutos. Os machos

demonstraram completa habilidade para a cópula. Estes sinais observados deixam claro que o tratamento não afetou a libido nem a habilidade e o desempenho sexual dos machos.

Os resultados dos acasalamentos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2:

Conforme descrito na metodologia, o acasalamento foi confirmado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, após a permanência da fêmea com o macho durante o estro. Para nossa surpresa, os esfregaços apresentaram grande número de cabeças isoladas, sem flagelo (Figura 1), o que não foi observado nas lâminas das fêmeas acasaladas com machos controle.



Figura 1- Esfregaço vaginal mostrando cabeça isolada (a) e espermatozóide íntegro (b) presentes no ejaculado de ratos tratados com papaína.

Pode-se observar também que dos oito machos tratados, apenas um não obteve sucesso nos acasalamentos, resultando vazias as duas fêmeas acasaladas com ele. Esse animal não apresentou nenhuma alteração da libido. As duas fêmeas foram acasaladas com os machos controle iniciando quadro gestacional que resultou no nascimento de 11 e 12 filhos, respectivamente. Para os demais machos, o percentual de prenhez variou de 25% a 100%, com dois animais atingindo o percentual máximo. Não foi assinalado o nascimento de fetos malformados e o número de natimortos foi tão pequeno que não representou interesse biológico.

Discussão

Interesse sexual, habilidade para a cópula, fetos natimortos e alto número de óbito de neonatos podem ser indicativos de intoxicação

(MARUO; BERNARDI; SPINOSA, 2003). A ausência desses sinais clínicos indica que a papaína na dose e no tempo de tratamento utilizado não foi tóxica para a reprodução dos animais tratados. Segundo estes autores, a ausência de sinais como piloereção, alteração locomotora, presença de diarreia, perda de apetite, indica a ausência de toxicidade aguda.

As observações de que o tratamento utilizado não interferiu na libido nem no desempenho sexual dos animais está em concordância com a quase totalidade dos experimentos descritos na literatura (LOHIYA; GOYAL, 1992; LOHIYA et al., 1994; LOHIYA et al., 1999; PATHAK et al. 2000; VERMA; CHINOY, 2001).

Outro dado que corrobora a literatura é a diminuição do número de espermatozoides por ejaculado (LOHIYA et al., 2005; LOHIYA et al., 2008). Embora não tenha sido realizada a contagem de espermatozoides nos esfregaços, nossa experiência nos permite afirmar que estes estavam em baixa concentração.

Cabeça isolada é uma das anormalidades morfológicas primárias dos espermatozoides e, como toda alteração espermática, pode resultar em uma redução da fertilidade. A fertilidade diminui geralmente quando o percentual de células alteradas excede a 20% (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Nos animais tratados foi observado que alguns deles embora apresentassem um percentual de cabeças isoladas superior a 80%, conseguiram que seu acasalamento resultasse em prenhez e nascimento de número normal de filhotes.

Este fato leva a crer que a papaína pode ter sido a causa desta alteração morfológica mas, não induziu alteração no acrossomo, não afetando portanto, a capacitação espermática e a capacidade de fecundação dos espermatozoides íntegros (UDOH; ESSEIN; UDOH, 2005; LOHYIA et al., 2008), sugerindo que nos menos de 20% dos espermatozoides que não sofreram a separação da cabeça e da cauda, a mobilidade espermática foi o fator preponderante para a fecundação. Como foram avaliados esfregaços, não foi possível avaliar mobilidade e vigor, condições essenciais para manutenção da fertilidade espermática.

A decapitação espermática em ratos já foi descrita por Linder et al. (1988) em ratos tratados por via oral com benomyl (fungicida fitotóxico). Estes pesquisadores encontraram ainda, peso diminuído dos testículos e dos epidídimos, produção diminuída de espermatozoides, e aumento do número de túbulos seminíferos contendo células gigantes multinucleadas. Porém, o peso da vesícula seminal e da próstata, a motilidade espermática e o desempenho reprodutivo não foram afetados pelas dosagens utilizadas no experimento.

Toyama e Itoh (1996) relataram caso de decapitação em espermatozoides de um reprodutor suíno. Este animal apresentava o testículo direito alojado na bolsa escrotal, porém, o esquerdo em localização intra-abdominal. Observaram também que as caudas sem cabeça apresentavam índice de motilidade igual a 25%. Nos estudos de espermiogênese, verificaram que os centríolos falharam em conectar-se ao núcleo.

Toyama et al. (2000) estudaram a ultra-estrutura de cabeças e flagelos de espermatozoides humanos decapitados e observaram uma série de alterações na ultra-estrutura tanto das cabeças sem cauda quanto das caudas decapitadas. Observaram também anormalidades graves nas espermátides coletadas por punção testicular. Os autores concluíram que as caudas devem ter se separado das cabeças antes ou após a completa formação da cauda. No entanto, não conseguiram explicar porque o centríolo proximal falhou no conectar-se ao núcleo.

Vários autores que têm investigado a ação contraceptiva dos diferentes extratos da *C. papaya* têm concluído que a motilidade espermática é sim fator crucial para que o espermatozoide alcance o óvulo para fecundá-lo e, portanto, qualquer fator que leve à diminuição significativa desta característica pode levar à infertilidade do macho (CHINOY; GEORGE, 1983; UDOH; ESSEIN; UDOH, 2005; LOHIYA et al., 2008). Oderinde et al. (2002) também sugerem, com base nos resultados por eles obtidos, que a perda ou a diminuição acentuada da motilidade resulta na perda da fertilidade. Estes dados reforçam nossa teoria de que o tratamento não alterou a motilidade dos espermatozoides que não sofreram decapitação.

Conclusão

A papaína na dose e no tempo de tratamento empregados neste experimento produziram resultados que permitem concluir que: Não houve alteração da libido dos machos tratados. Não houve comprometimento da habilidade do macho para a cópula. A dose utilizada no tempo de tratamento empregado não induziu toxicidade clínica nem reprodutiva. O tratamento como foi praticado não interferiu na reprodução dos animais tratados. A presença de cabeças e caudas espermáticas separadas no ejaculado não é suficiente para resultar na esterilidade do macho.

Tabela 1- Resultado dos acasalamentos de machos tratados com papaína e controle

♀\♂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1														11	0		
2												11	0				
3	0	0															
4						13		10									
5									14	8				0			12
6																12	0
7				16	0							0	0				
8			0								0						
A	11																
B		12															

Os números indicam a quantidade de filhotes (i.e. significa que o acasalamento resultou em prenhez e nascimento)

0- fêmea não prenhe

A e B- machos controle

Tabela 2- Índices reprodutivos de machos tratados com papaína (n = 8) e controle (n = 2) acasalados com fêmeas não tratadas (n = 17)

Eventos	Machos tratados								Machos controle	
	1	2	3	4	5	6	7	8	A	B
Nº acasalamentos	02	02	02	02	04	02	04	02	01	01
♀ com EV + (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
♀ prenhes	1	1	0	2	3	1	1	0	1	1
fertilidade individual ♂ (%)	50	50	0	100	75	50	25	0	100	100
fertilidade do grupo ♂ (%)					45					100

EV + - esfregaço vaginal com presença de espermatozóide

Referências

- ADEBIYI, A.; ADAIKAN, P.G; PRASAD, R.N.V. Papaya (*Carica papaya*) consumption is unsafe in pregnancy: fact or fable? Scientific evaluation of a common belief in some parts of Asia using a rat model. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.199-203, 2002.
- CHINOY, N.J.; GEORGE, S.M.; Introduction of sterility in male rats by low dose *Carica Papaya* seed extract treatment. **Acta Eur Fertil**, v.14, n.6, p.425-432. Nov-Dec., 1983.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri: Manole, 2004.
- ITAYA, M.; YAKUKO, E. **Formulário médico farmacêutico**. 2 ed., 2002.
- LINDER, R.E. et al. Evaluation of reproductive parameters in adult male Wistar rats after

subchronic exposure (gavage) to benomyl.

Journal Toxicol Environ Health, v.25, n.3, p.285-298, 1988.

LOHIYA, N.K.; GOYAL, R.B. Antifertility investigations on the crude chloroform extract of *Carica papaya* Linn seeds in male albino rats.

Indian J. Exp. Biol., v.30, n.11, p.1051-1055. Nov., 1992.

LOHIYA, N.K. et al. Antifertility effects of aqueous of *Carica papaya* seeds in male rats. **Planta Med.** v. 60, n.5, p.400-404. Oct., 1994.

LOHIYA, N.K. et al. Reversible contraception with chloroform extract of *Carica papaya* Linn. seeds in male rabbits. **Reprod toxicol.** v.13, n.1, p.59-66. Jan./Feb., 1999.

LOHIYA, N.K. et al. Efficacy trial on the purified compounds of the seeds of *Carica papaya* for male contraception in albino rat. **Reprod Toxicol.** v.20, n.1, p.135-148. May, 2005.

LOHIYA, N.K. et al. Sperm motility inhibitory effect of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in langur monkey, *Presbytis entellus entellus*. **Asian J Androl**, v.10, n.2, p.298 -306, Mar., 2008

MARCONDES, F.K; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol.** v.2, n.4, p.609-614, Nov., 2002.

MARUO, V.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Toxicological evaluations of long-term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hil fruits in male and female adult rats. **Phytomedicine**, v. 10, n.1, p.48-52, 2003.

ODERINDE, O. et al. Abortifacient Properties of Aqueous Extracts of *Carica papaya* (Linn) Seed on Female Sprague- Dawey Rats. **Niger Postgrad Med.**, p.95-98, 2002.

PATHAK, N. et al. Sterility due to inhibition of sperm motility by oral administration of benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in rats. **Phytomedicine**, v.7, n.4, p.325-333. Jul., 2000.

TOYAMA, Y.; ITOH, Y. Ultrastructural features and pathogenesis of decapitated spermatozoa in a boar. **Andrologia**, v.28, n.2, p.109-115, 1996.

TOYAMA, Y. et al. Decapitated and decaudated spermatozoa in man, and pathogenesis based on the ultrastructure. **Int J. Androl**, v.23, n.2, p.109-115, 2000.

UDOH, P.; ESSEIN, I.; UDOH, F. Effects *Carica papaya* (paw paw) Seeds Extracts on the

Morphology of Pituitary- Gonadal Axis of Male Wistar Rats. **Phytoterapy Research**, v.19,p. 1065-1068, 2005.

VERMA, R.J.; CHINOY, N.J. Effects of *Carica papaya* seed extract on microenvironment of cauda epididymis. **Asian J. Androl**, v.3, p.143-146, 2001.