

ELIZABETH LOPES DE OLIVEIRA

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA FOLHA DE *Renealmia pycnostachys* PROMOVE VASODILATAÇÃO PENIANA ASSOCIADA À REDUÇÃO DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS EM CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48a  
2018  
Oliveira, Elizabeth Lopes de, 1989-  
Extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys*  
promove vasodilatação peniana associada a redução de  
parâmetros espermáticos em camundongos Swiss / Elizabeth  
Lopes de Oliveira. – Viçosa, MG, 2018.  
vi, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Túbulos seminíferos - Análise. 2. Reprodução. 3. Plantas  
medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 573.655

ELIZABETH LOPES DE OLIVEIRA


**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA FOLHA DE *Renealmia pycnostachys* PROMOVE VASODILATAÇÃO PENIANA ASSOCIADA À REDUÇÃO DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS EM CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2018.



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo



Sirlene de Souza Rodrigues Sartori



Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

Dedico a Deus por toda força concedida.

Ao meu esposo, familiares e amigos por todo apoio.

Ao meu Orientador pela confiança, amizade e  
por todos os ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todo amparo e força nas horas difíceis, por me segurar e não deixar desistir.

Ao meu marido Willian, por toda paciência, companheirismo e dedicação. À minha mãe Graça, pelas orações e sua fé inabalável. Ao meu pai Paulo e meus irmãos, Eliane, João Paulo e Gabriela, por sempre estarem presentes.

Ao meu orientador Sérgio Luis Pinto da Matta pelo conhecimento, confiança, paciência, atenção e pela oportunidade de fazer o mestrado. Às meninas orientadas por ele: Viviane, Janaina, Amanda, Grasielle, Diane e Hiviny, obrigada por toda ajuda ao longo desses dois anos, sozinha seria impossível.

À Fernanda Dias, por todo apoio desde o início, pela amizade. Obrigada por ser essa pessoa humilde e extraordinária, aprendi muito com você. À Ana Luiza Martins, por ser minha dupla, pelo companheirismo, confiança e por fazer aquele fixador maravilhoso.

À professora Kyvia Lugate, por fornecer a planta para o experimento, obrigada pela confiança.

Ao laboratório 333 e todos os que fazem parte dele. Obrigada pelo acolhimento, pelas horas de trabalho pesado e de descontração.

À Roberta Ribeiro e Wellington Soares, pelo auxílio nesta reta final.

À minhas amigas, Rita Corrêa e Ana Paula Pereira, por sempre me escutarem.

Aos laboratórios, de Biodiversidade, coordenado pelo Professor João Paulo Viana Leite, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e o laboratório de nutrição animal, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa por conceder o espaço e equipamentos para o processamento da planta. À Universidade Federal de Viçosa e o Departamento de Biologia Geral, por oferecer toda estrutura necessária para realização deste trabalho.

À agência de fomento CAPES, pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Afrodisíacos.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Plantas e reprodução.....</b>	<b>4</b>
<b>3.3 <i>Renealmia pycnostachys</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>3.4 Organização testicular.....</b>	<b>6</b>
<b>3.5 Espermatogênese.....</b>	<b>7</b>
<b>3.6 Estresse oxidativo.....</b>	<b>8</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## RESUMO

OLIVEIRA, Elizabeth Lopes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Extrato hidroalcoólico da folha de *renealmia pycnostachys* promove vasodilatação peniana associada à redução de parâmetros espermáticos em camundongos swiss.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

O gênero *Renealmia* pertence à família Zingiberaceae e abrange um conjunto de espécies dadas como raras e ameaçadas de extinção. A espécie *Renealmia pycnostachys* é representada apenas pelo espécime tipo coletado no Sudeste de Minas Gerais e é utilizada na cultura popular como afrodisíaco. Baseado nessas informações, tivemos como objetivo avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* sobre as porções gametogênica e androgênica testicular, nos corpos cavernosos do pênis e nos níveis de testosterona sérica. Camundongos Swiss adultos (n=28) foram divididos em 4 grupos: Controle (água) e 3 grupos recebendo doses diárias do extrato da folha (100, 200 e 400 mg/Kg) por 42 dias. Observamos que o extrato não alterou os parâmetros biométricos, corporal e testicular, percentual e volume dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático. Nos grupos tratados com o extrato da folha tivemos aumentos do diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, diâmetro de lume, área de túbulo, epitélio e lume e redução no comprimento de túbulo seminífero total. Verificamos aumento no número corrigido de células de Sertoli por grama de testículo, enquanto que a capacidade suporte diminuiu levando a uma redução na produção espermática diária por testículo e por grama de testículo. Somente a histopatologia leve do túbulo seminífero foi observado. Verificamos no intertúbulo aumento no percentual do citoplasma de Leydig e de células de Leydig, além de redução no percentual de tecido conjuntivo. Houve aumento de gotículas de lipídeos no citoplasma das células de Leydig. Observamos o aumento da testosterona sérica, óxido nítrico peniano e corpos cavernosos no pênis. Podemos comprovar que a folha de *Renealmia pycnostachys* apresenta efeito afrodisíaco sem causar danos à microestrutura testicular ou desequilíbrio redox.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Elizabeth Lopes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Hydroalcoholic extract from *renealmia pycnostachys* leaf promotes peniana vasodilatation associated with the reduction of sperm parameters in swiss mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

The *Renealmia* genus belongs to the Zingiberaceae family and covers a number of rare and endangered species. The species *Renealmia pycnostachys* is represented only by the type of collective specimen in the Southeast of Minas Gerais and is used in the popular culture as an aphrodisiac. Based on these informations, we aimed to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of the leaf of *Renealmia pycnostachys* on the gametogenic and androgenic portions of the testicular, cavernous bodies of the penis and serum testosterone levels. Adult Swiss mice (n = 28) were divided into 4 groups: control (water) and three daily higher doses of leaf extract (100, 200 and 400 mg / kg) for 42 days. We observed that the extract did not alter the biometric parameters, body and testicular, percentage and volume of tubular components and tubulesomatic and epitheliosomatic indexes. The groups treated with the leaf extract had increases in the tubular diameter, height of the seminiferous epithelium, lumen diameter, tubule area, epithelium and lumen and reduction in the length of the total seminiferous tubule. We found an increase in the corrected number of Sertoli cells per gram of testis, while the support capacity decreased, leading to a reduction in daily sperm production per testis and gram of testis. Only the mild histopathology of the seminiferous tubule was observed. We verified in the intertubule an increase in the percentage of the Leydig cytoplasm and Leydig cells, in addition to a reduction in the percentage of connective tissue. There was an increase in lipid droplets in the Leydig cell cytoplasm. We observed increased serum testosterone, penile nitric oxide, and cavernous bodies in the penis. We can verify that the leaf of *Renealmia pycnostachys* presents aphrodisiac effect without causing damage to the testicular microstructure or redox imbalance.



## 1. Introdução Geral

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), grande parte da população mundial depende de medicamentos de origem vegetal para os cuidados primários de saúde (ALOK *et al.*, 2013). Porém, para que as espécies vegetais sejam consideradas medicinais, devem apresentar substâncias de ação farmacológica que atuem, direta ou indiretamente como medicamento, sendo necessário que sua autenticidade, integridade e pureza sejam comprovadas (MACHADO, 2009). Por essa razão, os pesquisadores voltaram a atenção para o estudo das plantas e seus possíveis efeitos.

O uso de plantas como estimulante sexual se tornou uma prática comum entre os homens, principalmente para questões associadas à disfunção erétil (DE), quando a condição de atingir e manter a ereção se torna algo difícil (PATEL *et al.*, 2011). Muitas plantas brasileiras têm apresentado potencial farmacológico promissor relacionado a funções reprodutivas, atuando positivamente no tecido testicular e em células espermáticas (FAROMBI *et al.*, 2013). Por isso, a necessidade de regulamentar e avaliar os efeitos no trato reprodutivo masculino dos compostos de origem vegetal é importante, pois, dependendo da planta, pode levar a alterações na taxa de fertilidade masculina (CREASY, 2003).

A procura por fitoterápicos que possuam efeito afrodisíaco e que ao mesmo tempo reduzam a produção espermática sem causar danos ao órgão reprodutor masculino é muito grande. Este estudo visou avaliar os efeitos afrodisíacos da *Renalmia pycnostachys* seguindo indicações da população local. Tendo em vista que esta planta é citada como provavelmente extinta (MAAS, 1977), sendo representada apenas pelo espécime tipo coletado no Sudeste de Minas Gerais, entende-se a necessidade de se avaliar seus efeitos e conhecer suas características fitoquímicas. Assim, este é o primeiro trabalho que descreve os efeitos da folha em órgãos reprodutores masculinos, visando analisar a biometria, estereologia, patologia e estresse oxidativo testicular.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos de doses crescentes do extrato hidroalcoólico da folha de *R. pycnostachys* em camundongos adultos, sobre as porções gametogênica e androgênica testicular, nos corpos cavernosos do pênis e no sangue, através de investigação de mudanças morfológicas, histométricas e hormonais.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos e liofilizados de *R. pycnostachys*;
- Medir o diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, diâmetro nuclear das células de Leydig;
- Determinar a proporção volumétrica e volume dos componentes dos túbulos seminíferos e intertúbulo e das células em estágio I do ciclo do epitélio seminífero;
- Avaliar a morfometria de célula de Sertoli
- Calcular a área tubular, luminal e epitelial;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
- Determinar o comprimento total dos túbulos seminíferos e a produção espermática diária por grama de testículo;
- Avaliar alterações histopatológicas no testículo causadas pelo extrato de *R. pycnostachys*;
- Mensurar a atividade das enzimas antioxidantes, malondialdeído e óxido nítrico (ON) nos testículos;
- Analisar a morfometria do pênis, quantificar seus componentes e dosar o óxido nítrico;
- Medir a concentração da testosterona sérica.

### **3. Fundamentação teórica**

#### **3.1. Afrodisíacos**

Os afrodisíacos têm sido utilizados desde as culturas antigas até os dias atuais, de forma bastante ampla. Nas culturas antigas do Egito, China, Grécia, Roma e Arábia, todos usaram uma certa quantidade de estimulantes em sua vida, mas a forma pela qual eles eram administrados ainda permanece desconhecida (ELFERINK, 2000). Os povos antigos Incas e Astecas levavam a moralidade sexual muito a sério, sendo a concepção o centro de sua cultura. Assim, a falta de filhos se tornaria uma desgraça para um casal e, por tal motivo e também para melhorar o desempenho sexual, os afrodisíacos sempre foram pesquisados e valorizados pela cultura popular da época (ELFERINK, 2000).

O termo afrodisíaco originou-se da palavra grega Afrodite, a Deusa do amor e da beleza, sendo usado amplamente para quem busca melhorar a vida sexual e as disfunções eréteis (DE), comumente chamadas de impotência (ALOK, 2013). Os afrodisíacos são divididos em duas classes: aqueles que têm efeito através de estímulos visuais, por tato, olfato e fonético, constituindo os estímulos psicofisiológicos, e ainda os que são preparados, como alimentos, bebidas e as famosas porções do amor (MALVIYA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2013).

A classificação dos afrodisíacos pode ser feita de acordo com o seu funcionamento, e são divididos em três tipos: os que aumentam a libido, o prazer sexual e a potência (SANDRONI, 2001). As substâncias que melhoram o desempenho sexual dos órgãos genitais, tanto masculinos como femininos, foram inclusas, ampliando a sua definição (SHAMLOUL, 2010; MELNYK e MARCONE, 2011). Sua ação se dá através de substâncias estimulantes, agindo no sistema nervoso central, onde o neurotransmissor específico ou concentrações de hormônios sexuais são alterados. Estas substâncias provocam mudanças na fisiologia do pênis, induzindo a vasodilatação e, conseqüentemente, a ereção. Em sua maioria, causam aumento de testosterona sendo assim mais usadas pelos homens, porém podem ter eficácia em mulheres (SANDRONI, 2001).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o uso de afrodisíacos sintéticos é lesivo à saúde e seu uso indiscriminado pode provocar vasodilatação em outras partes do corpo, causando dores de cabeça e desmaio, sendo que outros efeitos podem ser observados se forem ingeridas doses maiores (ALOK *et al.*, 2013). Desse

modo, outras fontes naturais são necessárias e assim, grande parte da população faz uso de fitoterápicos como afrodisíacos, sendo necessário chamar a atenção para que seja de forma segura.

### 3.2. Plantas e reprodução

O desempenho sexual é importante para a qualidade de vida e bem estar. Atualmente, vários fatores como a obesidade, ansiedade e uso exagerado de medicamentos sintéticos podem interferir e aumentar os riscos de desenvolver problemas sexuais. Tais problemas estão ligados ao desejo sexual e à disfunção erétil (DE) (ALOK *et al.*, 2013). Várias civilizações utilizavam plantas como uma fonte natural, segura e valiosa na tentativa de melhorar ou resolver esses problemas (ALOK *et al.*, 2013). Os historiadores registraram essas plantas que tinham o potencial afrodisíaco e, através de experimentos, várias delas já foram avaliadas, comprovando suas propriedades no aumento da libido e do desempenho sexual (SINGH *et al.*, 2013).

Podemos citar o extrato aquoso de *Tribulus terrestris* (TT) que é muito conhecida na China e na Índia pelas suas propriedades medicinais. Animais que utilizaram TT mostraram melhora do desempenho sexual, bem com o aumento da frequência de monta (GAUTHAMAN *et al.*, 2002). O extrato etanólico de *Abelmoschus manihot* apresentou efeito anabólico e espermatogênico em camundongos albinos suíços (REWATKAR *et al.*, 2010), nas duas doses administradas, 100 mg/kg e 200 mg/kg, houve o aumento na contagem de espermatozoides, ereção do pênis e aumento da frequência de monta. A dose de 200 mg/kg de peso corporal apresentou aumento das funções sexuais sem qualquer efeito colateral.

Extratos aquosos e liofilizados das raízes de *Espargos racemosus*, *Chlorophytum borivilianum* e o rizoma de *Curculigo orchioides* tiveram efeito no ganho de peso corporal e dos órgãos reprodutores, variação no comportamento sexual, ereção peniana melhorada e o tempo de hesitação reduzido, indicando atração em relação às fêmeas (THAKUR *et al.*, 2009). Sementes de *Terminalia catappa* estimularam ação afrodisíaca intensa, havendo o prolongamento da ejaculação, mas nenhum efeito atuando na libido embora, em doses maiores, inibiu reversivelmente todos os parâmetros comportamentais sexuais (RATNASOORIVA e DHARMASIRI, 2000).

Embora muitas plantas tenham efeito afrodisíaco, algumas apresentam efeitos inibidores da espermatogênese sendo cotadas como possíveis anticoncepcionais

masculinos. Estudos realizados com plantas mostraram resultados negativos a respeito da fertilidade masculina, causando efeitos sobre os espermatozoides. Um exemplo disso é a *Pfaffia glomerata* que promoveu redução do número de espermátides resistentes levando a um prejuízo na produção de espermatozoides, culminando na diminuição de espermatozoides no epidídimo, além de espermatozoides morfológicamente anormais o que resultou em perda embrionária (DIAS, 2018). No entanto outras plantas também já apresentaram este efeito como o *Hibiscus sabdariffa* (ORISAKWE *et al.*, 2004), *Cannabis sativa* (MANDAL e DAS, 2010), *Dendrophthoe falcata* (GUPTA *et al.*, 2007) e *Allium sativum* (HAMMAMI *et al.*, 2008), dentre outras.

Muitos acreditam que o uso das plantas como afrodisíacos é uma forma segura por não possuírem efeitos colaterais (DUMESTRE *et al.*, 2002; VENHUIS *et al.*, 2008). Porém, como o uso excessivo pode acarretar problemas, pesquisadores investigam os efeitos das plantas com tal potencial, a fim de determinar seus efeitos e futuramente desenvolver formulações naturais que possam ser eficazes em tratamentos relacionados à disfunção sexual sem prejuízos à saúde (ALOK *et al.*, 2013).

### **3.3. *Renealmia pycnostachys***

*Renealmia pycnostachys* pertence à família Zingiberaceae e gênero *Renealmia*, as espécies deste gênero são classificadas de acordo com as suas características morfológicas (JANNES, 2008). São plantas terrestres, medindo de 1 a 3 m de altura, em alguns casos podendo chegar a 6 m, estando quase todas inseridas em regiões de floresta úmida e geralmente ocupando áreas abertas (MASS, 1977). São encontrados exemplares deste gênero na África, México, Cuba, Bahamas e Brasil (MASS, 1977). Foram catalogadas 87 espécie deste gênero, sendo ao menos 14 conhecidas pela população devido ao seu uso medicinal (NEGRELLE, 2015). Os preparados medicinais incluem toda a planta, e os modos de utilização são variados, podendo ser feitos infusos, banhos, extratos e pastas, e sua comercialização é em nível regional (NEGRELLE, 2015). Em geral, há um amplo espaço para o conhecimento químico e farmacológico a ser descoberto quando se refere às espécies de *Renealmia* em tratamentos de enfermidades (NEGRELLE, 2015).

De acordo com Mass (1977), um conjunto de espécies de plantas do gênero *Renealmia* são dadas como raras, encontradas em ambientes de elevado grau de deterioração, sendo classificadas como ameaçadas de extinção. *R. pycnostachys* é

endêmica no Brasil, com domínio fitogeográfico na Mata Atlântica, sendo citada como provavelmente extinta, e representada apenas pelo espécime tipo coletado no Sudeste de Minas Gerais (MASS, 1977). Na região da Serra do Brigadeiro, município de Muriaé (MG), *R. pycnostachys* é conhecida como pacová.

Pouco se sabe sobre a espécie *R. pycnostachys* porém, de acordo com o conhecimento popular, o fruto desta planta é muito utilizado por ter efeito afrodisíaco e ser estimulante sexual masculino, pois suas sementes assemelham-se a espermatozoides, pela etnobotânica, essa semelhança mostra onde a planta atua no organismo e outras partes desta planta poderia ter efeitos semelhantes. Outras plantas do gênero apresentam efeito fitoterápico confirmado como analgésico, antiácido, antibruxismo, antinauseante, antifúngico, calmante, cicatrizante, desinfetante de feridas, inseticida e laxante (NEGRELLE, 2015).

Como já foi citado, tem havido aumento na procura de tratamentos naturais pela população, devido ao fato de que as drogas sintéticas disponíveis no mercado para o tratamento de disfunções sexuais masculinas apresentam efeitos colaterais indesejáveis, um alto custo e por acreditarem que por serem naturais, os derivados vegetais não apresentam malefícios à saúde (DUMESTRE *et al.*, 2002; VENHUIS *et al.*, 2008). Diante disso, o estudo dos efeitos da *R. pycnostachys* se torna fundamental para que o uso seja de forma sustentável e haja a conservação da espécie, visto que já havia sido classificada como extinta (NEGRELLE, 2015). Assim, haverá contribuição para o conhecimento dos seus possíveis efeitos no organismo e quais compostos secundários causam esses efeitos e, desta forma, não perder a fonte farmacológica que esta espécie pode proporcionar.

### **3.4 Organização testicular**

Os testículos são órgãos pares com atividade tanto exócrina como endócrina, sendo responsáveis pela produção de espermatozoides e hormônios que mantêm a função reprodutiva e as características masculinas (RUSSELL e FRANÇA, 1995). Os testículos são envoltos pela albugínea, uma túnica espessa constituída de tecido conjuntivo denso, que envia septos para o interior do parênquima dividindo o testículo em lóbulos (RUSSELL *et al.*, 1990).

Em cada lóbulo encontramos os túbulos seminíferos que são constituídos pela túnica própria contendo as células mioides, epitélio seminífero, lúmen tubular e o fluido secretado pelas células de Sertoli. Duas populações distintas de células compõem o

epitélio seminífero: as células germinativas e as células de Sertoli (KARL e CAPEL, 1998). As células germinativas formam os espermatozoides, enquanto que as células de Sertoli sustentam o processo da espermatogênese (RUSSELL e FRANÇA, 1995). Como os túbulos seminíferos não são vascularizados ou inervados, as células de Sertoli nutrem as células germinativas em desenvolvimento e as células mioídes, que possuem características de célula muscular lisa, são responsáveis pela contração dos túbulos seminíferos (RUSSELL *et al.*, 1990; OLIVEIRA e ALVES, 2015).

O compartimento intertubular é constituído por tecido conjuntivo frouxo, possuindo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células de Leydig e células próprias deste tecido, como os fibroblastos e macrófagos. Os túbulos são responsáveis pela produção de espermatozoides, estabelecendo sua função exócrina (NAVARRO *et al.*, 2004), enquanto que as células de Leydig são responsáveis pela produção e secreção da testosterona, responsável pela manutenção da espermatogênese e fertilidade. Parte deste hormônio vai para a circulação sanguínea e mantém as características sexuais secundárias masculinas, sendo responsável pela função endócrina do testículo (SHARPE *et al.*, 1990).

### **3.5 Espermatogênese**

Os espermatozoides são produzidos dentro dos túbulos seminíferos através do processo denominado espermatogênese. Este processo envolve divisões mitóticas e meióticas, remodelação celular, sendo dividido em três etapas ou fases: a fase proliferativa, onde as espermatogônias se dividem por divisões mitóticas; meiótica, onde cada espermatócito dá origem a 4 espermátides; e a espermiogênese, onde ocorre a diferenciação das espermátides em espermatozoides (RUSSELL *et al.*, 1990; SHARPE, 1994; SHARMA e AGARWAL, 2011).

As células de Sertoli contribuem para a adequação de um ambiente especializado para que a espermatogênese ocorra (DE KRETZER *et al.*, 1998). Elas se apresentam ligadas por junções de oclusão constituindo a barreira de célula de Sertoli, separando o epitélio em dois ambientes: o primeiro chamado ambiente basal onde se encontram as espermatogônias e espermatócitos primários em preleptóteno e o segundo, chamado ambiente adluminal, onde encontram-se os espermatócitos primários, secundários e as espermátides em diferentes níveis de diferenciação (RUSSELL *et al.*, 1990; MORAIS *et al.*, 2016).

Todo o processo da espermatogênese é regulado por hormônios. O hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) é produzido no hipotálamo e estimula a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) na hipófise. O FSH monitora as funções das células de Sertoli, estimulando a síntese da proteína ligante de andrógeno (ABP), ativina e inibina. O LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig. A secreção da inibina produzida pelas células de Sertoli inibe a secreção de FSH, enquanto a testosterona atua na hipófise diminuindo a liberação de LH (O'DONNELL *et al.*, 2001; KIERSZENBAUM, 2008; SALTZMAN *et al.*, 2010).

### 3.6. Estresse Oxidativo

O conceito de estresse oxidativo é definido como desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) (SIES, 1985) e a neutralização dos seus efeitos é realizada pelo sistema de defesa antioxidante do organismo (PERSSON *et al.*, 2014). EROs / ERNs são utilizadas coletivamente para definir radicais fortemente reativos de oxigênio e nitrogênio, assim como os derivados não radicais. (GODIC *et al.*, 2014). Os radicais livres são os átomos ou moléculas que possuam um ou mais elétrons desemparelhados na última camada de valência, tornando-o altamente reativo, fazendo com que reajam com outros elementos ou estruturas celulares. São constituídos pela perda ou ganho de um elétron de outro componente (VANNUCCHI *et al.*, 1998).

A hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) é o radical livre mais deletério ao organismo, sendo formado pela reação de peróxido de hidrogênio, causando danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares. O radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) atua na produção do radical hidroxila, porém, também atua na defesa do organismo contra infecções. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) atravessa facilmente as membranas celulares e pode gerar o radical  $\text{OH}^\cdot$ . O óxido nítrico (ON) por si só não causa danos à célula, porém pode reagir com o  $\text{O}_2^\cdot$  e gerar agentes com capacidade de alterar a estrutura de proteínas (BARREIROS *et al.*, 2006).

Existem no organismo três sistemas de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST) e, por meio destes sistemas, a concentração de EROs é mantida dentro dos limites fisiológicos, formando assim o mecanismo antioxidante enzimático (RIBEIRO *et al.*, 2005). SOD catalisa enzimaticamente  $\text{O}_2^\cdot$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DROGE, 2002), ao passo que CAT é encarregada de decompor  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (AEBI, 1984). GST participa da desintoxicação celular



contra substâncias exógenas, por meio de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídicos que são produzidos na peroxidação lipídica (HABIG *et al.*, 1974; HERMES-LIMA, 2004).

O malondialdeído (MDA), produzido pela oxidação lipídica, é um importante sinalizador de estresse oxidativo, pois, a produção de peróxido e superóxidos de hidrogênio começa pela formação de radicais de ácidos graxos. Por isso, o MDA é utilizado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras (JANERO, 1990).

#### 4. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121–126, 1984.
- ALOK, S.; RATENDRA, K; RAMANDEEP, S. Nature's Aphrodisiacs - A Review of Current Scientific Literature. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*. 2(3):1 - 20, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*. 1(29): 113–123, 2006.
- CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 5(68):408-415, 2003.
- DE KRETZER, D.M., LOVELAND, K.L., MEINHARDT, A., SIMORANGKIR, D., WREFORD, N. Spermatogenesis. *Human reproduction*. 13:1-8, 1998.
- DIAS, F.C.R. Extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen interfere em parâmetros reprodutivos e fertilidade de camundongos machos adultos. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa. P. 157, 2018.
- DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. 1(82): 47-95, 2002.
- DUMESTRE T.V.; CIRIMELE, V.; GROMB, S.; BELOUSSOFF, T.; LAVAUULT, D.; LUDES B.; KINTZ, P. Last performance with VIAGRA: post-mortem identification of sildenafil and its metabolites in biological specimens including hair sample. *Forensic Science International*. 1(126):71-76, 2002.
- ELFERINK, J. G. R. Aphrodisiac use in pre-Columbian Aztec and Inca cultures. *Journal of the History of Sexuality*. 9:25–36, 2000.
- FAROMBI E.O.; ADEDARA I. A.; OYENIHI A.B; EKAKITIE E.; KEHINDE S. Hepatic, testicular and spermatozoa antioxidant status in rats chronically treated with *Garcinia kolaseed*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2(146):536-542, 2013.
- GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G.; PRASAD, R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sciences*. 12(71):1385–1396, 2002.

- GODIC, A.; POLJAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014:1-6, 2014.
- GUPTA R.S; KACHHAWA J.B.; SHARMA A. Effect of methanolic extract of *Dendrophthoe falcata* stem on reproductive function of male albino rats. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 2(7):1–13. 2007;
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 22:(249): 7130-7139, 1974.
- HAMMAMI, I.; NAHDI, A.; MAUDUIT, C. BENAHMED, M.; AMRI, M.; AMAR, A.B.; ZEKRI, S.; MAY, A. E.; MAY, M.V.E. The inhibitory effects on adult male reproductive functions of crude garlic (*Allium sativum*) feeding. *Asian Journal of Andrology*. 4(10):593-601, 2008.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: WILEY & SONS, J., HOBOKEN, N. J. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Ed. K. B. Storey, p. 640, 2004.
- JANERO D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 6(9):515-540, 1990.
- JANNES, M. Systematics and biogeography of *Renealmia* l.f. (Zingiberaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Dissertação (Mestrado em Botânica Sistemática e Evolução)*. Universidade de Oxford, Inglaterra, P. 28, 2008.
- KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cell of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*. 2(203):323-333, 1998.
- KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Cap. 20: Espermatogênese. 2ª edição. Ed. Elsevier, p. 573-595, 2008.
- MAAS, P.J.M. *Renealmia* (Zingiberaceae- Zingiberoideae). *Costoideae* (Additions) Zingiberaceae). *Flora Neotropica, Monograph*. 18, 1-218, 1977.
- MACHADO, L.H.B. As representações entremeadas no comércio de plantas medicinais em Goiânia/GO: uma reflexão geográfica. *Sociedade & Natureza*. 1(21):159-172, 2009.

- MALVIYA, N.; JAIN, S.; GUPTA, V.B.; VYAS, S. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction--a review. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 1(68):3-8, 2011.
- MANDAL T.K; DAS N.S. Testicular toxicity in *Cannabis* extract treated mice: association with oxidative stress and role of antioxidant enzyme systems. *Toxicology and Industrial Health*. 1(26):11–23, 2010.
- MELNYK, J. P.; MARCONE, M. F. Aphrodisiacs from plant and animal sources - A review of current scientific literature. *Food Research International*. 4(44):840-850, 2011.
- MORAIS, A.C.T; BALARINI, M.K.; MENEZES, T.P.; FERRAZ, F.S.; GOMES, M.L.M.; MORAIS, D.B.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P. Germ cells and the seminiferous epithelium cycle in the wild rodent *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 4(11):61-71, 2016.
- NAVARRO, R.D.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D. Efeito da exposição pré e pós-natal ao ultrassom de baixa densidade sobre a célula de Leydig e demais componentes do espaço intertubular do testículo de camundongos adultos. *Revista Ceres*. 296:(51):445-455, 2004.
- NEGRELLE, R.R.B. *Renalmia* L.f.: aspectos botânicos, ecológicos, farmacológicos e agrônômicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2(17):274-290, 2015.
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. 3(22):289-318, 2001.
- OLIVEIRA, P. F.; ALVES, M. G. Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis. Ed. Springer, p. 75, 2015.
- ORISAKWE, O.E; HUSAINI, D.C.; AFONNE O.J. Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa calyx* aqueous extract in rats. *Reproductive Toxicology*. 2(18):295–8, 2004.
- PATEL, D.K.; KUMAR, R.; PRASAD, S.K.; HEMALATHA, S. Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(1):S131-S138, 2011.
- PERSSON, T.; POPESCU, B.O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 1-11, 2014

- RATNASOORIYA, W.D.; DHARMASIRI, M.G. Effects of *Terminalia catappa* seeds on sexual behavior and fertility of male rats. *Asian Journal of Andrology*. 2(3):213-219, 2000.
- REWATKAR, K.K; SHAHZAD, N.; AHMED, A.; KHAN, M.I.; GANESH, N. A landmark approach to aphrodisiac property of *Abelmoschus manihot* (L.). *International Journal of Phytomedicine*. 3 (2):312-319, 2010.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*. 3(21):133149, 2005.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian Spermatogenesis. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Eds.). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida: Cache River Press. p. 1 - 40, 1990.
- RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. *Tissue and Cell*. 2(27):129-147, 1995.
- SALTZMAN, W.; TARDIF, S.D.; RUTHERFORD, J.N. Hormones and reproduction of vertebrates. Chapter 13: Hormones and reproductive cycles in primates. Ed. Elsevier. 5:1-35, 2010.
- SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. *Clinical Autonomic Research*. 5(11):303-307, 2001
- SHAMLOUL, R. Natural aphrodisiacs. *The Journal of Sexual Medicine*. 1(7):39-49, 2010.
- SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. *Sperm Chromatin* , p. 19-44, 2011.
- SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; KERR, J. B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *American Journal of Anatomy*. 1(188):3-20, 1990.
- SHARPE, R. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, p. 1363 - 1434, 1994.
- SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In *oxidative stress*, ed. SIES, H. Academic Press, London. p. 1-8. 1985.

- SINGH, R.; ALI, A.; GUPTA, G.; GOVINDASAMY, J. Some medicinal plants with aphrodisiac potential: A current status. *Journal of Acute Disease*. 3(2):179-188, 2013.
- THAKUR, M; CHAUHAN, N.S.; BHARGAVA, S.; DIXIT, V.K. A Comparative study on aphrodisiac activity of some Ayurvedic herbs in male albino Rats. *Archives of Sexual Behavior*. 6(38):1009-1015, 2009.
- VANNUCCHI E.; MOREIRA E. A. M.; CUNHA D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO M. V. M.; BERNARDES M. M.; JORDÃO JR A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina (Ribeirão Preto Online)*. 1(31):31-44, 1998.
- VENHUIS, B. J.; BLOK-TIP, L.; KASTE, D. Designer drugs in herbal aphrodisiacs. *Forensic Science International*. 2-3(177):25-27, 2008.

# **Extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* promove vasodilatação peniana associada à redução de parâmetros espermáticos em camundongos Swiss**

Elizabeth Oliveira; Sérgio da Matta e colaboradores.

## **INTRODUÇÃO**

O uso de plantas como fitoterápicos para tratar de doenças sempre foi uma atividade corriqueira, mas a farmacologia sintética rompeu essa conexão entre as plantas e a sociedade, criando uma dependência de medicamentos sintéticos (RASKIN e RIPOLL, 2004). Certamente houve melhora no sistema de saúde, podendo estender assim, a vida humana em consequência deste fato. Por outro lado, a medicina passou a considerar o uso de fitoterápicos como um meio alternativo e não científico para tratamento de várias disfunções (CARMONA e PEREIRA, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), boa parcela da população mundial depende de medicamentos de origem vegetal para os cuidados primários de saúde, embora este seja considerado um meio alternativo, (ALOK *et al.*, 2013). Porém, para serem consideradas medicinais as plantas devem apresentar substâncias de ação farmacológica que atuem, direta ou indiretamente, como medicamento, sendo necessário que sua autenticidade, integridade e pureza sejam comprovadas (MACHADO, 2009). Por essa razão, os pesquisadores voltaram sua atenção para o estudo das plantas e seus possíveis efeitos.

Orientações regulamentares discorrem sobre a necessidade de avaliações sensíveis e direcionadas ao trato reprodutor masculino para potenciais efeitos tóxicos dos compostos administrados, mesmo os de origem vegetal, que podem levar a alterações da taxa de fertilidade (CREASY, 2003). Muitas plantas brasileiras têm apresentado potencial farmacológico promissor relacionado a funções reprodutivas, atuando positivamente no tecido testicular (FAROMBI *et al.*, 2013). O uso de plantas como estimulante sexual se tornou uma prática comum, principalmente entre os homens, existindo plantas que são afrodisíacas e têm efeito benéfico para o organismo, como as raízes de *Asparagus racemosus*, *Chlorophytum borivilianum* e o rizoma de *Curculigo orchioides* (THAKUR *et al.*, 2009). Outras plantas não são afrodisíacas, mas possuem efeito na reversibilidade da espermatogênese, como por exemplo *Hippophae*

*rhamnoides* (GOEL *et al.*, 2006) e *Apium graveolens* L. que melhora o processo espermatogênico e também a fertilidade (HARDANI *et al.*, 2015).

Porém, grande parte dos compostos químicos podem se manifestar de forma tóxica no organismo, interferindo nas vias metabólicas ou superando a ausência de um produto metabólico, sendo responsáveis por causar danos (GOEL *et al.*, 2006). Há ainda plantas que diminuem a espermatogênese, mas causam danos ao mesmo tempo, como a *Aegle marmelos* que afeta a estrutura e função das células de Sertoli e de Leydig (CHAUHAN e AGARWAL, 2008). Os xenobióticos podem desencadear lesões teciduais através da desregulação do equilíbrio redox, levando a um quadro chamado estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou nitrogênio (ERNS) e as defesas antioxidantes celulares. Quando em baixas concentrações, as EROS funcionam como mediadores de ajustes celulares. Porém, quando estão em concentrações elevadas provocam injúrias celulares por meio de oxidação de proteínas, lipídios e DNA, causando degeneração que pode evoluir para a morte celular (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Tem havido grande procura por fitoterápicos que possuam efeitos afrodisíacos, que reduzam a produção de espermatozoides, mas que não danifiquem a estrutura testicular, permitindo a reversibilidade. No município de Muriaé, Sudeste de Minas Gerais, populares utiliza embebido na cachaça partes da planta popularmente conhecida como pacová, de nome científico *Renealmia pycnostachys*, e afirmam que esta possui efeito afrodisíaco. *R. pycnostachys* pertence à família Zingiberaceae, gênero Renealmia, e é classificada como provavelmente extinta, existindo apenas nesta localidade (MASS, 1977).

Não há estudos dos efeitos da *R. pycnostachys* e tão pouco de seus constituintes fitoquímicos, porém outras espécies deste gênero já foram estudadas e apresentaram efeitos benéficos à saúde, como analgésico, antiácido, antribruxismo, antinauseante, antifúngico, calmante, cicatrizante, desinfetante de feridas, inseticida e laxante (NEGRELLE, 2015). Baseado na utilização popular de *R. pycnostachys* para o tratamento das disfunções sexuais, este estudo visou avaliar e conhecer os seus potenciais efeitos terapêuticos e a sua possível toxicidade na reprodução de camundongos Swiss adultos machos.

Para isto foram realizadas análises biométricas, morfométricas, estereológicas e patológicas do testículo, além de avaliar o estresse oxidativo testicular, morfometria do pênis e dosagem de testosterona sérica.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e preparação do extrato**

As amostras das folhas de *R. pycnostachys* foram coletadas na fazenda Lar dos Muriquis na Serra do Brigadeiro (20°54'S - 42°32'W) em altitudes variando de 1.010 a 1.380 m, sendo um fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, pertencente ao bioma Floresta Atlântica localizado no município de Muriaé, MG. A preparação do extrato hidroalcoólico da folha foi realizada no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. A folha foi desidratada em estufa (37°C) e colocada em álcool etílico 95% por 48 horas. Em seguida foi submetida a percolação exaustiva com o mesmo solvente, que foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo de pressão reduzida. O extrato foi liofilizado para a completa remoção do solvente no laboratório de nutrição animal do Departamento de Zootecnia da UFV.

### **Grupos experimentais**

Todos os procedimentos experimentais seguiram os padrões determinados pelo CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, sendo aprovado pela CEUA – UFV (Comissão de Ética em Uso de Animais) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo N° 057/2017). Foram utilizados 28 camundongos Swiss machos e adultos, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral com controle de iluminação ambiente (12h claro/ 12h escuro) e temperatura (22±2°C). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=7/grupo). Animais do grupo controle receberam 0,5 ml de água e os animais tratados receberam 0,5 ml do extrato hidroalcoólico da folha *R. pycnostachys* (EHRP) nas dosagens de 100, 200 e 400 mg/kg, num volume de 0,5ml. As doses diárias foram ofertadas por gavagem e ajustadas semanalmente através da pesagem dos animais. O tratamento foi feito por 42 dias, correspondendo ao ciclo reprodutivo do animal.

### **Coleta do material biológico**

Após 24 horas da última gavagem os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), anestesiados com tiopental intraperitoneal (30mg/Kg), o sangue foi retirado por punção cardíaca e foram eutanasiados por exsanguinação. O sangue foi imediatamente centrifugado para obtenção do soro que foi armazenado em microtubos e congelado a -20°C.

Os testículos e pênis foram removidos, sendo o testículo esquerdo fixado em Karnovsky para análises histológicas e o testículo direito congelado em nitrogênio líquido e mantido em ultrafreezer (-80°C) para análise do estado oxidativo. O pênis foi dividido ao meio, sendo corpo utilizado para análise histológica e a base para a dosagem do óxido nítrico (ON).

### **Microscopia de luz**

Fragmentos do pênis e testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), respeitando-se intervalos de 39 µm entre os cortes, e coradas com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) e a morfometria foi realizada através do software Image J (National Institute of Health, USA).

### **Biometria corporal e testicular**

Após fixado, o testículo foi pesado, a albugínea retirada e pesada, descontando seu peso do testículo inteiro. Com o peso corporal e testicular foi calculado então o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula:  $IGS (\%) = (PG / PC) \times 100$ , na qual PC é peso corporal e PG peso total das gônadas.

Através do peso do parênquima testicular (peso testicular – peso da albugínea) e do peso corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) através da equação:  $IPS (\%) = (PP/PC) \times 100$ , onde PP é o peso do parênquima dos dois testículos.

### **Morfometria testicular**

Para calcular a proporção volumétrica dos componentes testiculares foram contados, para cada animal, um total de 2.600 pontos, sendo computados 266 pontos em 10 campos aleatórios das preparações histológicas. Os pontos contabilizados estavam sobre a túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo. Para calcular a proporção volumétrica dos componentes testiculares foi utilizada a seguinte fórmula: Proporção volumétrica (%) = (NT / NTT) x 100, onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT= Número de pontos totais contados.

Os índices tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) foram calculados pelas seguintes formulas:  $ITS = VTS / PC \times 100$  e  $IES = VES / PC \times 100$ , respectivamente, onde VTS= volume de túbulo seminífero e VES= volume de epitélio seminífero. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular.

Para obter o diâmetro tubular médio foram medidos, aleatoriamente, 20 túbulos seminíferos que apresentavam forma mais circular possível. Para a altura do epitélio seminífero, a mensuração se deu pela distância da túnica própria até o lúmen, em duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se as mesmas secções transversais usadas para medir o diâmetro tubular.

Para os cálculos das áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE) foram utilizadas as seguintes equações:  $ART = \pi \cdot RT^2$ , onde RT= raio tubular;  $ARL = \pi \cdot RL^2$ , onde RL= raio luminal;  $ArE = ArT - ArLU$  e a Relação T/E=  $ArT/ArE$ .

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal (DORST e SAJONSKI, 1974). O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula:  $CTT/g = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$ .

O número de células que constituem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo foi obtido a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli, em 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, sendo contados os núcleos dos seguintes tipos celulares: espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários na transição de preleptóteno para leptóteno (PL/L), espermatócitos primários em paquíteno (PAQ) e espermátides arredondadas (EAR), além dos nucléolos de células de Sertoli (SER).

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear médio de 30 células e espessura do corte histológico, excetuando-se as células de Sertoli, das quais foram utilizados os diâmetros nucleolares também de 30 células, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

Onde DM = diâmetro nuclear (nucleolar) médio

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e entre estes números e o número de células de Sertoli no estágio I do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram utilizadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:SGA); rendimento geral da espermatogênese (EAR: SGA); índice meiótico (EAR:PAQ); índice de célula de Sertoli (EAR: SER); capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL/L + PAQ + EAR:SER).

O número de células de Sertoli foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos segundo a fórmula: NCS = Comprimento total de túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}$ ) x Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal / Espessura do corte ( $\mu\text{m}$ ). A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

A produção espermática diária (PED) foi calculada segundo AMANN e ALMQUIST (1961), de acordo com a fórmula: PED = Volume total do túbulo seminífero ( $\mu\text{m}^3$ ) x Número corrigido de espermátides arredondadas / Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias) x Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}^2$ ) x espessura do corte histológico ( $\mu\text{m}$ ). Os valores por grama de testículo foram estimados dividindo a PDE pelo peso testicular.

## **Histopatologia**

A análise histopatológica dos túbulos seminíferos se deu pela contagem, ao acaso, de 200 secções das preparações histológicas. Os túbulos que apresentaram alterações em sua morfologia foram considerados com patologia. A classificação das patologias se deu pelo score de JOHNSEN (1970) modificado, sendo dividido em 8 níveis: **Nível 1**- íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; **Nível 2**- vacúolos na base do epitélio; **Nível 3**- vacúolos no ápice do epitélio; **Nível 4**- vacúolos na base e no ápice do epitélio; **Nível 5**- células espermatogênicas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; **Nível 6**- túbulos apenas com células basais; **Nível 7**- túbulos apenas com células de Sertoli; **Nível 8**- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, caracterizando um estado irreversível de degeneração.

## **Estresse oxidativo**

Para as análises do estresse oxidativo, o testículo direito e o pênis foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e mantidos no ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise ser realizada. O testículo e pênis foram pesados e homogeneizados em  $1000\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de potássio (pH 7.4) e centrifugados a 12000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (ON) no pênis e de enzimas antioxidantes testiculares superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST); concentração de óxido nítrico (ON); Malondialdeído (MDA) e níveis de proteína total. Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A atividade de CAT foi avaliada de acordo com o método descrito por AEBI (1984), onde a taxa de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi medida nos tempos 0, 30 e 60 segundos. A atividade da SOD foi determinada nos sobrenadantes conforme o método descrito por DEL MAESTRO e MCDONALD (1985) e da glutationa S-transferase (GST) pela formação conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Os níveis de malondialdeído (MDA), que é o resultado da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-

tetramethoxypropane (TMPO) (WALLIN, 1993). A concentração do óxido nítrico (ON) foi determinada indiretamente através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (RICART-JANÉ *et al.*, 2002). A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (LOWRY *et al.*, 1951), e utilizada para homogeneização dos dados de estresse

### **Morfometria Intertubular**

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo foi estabelecida pela contagem de 1000 pontos por animal, em imagens do intertúbulo obtidas dos preparados histológicos. Foram contabilizados os pontos incidentes sobre os elementos do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo e citoplasma de Leydig. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula: Proporção volumétrica (%) = (% proporção volumétrica de intertúbulo x % proporção volumétrica do componente no intertúbulo) / 100. O volume (mL) dos componentes do intertúbulo nos testículos foi calculado pela equação: Volume = % do elemento nos testículos x PPT / 100, onde: PPT= peso do parênquima testicular.

Para o cálculo do diâmetro nuclear da célula de Leydig foram medidos 30 núcleos esféricos, com nucléolo e cromatina perinuclear bem definidos. Foram então calculados os volumes ( $\mu\text{m}^3$ ) nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e de cada célula de Leydig (VL) através das seguintes equações:  $VNL = 4/3 \pi R^3$ , onde R= Raio nuclear;  $VCL = \% \text{ de citoplasma} \times VNL / \% \text{ de núcleo}$ ,  $VL = VNL + VCL$ .

O volume ocupado pelas células de Leydig por testículo (VLT) foi calculado pela seguinte equação:  $VLT (\mu\text{L}) = \text{Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular} \times \text{Peso do parênquima testicular (PPT)} / 100$ . O volume das células de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido pela equação:  $(VL/gT) = \text{volume ocupado pela célula de Leydig por testículo (VLT)} / \text{peso bruto dos testículos (PT)}$ . Os números de células de Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLg/T) foram calculados pelas fórmulas:  $NLT = VLT (\mu\text{m}^3) / VL (\mu\text{m}^3)$  e  $NLg/T = NLT / PT$ .

O índice Leydigossomático (ILS), que determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, foi calculado utilizando fórmula:  $ILS = \text{volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos} / PC \times 100$ , onde PC=peso corporal.

### **Testosterona sérica**

As concentrações plasmáticas de testosterona foram obtidas pelo método de quimiluminescência. Utilizou-se o kit Access® Testosterone (Beckman, USA), e as leituras foram realizadas em aparelho Access II (Beckman, USA) sendo os resultados expressos em ng/dL.

### **Morfometria do pênis**

As proporções volumétricas de corpos cavernosos e de tecido conjuntivo foram estimadas a partir da contagem de 2.660 pontos projetados sobre imagens capturadas, utilizando objetiva de 10X, totalizando 10 campos aleatórios nas preparações histológicas transversais do pênis de cada animal. Foram quantificados tecido conjuntivo e corpo cavernoso.

### **Análises Estatísticas**

Os resultados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## **RESULTADOS**

### **Biometria corporal e testicular**

Os dados biométricos, corporal e testicular estão representados na Tabela 1. Os grupos experimentais não apresentaram quaisquer alterações significativas nos parâmetros avaliados.

**Tabela 1.** Parâmetros biométricos, corporais e testiculares de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* (EHRP).

	Controle	EHRP 100 mg/Kg	EHRP 200 mg/Kg	EHRP 400mg/kg
<b>PC (g)</b>	41,97±4,00 <sup>a</sup>	46,48±2,36 <sup>a</sup>	44,11±3,99 <sup>a</sup>	42,54±2,02 <sup>a</sup>
<b>PT(g)</b>	0,24±0,03 <sup>a</sup>	0,27±0,03 <sup>a</sup>	0,24±0,02 <sup>a</sup>	0,22±0,03 <sup>a</sup>
<b>PA (g)</b>	0,024±0,004 <sup>a</sup>	0,028±0,012 <sup>a</sup>	0,037±0,010 <sup>a</sup>	0,028±0,005 <sup>a</sup>
<b>PP (g)</b>	0,21±0,03 <sup>a</sup>	0,24±0,03 <sup>a</sup>	0,20±0,03 <sup>a</sup>	0,19±0,03 <sup>a</sup>
<b>IGS (%)</b>	0,56±0,05 <sup>a</sup>	0,58±0,09 <sup>a</sup>	0,55±0,07 <sup>a</sup>	0,53±0,07 <sup>a</sup>
<b>IPS (%)</b>	0,51±0,05 <sup>a</sup>	0,52±0,07 <sup>a</sup>	0,47±0,08 <sup>a</sup>	0,46±0,07 <sup>a</sup>

PC – Peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP – Peso do parênquima testicular; IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

### Histomorfometria testicular

A microestrutura testicular encontrava-se íntegra e apresentava todos os elementos em todos os grupos. A estrutura tecidual pode ser observada na Figura 1.

Os percentuais e volumes dos componentes tubulares, além dos índices epiteliossomático e tubulossomático, não apresentaram variações entre os grupos experimentais (Tabela 2).

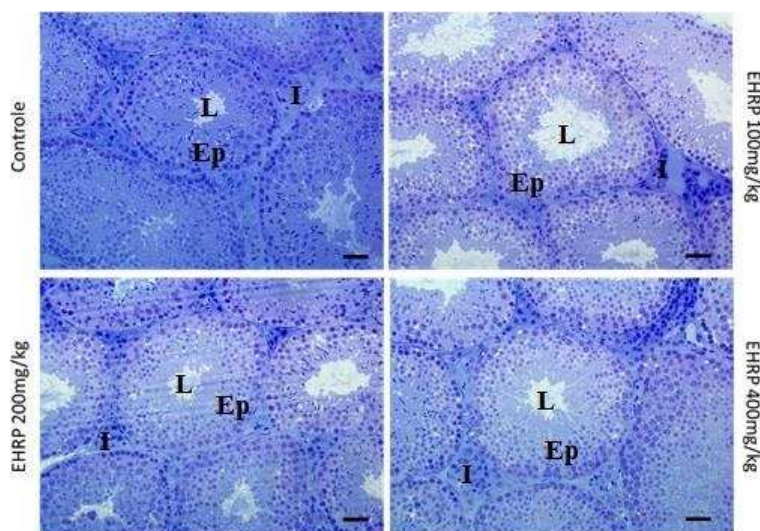


Figura 1: Fotomicrografia testicular dos grupos controle e tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* (EHRP). L- Lume; Ep- Epitélio seminífero; I- Intertúbulo; T- Túnica própria. Barra: 25µm.



**Tabela 2.** Percentual e volume dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático, de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys* (EHRP).

	<b>Controle</b>	<b>EHRP 100 mg/Kg</b>	<b>EHRP 200 mg/Kg</b>	<b>EHRP 400mg/kg</b>
<b>T (%)</b>	88,41±2,58 <sup>a</sup>	90,11±0,68 <sup>a</sup>	87,09±3,13 <sup>a</sup>	87,38±2,79 <sup>a</sup>
<b>E (%)</b>	80,72±2,30 <sup>a</sup>	82,27±1,52 <sup>a</sup>	79,60±2,81 <sup>a</sup>	79,00±40 <sup>a</sup>
<b>TP (%)</b>	1,70±0,38 <sup>a</sup>	1,69±0,11 <sup>a</sup>	1,68±0,18 <sup>a</sup>	1,65±0,08 <sup>a</sup>
<b>L (%)</b>	5,99±1,33 <sup>a</sup>	6,15±0,74 <sup>a</sup>	5,81±1,05 <sup>a</sup>	6,74±0,57 <sup>a</sup>
<b>VT (mL)</b>	0,19±0,03 <sup>a</sup>	0,22±0,02 <sup>a</sup>	0,18±0,02 <sup>a</sup>	0,17±0,03 <sup>a</sup>
<b>VE (mL)</b>	0,17±0,02 <sup>a</sup>	0,20±0,02 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>a</sup>	0,15±0,03 <sup>a</sup>
<b>VTP (mL)</b>	0,0036±0,0010 <sup>a</sup>	0,0041±0,0007 <sup>a</sup>	0,0034±0,0005 <sup>a</sup>	0,0032±0,0006 <sup>a</sup>
<b>VL (mL)</b>	0,013±0,004 <sup>a</sup>	0,015±0,003 <sup>a</sup>	0,012±0,002 <sup>a</sup>	0,013±0,003 <sup>a</sup>
<b>ITS (%)</b>	0,45±0,05 <sup>a</sup>	0,46±0,06 <sup>a</sup>	0,40±0,06 <sup>a</sup>	0,40±0,07 <sup>a</sup>
<b>IES (%)</b>	0,36±0,04 <sup>a</sup>	0,38±0,05 <sup>a</sup>	0,32±0,04 <sup>a</sup>	0,30±0,05 <sup>a</sup>

T- percentual de Túbulo seminífero; E - percentual de epitélio seminífero; TP - Percentual de Túnica Própria; L- Percentual de Lume; VT - Volume de túbulo seminífero; VE - Volume de Epitélio; VTP - Volume de Túnica Própria; VL - Volume de Lume; ITS - Índice Tubulossomático; IES - Índice Epiteliossomático. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

Os parâmetros morfométricos tubulares estão representados na Tabela 3. O diâmetro do túbulo seminífero e a altura do epitélio seminífero aumentaram nos grupos tratados com as doses de EHRP 200 mg/Kg e EHRP 400mg/kg, mas o diâmetro do lume aumentou apenas no grupo EHRP 400mg/kg. O comprimento total de túbulo seminífero reduziu nos grupos EHRP 200 mg/Kg e EHRP 400mg/kg, porém quando avaliado por grama de testículo não houve alteração no comprimento. As áreas de túbulo e de epitélio aumentaram nos grupos EHRP 200 mg/Kg e EHRP 400mg/kg e a área do lume aumentou apenas no grupo EHRP 400mg/kg, não apresentando alteração na relação túbulo/epitélio.

**Tabela 3.** Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* (EHRP).

	Controle	EHRP 100 mg/Kg	EHRP 200 mg/Kg	EHRP 400mg/kg
<b>DT (µm)</b>	239,24±10,86 <sup>a</sup>	241,17±8,14 <sup>a</sup>	325,06±14,86 <sup>b</sup>	306,51±53,35 <sup>b</sup>
<b>AE(µm)</b>	98,04±4,60 <sup>a</sup>	92,44±2,84 <sup>a</sup>	132,38±12,76 <sup>b</sup>	120,24±21,43 <sup>c</sup>
<b>DL(µm)</b>	43,16±9,91 <sup>a</sup>	56,28±4,37 <sup>a</sup>	60,30±12,03 <sup>a</sup>	66,03±14,93 <sup>b</sup>
<b>CTS/t (m)</b>	4,17±0,52 <sup>a</sup>	4,72±0,48 <sup>a</sup>	2,13±-0,12 <sup>b</sup>	2,54±1,24 <sup>b</sup>
<b>CTS/gT (m/g)</b>	17,75±1,40 <sup>a</sup>	17,73±0,80 <sup>a</sup>	8,87±0,65 <sup>a</sup>	11,30±4,99 <sup>a</sup>
<b>Área do túbulo (µm<sup>2</sup>x10<sup>4</sup>)</b>	45005,17±4057,32 <sup>a</sup>	45695,76±3114,03 <sup>a</sup>	83078,02±7512,61 <sup>b</sup>	75536,44±23301,21 <sup>c</sup>
<b>Área do lume (µm<sup>2</sup>x10<sup>4</sup>)</b>	1524,07±678,97 <sup>a</sup>	2497,65±383,76 <sup>ab</sup>	2939,39±1220,55 <sup>ab</sup>	3562,11±1549,36 <sup>b</sup>
<b>Área do epitélio (µm<sup>2</sup>x10<sup>4</sup>)</b>	43481,10±3656,74 <sup>a</sup>	43198,11±2830,62 <sup>a</sup>	80138,63±8526,00 <sup>b</sup>	71974,34±22116,96 <sup>c</sup>
<b>RTE ‘</b>	1,22±0,05 <sup>a</sup>	1,30±0,02 <sup>a</sup>	1,23±0,07 <sup>a</sup>	1,28±0,05 <sup>a</sup>

DT – Diâmetro de túbulo; AE- altura do Epitélio; DL- Diâmetro de Lume; CTS/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTS/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e RET – Relação Túbulo/Epitélio. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

### Contagem de células no estágio 1

Na Tabela 4 estão representados o número corrigido das células germinativas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, índices espermáticos, número de células de Sertoli e produção espermática diária. O número corrigido de células de Sertoli aumentou no EHRP 400 mg/Kg, o número de células de Sertoli por grama de testículo diminuiu no EHRP 200 mg/Kg, enquanto que no EHRP 400mg/kg a capacidade de suporte da célula de Sertoli diminuiu. Essas alterações levaram a uma redução na produção espermática diária por testículo e por grama de testículo no grupo EHRP 200 mg/Kg e EHRP 400mg/kg.

**Tabela 4.** Número corrigido de células no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária, de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys* (EHRP).

	Controle	EHRP 100 mg/Kg	EHRP 200 mg/Kg	EHRP 400mg/kg
<b>SGA</b>	2,98±0,81 <sup>a</sup>	2,88±0,53 <sup>a</sup>	3,06±0,58 <sup>a</sup>	2,54±0,47 <sup>a</sup>
<b>PL/L</b>	46,84±5,11 <sup>a</sup>	48,05±4,63 <sup>a</sup>	42,38±3,77 <sup>a</sup>	46,57±3,61 <sup>a</sup>
<b>PAQ</b>	70,78±4,94 <sup>a</sup>	65,64±3,13 <sup>a</sup>	63,57±4,97 <sup>a</sup>	59,79±4,80 <sup>a</sup>
<b>EAR</b>	111,84±14,91 <sup>a</sup>	118,03±12,20 <sup>a</sup>	116,73±5,02 <sup>a</sup>	117,54±14,35 <sup>a</sup>
<b>SER</b>	3,66±0,77 <sup>a</sup>	3,21±0,98 <sup>a</sup>	3,36±0,49 <sup>a</sup>	6,21±1,35 <sup>b</sup>
<b>IMI</b>	18,54±7,68 <sup>a</sup>	16,81±3,72 <sup>a</sup>	14,73±3,00 <sup>a</sup>	18,69±2,87 <sup>a</sup>
<b>IME</b>	2,00±0,17 <sup>a</sup>	2,25±0,27 <sup>a</sup>	2,29±0,16 <sup>a</sup>	2,44±0,20 <sup>a</sup>
<b>ICS</b>	23,90±7,33 <sup>a</sup>	27,14±12,53 <sup>a</sup>	24,13±4,80 <sup>a</sup>	13,66±4,66 <sup>a</sup>
<b>SER/Ts</b>	3,60x10 <sup>6</sup> ±5,49x10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	3,89x10 <sup>6</sup> ±1,25x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	1,80x10 <sup>6</sup> ±4,11x10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	3,91x10 <sup>6</sup> ±1,72x10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>
<b>SER/gt</b>	15,8x10 <sup>6</sup> ±2,18x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	14,7x10 <sup>6</sup> ±4,75x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	7,59x10 <sup>6</sup> ±1,54x10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>	17,3x10 <sup>6</sup> ±6,86x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
<b>CSS</b>	45,13±13,46 <sup>a</sup>	49,83±22,36 <sup>a</sup>	43,46±7,50 <sup>a</sup>	24,47±7,73 <sup>b</sup>
<b>RGE</b>	49,02±21,32 <sup>a</sup>	44,69±6,50 <sup>a</sup>	43,44±11,42 <sup>a</sup>	51,59±13,99 <sup>a</sup>
<b>PED/t</b>	8,84 x 10 <sup>6</sup> ±1,57x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	10,66 x 10 <sup>6</sup> ±1,23x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	4,50x10 <sup>6</sup> ±0,47x10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>	5,66x10 <sup>6</sup> ±3,10x10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>
<b>PED/gt</b>	37,4x10 <sup>6</sup> ±5,96x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	40,3x10 <sup>6</sup> ±2,91x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	19,2x10 <sup>6</sup> ±1,94x10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>	25,1x10 <sup>6</sup> ±1,19x10 <sup>7</sup> <sup>b</sup>

SGA – Espermatogônia A; PL/L-Preleptóteno/ Leptóteno; PAQ – Paquíteno; EAR – Espermatíde arredondada; SER – Célula de Sertoli; IMI – Índice Mitótico; IME – Índice meiótico; ICS – Índice de célula de Sertoli; SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama e testículo; CSS – Capacidade de suporte de Sertoli; RGE – Rendimento geral da espermatogênese; PED/t – Produção espermática diária por testículo; PED/gt – Produção espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

## Histopatologia

A Figura 2 apresenta os dados da análise de túbulos patológicos, observando-se aumento de patologias leves no grupo EHRP 100 mg/Kg, porém sem haver alteração quanto ao número de patologias moderadas e severas.

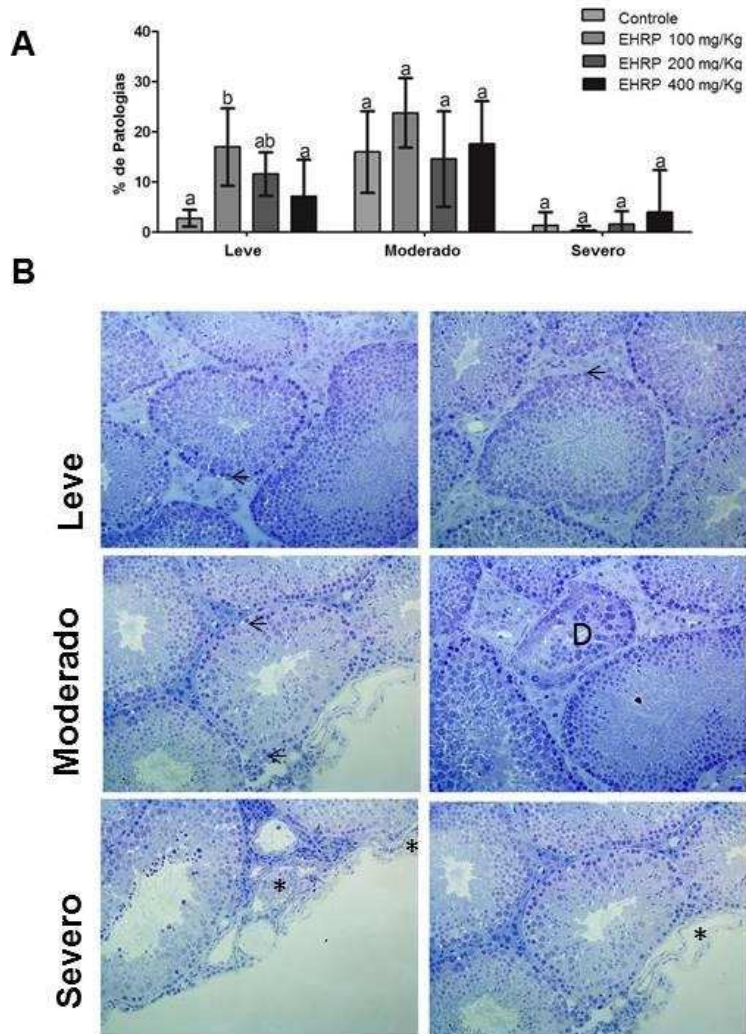


Figura 2: A – proporção de túbulos seminíferos patológicos; B- Secção histológica de testículo de animais tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys* evidenciando as patologias encontradas. Controle (Água); EHRP 100, 200 e 400mg/kg (Doses diárias). D- Degeneração; \*- Túbulos apenas com células basais; Seta- Vacúolos. Barra = 100  $\mu$ m.

## Histomorfometria Intertubular

Na Tabela 5 são apresentados os dados referentes aos percentuais e volumetria dos componentes intertubulares. O percentual do citoplasma de Leydig e de célula de Leydig aumentou no grupo EHRP 200 mg/Kg, enquanto o percentual de tecido conjuntivo diminuiu nos grupos EHRP 100 mg/Kg e EHRP 400mg/kg e o volume de tecido conjuntivo reduziu no grupo EHRP 400mg/kg.

**Tabela 5.** Percentual e Volume dos componentes do intertúbulo de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys* (EHRP).

	Controle	EHRP 100 mg/Kg	EHRP 200 mg/Kg	EHRP 400mg/kg
<b>Intertúbulo (%)</b>	11,59±2,58 <sup>a</sup>	9,96±0,44 <sup>a</sup>	12,57±1,26 <sup>a</sup>	10,76±1,12 <sup>a</sup>
<b>Vaso sanguíneo (%)</b>	0,54±0,51 <sup>a</sup>	0,60±0,31 <sup>a</sup>	0,49±0,39 <sup>a</sup>	0,23±0,24 <sup>a</sup>
<b>Espaço Linfático (%)</b>	1,04±0,82 <sup>a</sup>	0,66±0,42 <sup>a</sup>	0,30±0,38 <sup>a</sup>	0,72±0,95 <sup>a</sup>
<b>Núcleo de Leydig (%)</b>	1,10±0,38 <sup>a</sup>	0,95±0,20 <sup>a</sup>	1,25±0,30 <sup>a</sup>	1,20±0,11 <sup>a</sup>
<b>Citoplasma de Leydig (%)</b>	8,41±1,81 <sup>a</sup>	7,58±0,56 <sup>a</sup>	10,22±0,74 <sup>b</sup>	8,38±0,68 <sup>a</sup>
<b>Leydig (%)</b>	9,52± 2,09 <sup>a</sup>	8,53 ± 0,56 <sup>a</sup>	11,47 ± 0,92 <sup>b</sup>	9,58 ± 0,77 <sup>a</sup>
<b>Conjuntivo (%)</b>	0,49±0,13 <sup>a</sup>	0,18±0,08 <sup>b</sup>	0,30±0,10 <sup>ab</sup>	0,22±0,09 <sup>b</sup>
<b>Intertúbulo (mL)</b>	2,43x10 <sup>-2</sup> ±0,49x10 <sup>-2</sup> <sup>a</sup>	2,39x10 <sup>-2</sup> ±0,30x10 <sup>-2</sup> <sup>a</sup>	2,52x10 <sup>-2</sup> ±0,51x10 <sup>-2</sup> <sup>a</sup>	2,08x10 <sup>-2</sup> ±0,24x10 <sup>-2</sup> <sup>a</sup>
<b>Vaso sanguíneo (mL)</b>	1,20x10 <sup>-3</sup> ±1,20x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	14,12x10 <sup>-4</sup> ±6,09x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	9,87x10 <sup>-4</sup> ±8,12x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	4,47x10 <sup>-4</sup> ±4,88x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>
<b>Espaço Linfático (mL)</b>	2,19x10 <sup>-3</sup> ±1,83x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	1,64x10 <sup>-3</sup> ±1,10x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	6,64x10 <sup>-4</sup> ±8,76x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	1,39x10 <sup>-3</sup> ±1,87x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>
<b>Núcleo de Leydig (mL)</b>	22,70x10 <sup>-4</sup> ±4,93x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	22,98x10 <sup>-4</sup> ±6,64x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	24,68x10 <sup>-4</sup> ±5,75x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	23,19x10 <sup>-4</sup> ±2,28x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>
<b>Citoplasma de Leydig (mL)</b>	17,64x10 <sup>-3</sup> ±3,24x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	18,15x10 <sup>-3</sup> ±1,93x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	20,44x10 <sup>-3</sup> ±3,85x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	16,24x10 <sup>-3</sup> ±1,73x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>
<b>Conjuntivo (mL)</b>	10,23x10 <sup>-4</sup> ±2,53x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	4,34x10 <sup>-4</sup> ±2,52 x10 <sup>-4</sup> <sup>ab</sup>	6,00x10 <sup>-4</sup> ±1,90 x10 <sup>-4</sup> <sup>ab</sup>	4,27x10 <sup>-4</sup> ±1,51x10 <sup>-4</sup> <sup>b</sup>

Controle (água); EHRP 100, 200 e 400mg/kg (doses diária). Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

Os parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig estão apresentados na Tabela 6. Não houve alterações no diâmetro nuclear, na volumetria e no

número de células de Leydig, como também no índice Leydigossomático entre os grupos experimentais.

**Tabela 6:** Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys* (EHRP).

	Controle	EHRP 100 mg/Kg	EHRP 200 mg/Kg	EHRP 400mg/kg
<b>Diâmetro Nuclear de Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	6,69 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	7,12 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	8,12 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	7,78 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
<b>Volume do Núcleo de Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	159,42 $\pm$ 44,46 <sup>a</sup>	189,34 $\pm$ 20,25 <sup>a</sup>	285,42 $\pm$ 82,42 <sup>a</sup>	250,63 $\pm$ 70,05 <sup>a</sup>
<b>Volume do citoplasma e Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	1221,06 $\pm$ 186,44 <sup>a</sup>	1548,03 $\pm$ 224,66 <sup>a</sup>	2419,93 $\pm$ 696,30 <sup>a</sup>	1772,22 $\pm$ 599,74 <sup>a</sup>
<b>Volume de célula de Leydig(<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	1380,48 $\pm$ 212,23 <sup>a</sup>	1737,37 $\pm$ 210,16 <sup>ab</sup>	2705,35 $\pm$ 754,45 <sup>b</sup>	2022,85 $\pm$ 668,81 <sup>ab</sup>
<b>Volume de Leydig/ t (<math>\times 10^6</math>)</b>	0,020 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,020 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,023 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,019 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>
<b>Volume de Leydig/ gt (<math>\times 10^6</math>)</b>	0,086 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>	0,235 $\pm$ 0,360 <sup>a</sup>	0,097 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	0,084 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>
<b>Número de célula de Leydig / t (<math>\times 10^6</math>)</b>	2,65 $\pm$ 5,92 <sup>a</sup>	2,41 $\pm$ 5,40 <sup>a</sup>	2,69 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup>	1,29 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>
<b>Número de célula de Leydig / gt (<math>\times 10^6</math>)</b>	61,60 $\pm$ 5,70 <sup>a</sup>	130,83 $\pm$ 194,02 <sup>a</sup>	38,39 $\pm$ 12,06 <sup>a</sup>	44,55 $\pm$ 12,65 <sup>a</sup>
<b>Índice Leydigossomático (%)</b>	0,048 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,044 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,053 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,044 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>

Controle (água); EHRP 100, 200 e 400mg/kg (doses diárias). Dados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

As células de Leydig apresentavam-se morfologicamente normais, apresentando nos grupos tratados um número elevado de gotículas de lipídeos, sendo esse quadro mais evidente no grupo EHRP 200mg/kg (Figura 3).

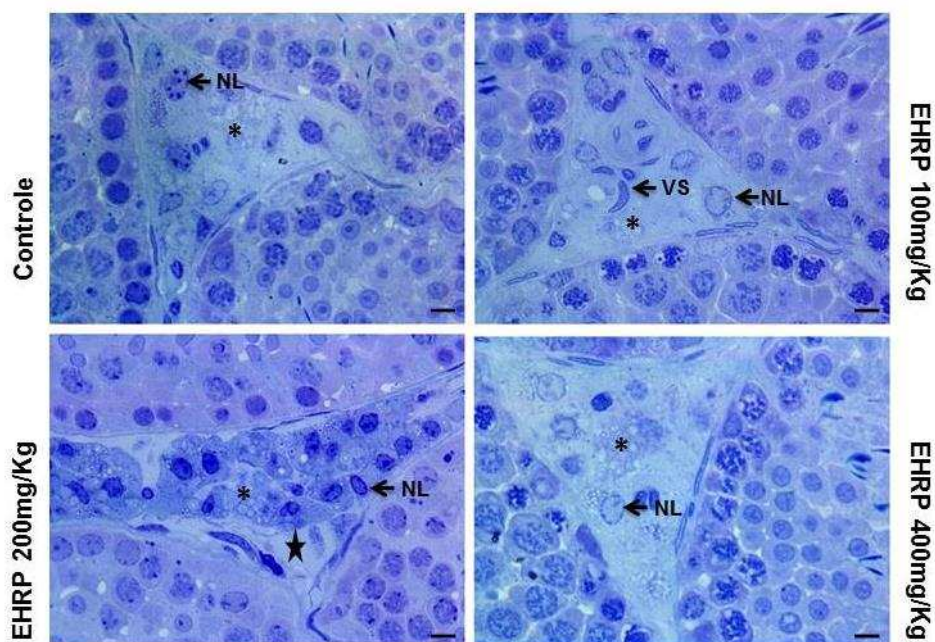


Figura 3: Fotomicrografia da estrutura e composição intertubular de animais controle e tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys*. NL- Núcleo de Célula de Leydig; \*- Citoplasma de Célula de Leydig; Estrela- Espaço linfático; VS- Vaso sanguíneo. Barra: 10µm.

### **Estresse Oxidativo Testicular**

A Figura 4 representa os gráficos da ação das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GTS), do ON e MDA. Não foram observadas alterações nestes parâmetros em qualquer grupo experimental.

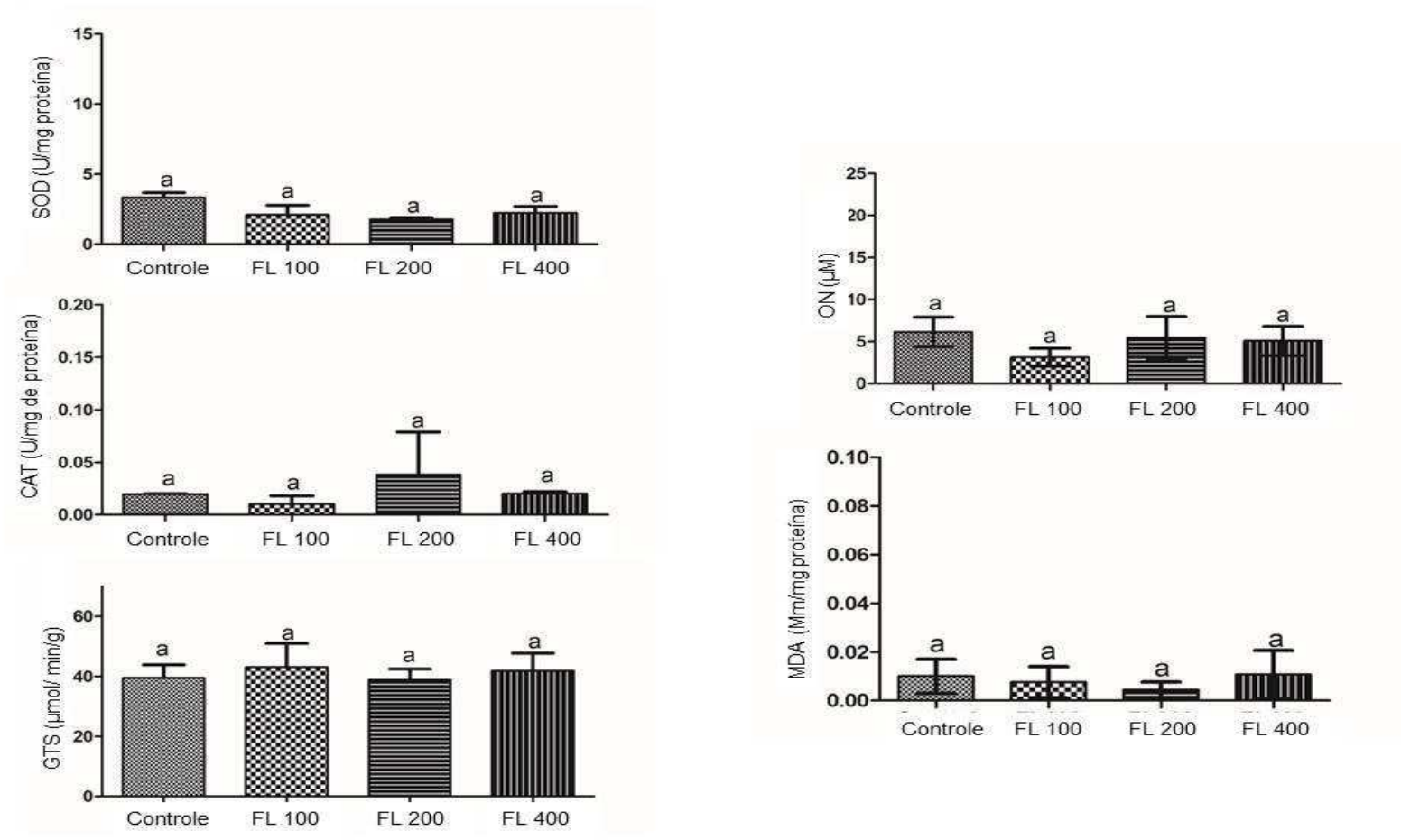


Figura 4: Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione (GTS); óxido nítrico (ON) e malondialdeído (MDA) em testículo de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* (EHRP).



## Testosterona

A Figura 5 mostra os níveis de testosterona sérica nos animais tratados. Houve aumento de aproximadamente 69% no grupo EHRP 400mg/kg.

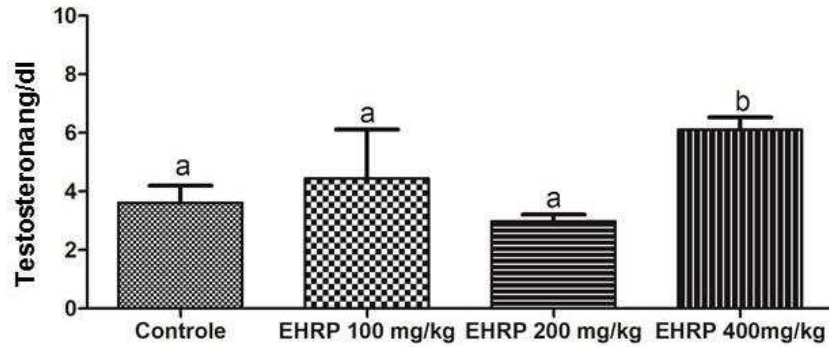
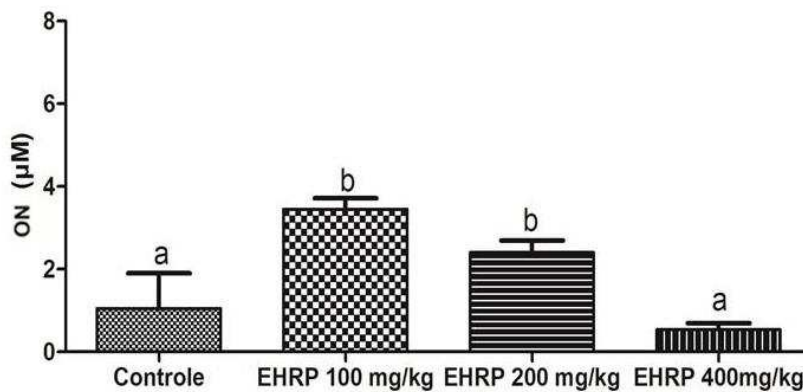


Figura 5: Concentração de testosterona sérica de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* (EHRP).

## Oxido Nítrico peniano

A concentração de óxido nítrico peniano aumentou nos grupos EHRP 100 mg/Kg e EHRP 200 mg/Kg (Figura 6).



**Figura 6:** Concentração de óxido nítrico no pênis de camundongos Swiss tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renealmia pycnostachys* (EHRP).

## Morfometria dos corpos cavernosos

Os resultados encontrados na morfometria do pênis estão apresentados na Figura 7. A proporção de tecido conjuntivo reduziu nos três grupos experimentais (EHRP 100 mg/Kg, EHRP 200 mg/Kg, e EHRP 400mg/kg), enquanto o percentual de corpos cavernosos aumentou nos três grupos.

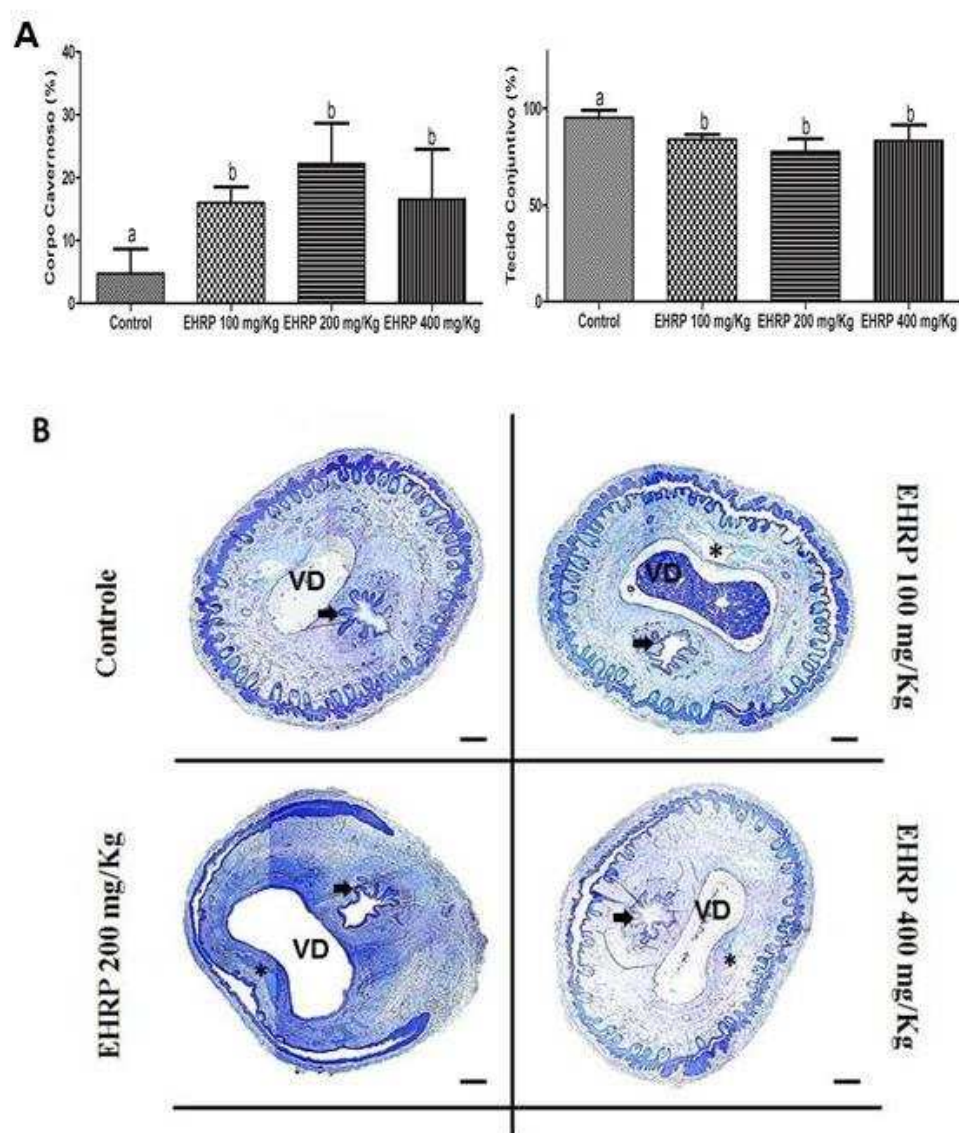


Figura 7: A - Proporção de tecido conjuntivo; B- proporção de corpos cavernosos; C - Secção histológica de pênis de animais tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys*. Seta – Uretra; VD – Vaso dorsal; \*- Corpo cavernoso. Corte de 3  $\mu$ m corados com HE/Azul de toluidina. Barra = 200  $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

Em conjunto, nossos achados indicam que a folha de *Renalmia pycnostachys* causou alterações morfológicas, hormonais e em corpos cavernosos penianos de

camundongos adultos. Em consonância com um modelo contínuo e prolongado de exposição a uma planta, com propriedades estimulantes sexuais, ocorreu aumento dos corpos cavernosos, e de testosterona sérica, embora o tratamento tenha causado redução na produção espermática diária, sem maiores comprometimentos à microestrutura testicular.

O EHRP, não alterou os dados biométricos, corporal e testicular, mostrando que o extrato possivelmente não apresenta características tóxicas. Estes dados foram semelhantes aos resultados obtidos com o extrato de *Kaempferia parviflora*, em que não houve alteração no peso testicular (CHATURAPANICH *et al.*, 2008). Porém, camundongos Swiss tratados com o extrato etanólico de *Abelmoschus manihot* apresentaram aumento no peso corporal e testicular (REWATKAR *et al.*, 2010).

Os percentuais e volumes de parâmetros tubulares não foram alterados. Estes achados são semelhantes aos encontrados em animais tratados com infusão de *Heteropterys aphrodisiaca*, os quais não alteraram o percentual de túbulo seminífero (GOMES *et al.*, 2011), mas diferem daqueles observados em animais tratados com o extrato de *Tynnanthus fasciculatus*, que mostraram aumento do percentual e volume de túbulo seminífero (MELO *et al.*, 2010).

A redução do comprimento de túbulos seminíferos ocasiona o aumento do diâmetro tubular, que é justificado pelo aumento da altura do epitélio e do diâmetro do lúmen. O epitélio seminífero é um ambiente altamente especializado e organizado, onde integra as células germinativas e as células de Sertoli. Essas células dão suporte para a ocorrência da espermatogênese (LARA *et al.*, 2018) e, por esse motivo, os túbulos seminíferos são as principais estruturas a serem estudadas na reprodução. Como consequência do aumento do diâmetro de túbulo, altura do epitélio e diâmetro do lúmen observou-se aumento das áreas de túbulo, epitélio e lume e assim a manutenção da relação túbulo-epitélio. Alguns autores sugerem que o aumento das áreas, diâmetro tubular e altura do epitélio esteja relacionado com o aumento de células germinativas, como foi observado em animais tratados com o extrato aquoso de *Apium graveolens*, em que o aumento diâmetro tubular e altura de epitélio foi devido ao maior de número de espermatogônias, espermatócitos e espermatozóides (HARDANI *et al.*, 2015).

Animais que receberam a maior dose de EHRP mostraram aumento do número das células de Sertoli, mas a população de células germinativas foi mantida, o que resultou na redução na capacidade de suporte das células de Sertoli e redução na produção espermática diária. A análise da funcionalidade do processo espermatogênico,

a estimativa da produção espermática e o conhecimento da cinética espermatogonial são possíveis de serem conhecidos através da quantificação de diferentes tipos celulares por secção transversal de túbulo seminífero, nos diversos estádios do ciclo (LEBLOND e CLERMONT, 1972; FRANÇA, 1991). Segundo Russell (1990), as células de Sertoli são capazes de detectar anormalidades qualitativas nas células germinativas, podendo fagocitar células defeituosas. Esta ação gera alteração quantitativa nas células germinativas que, conseqüentemente, é refletida na redução do número de espermatozoides produzidos. Por anos acreditou-se que a proliferação das células de Sertoli acontecia apenas em testículos imaturos sexualmente. Em roedores de laboratório, o pico de proliferação destas células começa antes do nascimento e a divisão é encerrada antes da puberdade, e assim, mantem-se numericamente imutável por toda a vida do animal (STEINBERGER e STEINBERGER, 1971). Entretanto, foi revelado recentemente que a proliferação de células de Sertoli em uma espécie de roedor ocorreu além do período perinatal e até mesmo na vida adulta, na região de transição entre os túbulos seminíferos com a rede testicular (FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

Embora as maiores doses do EHRP tenham diminuído a produção espermática, pelas análises histopatológicas podemos observar que o tratamento não causou alterações severas à microestrutura tecidual. Este fato, juntamente com a análise do estado oxidativo, indica que esta planta não danifica as estruturas testiculares e não promove estresse oxidativo. Isto é justificado pela manutenção dos valores de CAT, SOD e GSH em todos os grupos de tratamento, indicando ação efetiva anti-estresse. Este estresse ocorre quando há instabilidade entre agentes oxidantes e antioxidantes, havendo grande produção de espécies reativas (EROs) (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Com relação aos parâmetros intertubulares houve aumento no percentual de células de Leydig e do seu citoplasma no grupo de dose intermediária. Animais tratados com extrato etanólico de *Colebrookea oppositifolia* tiveram redução das áreas nuclear e citoplasmática das células de Leydig, o que interferiu na espermatogênese, pois a síntese hormonal está diretamente ligada ao volume total de células de Leydig (GUPTA *et al.*, 2001).

O ILS é um parâmetro que visa quantificar o investimento em células de Leydig, com relação ao peso corporal. O valor estimado de ILS para camundongos é de 0,03%

(RUSSELL, 1996), como os valores observados neste trabalho foram de 0,048, entende-se que estão dentro da normalidade para a espécie. Alterações nesses parâmetros são consideradas como um indicativo no aumento da produção de testosterona, pois foi sugerido que a produção deste andrógeno esteja ligada diretamente às mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, mais do que com o tamanho e a quantidade desta célula (VYAS e RAVAL, 2016). No entanto, os níveis de testosterona não sofram alterações no grupo EHRP 200 mg/Kg, embora tenha aumentado no grupo de maior dose (EHRP 400 mg/Kg). A testosterona é essencial para manter a espermatogênese em vários níveis. Na ausência de testosterona ou do receptor de andrógeno (AR), a formação da barreira da célula de Sertoli é comprometida, as células germinativas são incapazes de progredir na meiose, as células germinativas imaturas são prematuramente deslocadas das células de Sertoli e os espermatozoides maduros não são liberados das células de Sertoli. A interrupção de qualquer uma destas etapas dependentes de testosterona resulta na falha da espermatogênese, o que pode levar à infertilidade (WALKER e CHENG, 2005).

GUO *et al.*(2005) sugeriram que a inibição de cAMP reduz o transporte de colesterol para a membrana interna das mitocôndrias, onde é convertido principalmente em pregnenolona, o que causa acúmulo no citoplasma da célula de Leydig. Por esta razão houve aumento no percentual de citoplasma de Leydig, devido ao acúmulo de gotículas de gordura no grupo EHRP 200 mg/Kg, possivelmente promovendo o não aumento da testosterona pela deficiência na síntese.

Observou-se aumento de ON no pênis dos animais tratados com extrato hidroalcoólico da folha de *Renalmia pycnostachys* nas concentrações de 100 e 200 mg/Kg. O ON regula diversas funções fisiológicas sendo o principal vasodilatador dos corpos cavernosos penianos (DUSSE *et al.*, 2003). Porém, a função erétil é uma combinação complexa de ações nervosas, vasculares e endócrinas, com fisiologia pouco descrita, que trabalham em conjunto para produzir mudanças estruturais de forma coordenada. O músculo liso dos corpos cavernosos, o endotélio e as comunicações célula-célula através de junções gap são essenciais para a ereção e, portanto, a patologia em qualquer um desses componentes pode levar à disfunção erétil (DE) (CHUNG, 2006).

Como reflexo do aumento de ON nos grupos tratados com as doses de 100 e 200 mg/Kg, encontramos também o aumento dos corpos cavernosos, o ON não foi alterado na dose de 400 mg/Kg, porém, houve aumento nos corpos cavernosos. Embora o óxido

nítrico seja o principal responsável pela vasodilatação dos corpos cavernosos, outros gases endógenos já foram descobertos, por exemplo o monóxido de carbono (CO). Há evidências de que o CO estimula a guanilato ciclase solúvel (sGC) e aumenta os níveis celulares de GMP cíclico (MAINES, 1997; MORITA et al., 1995), produzindo relaxamento da musculatura lisa (ABDEL AZIZ, 2005).

Alguns estudos realizados demonstraram os efeitos de extratos vegetais ou de seus constituintes isolados sobre a ereção peniana comprovando sua ação sobre as células musculares vasculares, tendo um efeito relaxante e melhorando o mecanismo da ereção (ABDELWAHAB *et al*, 2012; LI *et al*, 2012). Assim, o músculo liso deve relaxar para manter a ereção, aumentando a pressão intracavernosa durante o processo (COSTA *et al*, 2006).

## **CONCLUSÕES**

O tratamento com o extrato hidroalcoólico da folha de *R. pycnostachys* causa redução na produção espermática diária quando administrado em doses de 200 e 400 mg/Kg. Promove aumento de testosterona na maior dose, além do aumento de óxido nítrico peniano com consequente aumento dos corpos cavernosos. Assim, fica patente a ação erectogênica do extrato, apesar de mostrar redução na produção espermática, porém sem causar danos severos a estrutura tecidual ou ao equilíbrio redox.

## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S.I.; MOHAMED, A.H.; MOHAMED, O.Y.; OALL, M.; TAHA, M.M.E; MOHAN, S.; NOORDIN, M.I; MUSTAFA, M.R.; ALKHARFY, K.M. Erectogenic effects of *Clerodendron capitatum*: Involvement of phosphodiesterase type-5 inhibition. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. (2012):16–8, 2012.
- ABDEL AZIZ M.T.; EL-ASMAR M.F.; MOSTAFA T.; ATTA H.; WASSEF M.A.A.; FOUAD H.H. Effects of nitric oxide synthase and heme oxygenase inducers and inhibitors on molecular signaling of erectile function. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 3(37):103-111, 2005
- AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105:121–126, 1984.
- ALOK, S.; RATENDRA, K; RAMANDEEP; S. Nature's Aphrodisiacs - A Review of Current Scientific Literature. International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research. 2(3):1-20, 2013.
- CARMONA F.; PEREIRA A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. Revista Brasileira Farmacologia. 2(23):379-385, 2013.
- CHATURAPANICH, G.; CHAIYAKUL, S.; VERAWATNAPAKUL, V.; PHOLPRAMOOL, C. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatic blood flow in male rats. Reproduction. 4(134):515-522, 2008
- CHAUHAN, A.; AGARWAL, M. Reversible changes in the antifertility induced by *Aegle marmelos* in male albino rats. Systems Biology in Reproductive Medicine. 6(54):240-246, 2008.
- CHUNG, K. F. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. European Journal of Pharmacology. 1-3(533):110-117, 2006.
- COSTA, W.S.; CARRERETE, F.B.; HORTA, W.G.; SAMPAIO F.J. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. British Journal of Urology International. 3(97):567-569, 2006.
- CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology. 5(68):408-415, 2003.

- DEL MAESTRO, R.F.; MCDONALD, W. Oxidative enzymes in tissue homogenates. In: Greenwald RA, ed. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, FL: CRC Press; 291–296, 1985.
- DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische Untersuchungen am Tubulussystem des Schweinehodens während der postnatalen Entwicklung Monatshefte für Veterinärmedizin. **29**: 650-652, 1974.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 4 (39):435-450, 2003.
- FAROMBI, E.O., ADEDARA, I.A., OYENIHI, A.B., EKAKITIE, E., KEHINDE, S. Hepatic, testicular and spermatozoa antioxidant status in rats chronically treated with *Garcinia kolaseed*. Journal of Ethnopharmacology. 146:536–542. 2013.
- FERREIRA, A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira. 1(43):61-68, 1997.
- FIGUEIREDO, A.F.A.; FRANÇA, L.R.; HESS, R.A.; COSTA, G.M.J. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. Cell Cycle. 18(15):2486-2496, 2016.
- FRANÇA, L. R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça piau. Tese (Doutorado em Morfologia) Belo Horizonte-MG, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais UFMG, p.185, 1991.
- GOEL, H.C.; SAMANTA, N.; KANNAN, K.; KUMAR, I.P.; BALA, M. Protection of spermatogenesis in mice against gamma ray induced damage by *Hippophae rhamnoides*. Andrologia. 6(38):199-207, 2006
- GOMES, M.L.M.; MONTEIRO, J.C.; FREITAS, K.M.; SBERVELHERI, M.M.; DOLDER, H. Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. Biological Research. 3(44):235-241, 2011.
- GUO, C.H.; LIN, C.Y.; YEH, M.S.; HSU, G.S.W. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. Environmental Toxicology and Pharmacology. 1(19):33–40, 2005.



- GUPTA, R.S.; YADAV, R.K.; DIXIT, V.P.; DOBHAL, M.P. Antifertility studies of *Colebrookia oppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. *Fitoterapia*. 3(72):236-245, 2001.
- HARDANI, A.; AFZALZADEH, M.R.; AMIRZARGAR, A.; MANSOURI, E.; MEAMAR, Z. Effects of aqueous extract of celery (*Apium graveolens L.*) leaves on spermatogenesis in healthy male rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2(5):113, 2015.
- HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng, C.Y. (Ed.), *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 1st edn Springer, New York, pp. 1. 1. 2007.
- JOHNSEN, S. G. Testicular biopsy score count - A method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones Research in Paediatrics*. 1(1):2-25, 1970.
- LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals New York Academy of Sciences*. 4(55):548-573, 1952.
- LI, X.; OH, H.C.; SON, S.B.; LEE, Y.J.; KANG, D.G.; LEE, H.S. Effect of an ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* on relaxation in corpus cavernosum smooth muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternatative Medicine*. 2012:10, 2012.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR A.L.; RABDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1(193):265-275, 1951.
- MAAS, P.J.M. *Renealmia* (Zingiberaceae- Zingiberoideae). *Costoideae* (Additions) Zingiberaceae). *Flora Neotropica, Monograph*. 18, 1-218, 1977.
- MACHADO, L.H.B. As representações entremeadas no comércio de plantas medicinais em Goiânia/GO: uma reflexão geográfica. *Sociedade & Natureza*. 1(21):159-72, 2009.
- MAINES, M. D. The heme oxygenase system; a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1(37):517-554, 1997
- MELO, F.C.S.A; MATTA, S.L.P.; PAULA, T.A.R.; GOMES, M.L.M.; OLIVEIRA, L.C. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on

- testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*. 4(43):445-450, 2010.
- MORITA, T.; PERELLA, M. A.; LEE, M.E.; KOUREMBANAS, S. Smooth muscle cell derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5(92):1475-1479, 1995.
- NEGRELLE, R.R.B. *Renalmia* L.f.: aspectos botânicos, ecológicos, farmacológicos e agronômicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2(17):274-290, 2015.
- LARA, N.L.M.; COSTA, G.M.J; AVELAR, G.F; LACERDA, S.M.S.N; HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Testis Physiology—Overview and Histology. *Encyclopedia of Reproduction*. 105-116, 2018. *In press*
- RASKIN, ILYA AND RIPOLL, CHRISTOPHE. Can an apple a day keep the doctor away? *Current Pharmaceutical Design*. 27(10):3419-3429, 2004.
- REWATKAR, K.K.; SHAHZAD, N.; AHMED, A.; KHAN, M.I.; GANESH, N. A landmark approach to aphrodisiac property of *Abelmoschus manihot* (L.). *International Journal of Phytomedicine*. 3(2):312-319, 2010.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*. 3(21):133149, 2005.
- RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and Other Preanalytical Factors Interfere in Plasma Nitrate/Nitrite Quantification by the Griess Method. *Nitric Oxide*. 2(6):178–185, 2002.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian Spermatogenesis. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Eds.). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida: Cache River Press. p. 1 - 40, 1990.
- RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (Eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, p. 218-222, 1996.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 41(2):237–45, 1981.
- STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction*. 1(4):84-87, 1971.

- THAKUR, M.; BHARGAVA, S.; DIXIT, V.K. Effect of *Asparagus racemosus* on sexual dysfunction in hyperglycemic male rats. *Pharmaceutical Biology*. 5(47):390-395, 2009.
- VYAS, N.Y.; RAVAL, M.A. Aphrodisiac and spermatogenic potential of alkaloidal fraction of *Hygrophila spinosa* T. Ander in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 194:947-953, 2016.
- WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.G.; CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*. 208(1):10–15, 1993.
- WALKER, W.H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 1(130):15–28, 2005.